



UNIWERSYTET ŁÓDZKI

Wydział Chemii

Katedra Chemii Środowiska

**Wykorzystanie mikroekstrakcji w elektroforetycznej analizie moczu
na zawartość tiolaktonu homocysteiny**

*Application of microextraction in the electrophoretic analysis of urine for
homocysteine thiolactone content*

ROZPRAWA DOKTORSKA

Krystian Purgat

Promotor: **dr hab. Paweł Kubalczyk, prof. UŁ**

Łódź, 2023 r.

Spis treści

Wykaz skrótów i symboli	4
Wstęp	6
CZĘŚĆ TEORETYCZNA	8
1. Chemia i biochemia homocysteiny	9
1.1. Właściwości fizykochemiczne	9
1.2. Właściwości biochemiczne	9
2. Przegląd metod oznaczania tiolaktonu homocysteiny	20
2.1. Metoda analizy przepływowej	21
2.2. Metody chromatograficzne	22
2.3. Metody elektromigracyjne	44
2.4. Podsumowanie i porównanie metod oznaczania tiolaktonu homocysteiny	47
3. Elektroforeza kapilarna	51
3.1. Podstawy teoretyczne	51
3.2. Metody poprawiania czułości elektroforezy	53
4. Ekstrakcja ciecz-ciecz jako element przygotowania próbki do analizy	66
4.1. Podstawy teoretyczne	66
4.2. Mikroekstrakcja do pojedynczej kropli	68
CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	75
Cel pracy	76
Odczynniki, roztwory i aparatura	77
Opracowanie elektroforetycznych procedur oznaczania tiolaktonu homocysteiny w moczu człowieka	82
1. Wyznaczenie analitycznej długości fali	82
2. Parametry walidacyjne podczas opracowywania procedur analitycznych	82
3. Opracowanie metody oznaczania tiolaktonu homocysteiny za pomocą kapilarnej elektroforezy strefowej oraz mikroekstrakcji do pojedynczej kropli realizowanej w układzie pomiarowym elektroforezy kapilarnej	83
3.1. Dobór warunków elektroforetycznego rozdzielania	83
3.2. Dobór warunków ekstrakcji do pojedynczej kropli	89
3.3. Wyznaczenie stopnia zatężania analitu – współczynnik wzmocnienia czułości metody	102
3.4. Walidacja opracowanej metody	104

3.5. Oznaczanie tiolaktonu homocysteiny w moczu człowieka	108
4. Opracowanie metody oznaczania tiolaktonu homocysteiny za pomocą kapilarnej elektroforezy strefowej oraz mikroekstrakcji do pojedynczej kropli realizowanej poza układem pomiarowym elektroforezy kapilarnej	110
4.1. Warunki elektroforetycznego rozdzielania	110
4.2. Dobór warunków mikroekstrakcji do pojedynczej kropli	110
4.3. Walidacja opracowanej metody	120
4.4. Wyznaczenie stopnia załężania analitu – współczynnik wzmocnienia czułości metody	125
4.5. Oznaczanie tiolaktonu homocysteiny w moczu człowieka	126
5. Opracowanie metody oznaczania tiolaktonu homocysteiny za pomocą elektroforezy strefowej z wykorzystaniem mikroekstrakcji do pojedynczej kropli oraz wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego.....	127
5.1. Dobór warunków elektroforetycznego rozdzielania	127
5.2. Dobór warunków elektrokinetycznego wprowadzania analitu do kapilary	130
5.3. Mikroekstrakcja do pojedynczej kropli jako element przygotowania próbki oraz pierwszy etap załężania analitu	139
5.4. Wyznaczenie stopnia załężania analitu – współczynnik wzmocnienia czułości metody	140
5.5. Walidacja opracowanej metody	142
5.6. Oznaczanie tiolaktonu homocysteiny w moczu człowieka	146
Podsumowanie i wnioski końcowe	149
Nowe metody analizy będące rezultatem badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej	154
Wnioski	156
Streszczenie	157
Summary	159
Abstract	161
Literatura	163
Wykaz tabel.....	180
Wykaz rysunków	181
Dorobek naukowy	187

Wykaz skrótów i symboli

- AARS – syntetaza aminoacylo-tRNA
- ACN – acetonitryl
- ATP – adenozylo trójfosforan
- BGE – elektrolit podstawowy
- CBS – β -syntaza cystationinowa
- CE – kapilarna elektroforeza
- CF-SDME – mikroekstrakcja do kropli z próbki w ciągłym przepływie
- CPE – ekstrakcja do punktu zmętnienia
- Cys – cysteina
- CZE – strefowa elektroforeza kapilarna
- DI-SDME – mikroekstrakcja do kropli zanurzonej bezpośrednio w próbce
- DLLME – dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz – ciecz
- DMEM – pożywka Dulbecco – zmodyfikowane podłoże Eagle'a
- EDTA – kwas (etylenodiamino)tetraoctowy
- EOF – przepływ elektroosmotyczny
- FASI – spiętrzanie na drodze wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola
- FASS – spiętrzanie ze wzmocnieniem pola
- Hcy – homocysteina
- Hcy-AMP – adenylan homocysteiny
- Hep G2 – ludzka linia komórkowa raka wątroby
- HFBA – bezwodnik heptafluorobutanowy
- HF-LPME – mikroekstrakcja do fazy ciekłej z wykorzystaniem porowatej rurki
- HHcy – hiperhomocysteinemia
- HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa
- HS-SDME – mikroekstrakcja do kropli z fazy nadpowierzchniowej
- HSL – lakton homoseryny
- HTL – tiolakton homocysteiny
- ICF – chloromrówczan izobutyłu
- ITP – izotachoforeza
- LC-MS/MS – chromatograf cieczowy sprzężony z tandemowym spektrometrem mas
- LDL – lipoproteiny o małej gęstości
- LIF – laserowo indukowana fluorescencja

LPME – mikroekstrakcja do fazy ciekłej
LLL-SDME – mikroekstrakcja do pojedynczej kropli w układzie ciecz-ciecz-ciecz
LLE – ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz
LOQ – granica oznaczalności
LOD – granica wykrywalności
LVSS – spiętrzanie z dużą strefą próbki
Met – metionina
MetOH – metanol
MS – spektrometria mas
MSTFA – N-metylo-N-(trimetylosililo)trifluoroacetamid
MTHFR – reduktaza metylenotetrahydrofolianowa
ODTS – oktadecylotrimetoksylan
OPA – aldehyd ortoftalowy
PBS – roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanem sodu i potasu
PEEK – polieteroeteroketon
 pK_a – ujemny logarytm dziesiętny z kwasowej stałej dysocjacji
 PP_i – pirofosforanu
pseudo-tITP – spiętrzanie według mechanizmu pseudoprzejściowej izotachoforezy
SAH – S-adenozylhomocysteina
SAM – S-adenozylometionina
SEF – współczynnik wzmocnienia czułości
SDME – mikroekstrakcja do pojedynczej kropli
SDS – sól sodowa kwasu dodecylosiarkowego
SMet – syntaza metioninowa
SPE – ekstrakcja do fazy stałej
Sweeping-MEKC – zateżanie przez zmiatanie w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii
t-ITP – spiętrzanie według mechanizmu przejściowej izotachoforezy
TMCS – trimetylochlorosilan
WWA – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

Wstęp

Wśród technik separacyjnych metody elektromigracyjne mogą w wielu przypadkach stanowić świetną alternatywę dla procedur chromatograficznych. Separacja składników próbki w obu tych technikach zachodzi w fazie ciekłej, a elektroforezę kapilarną (CE) często nazywa się techniką siostrzaną i komplementarną do chromatografii cieczowej. Jak każdą technikę analityczną, również CE charakteryzuje szereg zalet oraz wad. Niewątpliwymi zaletami CE są dobra rozdzielczość, wysoka sprawność i selektywność, niskie wymagania co do objętości próbki oraz zużycia odczynników chemicznych, a co za tym idzie niski koszt analizy. Mając na uwadze wyżej wymienione zalety technika CE może być również rozpatrywana jako bardziej ekologiczna w stosunku do HPLC czy GC. Z drugiej jednak strony jedną z najczęściej wymienianych wad CE, która w znacznym stopniu ogranicza jej zastosowanie, jest niska, często niewystarczająca, czułość stężeniowa w przypadku stosowania bardzo popularnego detektora UV-Vis. Wspomniana wada wynika z bardzo małej średnicy wewnętrznej kapilary oraz ograniczonej objętości próbki, którą można do kapilary wprowadzić. Niezbędne jest więc wykorzystanie efektywnych metod zatężania analitów, które w znaczny sposób poprawiają czułość stężeniową CE.

Mimo dużego postępu w rozwoju oprzyrządowania analitycznego, podczas oznaczania badanych związków w płynach biologicznych charakteryzujących się złożonością matrycy, w większości przypadków wymagane jest odpowiednie przygotowanie próbki. Próbki biologiczne mogą zawierać kwasy, zasady, białka, sole i inne związki organiczne, które mogą mieć właściwości chemiczne podobne do analitu będącego przedmiotem zainteresowania albo przeszkadzać w prowadzeniu skutecznej separacji. Wiele z badanych związków jest obecnych w płynach biologicznych w bardzo niewielkich bądź śladowych stężeniach, ograniczenie może także stanowić mała objętość próbki. Dlatego etap przygotowania próbki jest wymieniany jako kluczowa część analizy decydująca o jej końcowym powodzeniu. W celu uproszczenia matrycy próbek biologicznych stosuje się różne metody ekstrakcji, izolacji i zagęszczania analitów. Idealna technika przygotowania próbki do analizy powinna być łatwa w użyciu, szybka, niedroga, ekologiczna oraz kompatybilna z szeregiem narzędzi analitycznych. W celu przezwyciężenia lub ograniczenia niektórych wad LLE i SPE, sięgnięto po zminiaturyzowane metody przygotowania próbek takie jak np. mikroekstrakcja do fazy ciekłej, w tym mikroekstrakcja do pojedynczej kropli (SDME). Ta technika ekstrakcji należy w ostatnich latach do jednych z najpopularniejszych i najskuteczniejszych metod oczyszczania próbki z jednoczesnym zatężaniem analitu. Charakteryzuje się kilkoma ważnymi zaletami, które stają się szczególnie znaczące podczas

wykorzystania SDME w połączeniu z CE. W tym kontekście mikroekstrakcja pozwala na uproszczenie matrycy próbki i znaczne zmniejszenie zużycia, często toksycznych, rozpuszczalników organicznych. Proces ekstrakcji może zostać w dość łatwy sposób zautomatyzowany bez konieczności modyfikacji posiadanej aparatury, a co najważniejsze, w przypadku oznaczania śladowych ilości analitów, SDME pozwala na osiągnięcie wysokich współczynników wzbogacania.

Prowadzone na przestrzeni wielu lat badania kliniczne dowiodły związku przyczynowo skutkowego pomiędzy zaburzeniami metabolizmu homocysteiny Hcy a rozwojem w organizmie człowieka chorób cywilizacyjnych takich jak nowotwory, choroby układu krążenia i neurodegeneracyjne. U zdrowego człowieka stężenie Hcy w osoczu wynosi od 5 do 15 $\mu\text{mol/L}$ osocza, zaś powyżej tej wartości mówimy o podwyższonej zawartości homocysteiny, inaczej hiperhomocysteinemii. Opisane w literaturze badania nad nadmiernym stężeniem Hcy w osoczu doprowadziły naukowców do wniosku, iż zjawisko hiperhomocysteinemii ma kilka przyczyn. Pierwsza dotyczy genetycznie uwarunkowanego niedoboru enzymów mających zdolność metabolizowania Hcy, a drugą jest nieodpowiedni styl życia oraz pokarmowy niedostatek odpowiednich witamin. W przypadku gdy homocysteina nie zostanie przekształcona w inne związki w poszczególnych szlakach metabolicznych, jej nadmiar usuwany jest w przestrzeń pozakomórkową, gdzie ulega cyklizacji do tiolaktonu homocysteiny (HTL), który wykazuje negatywny wpływ na organizm człowieka, gdyż dzięki swojej wysokiej reaktywności tworzy wiązanie izopeptydowe z grupą aminową reszty lizyny białka na drodze N-homocysteinylacji. Może to prowadzić do nieodwracalnych uszkodzeń białka poprzez spowolnienie jego działania, zmiany funkcji biologicznych lub dezaktywację. Ważne jest zatem posiadanie odpowiednich narzędzi analitycznych pozwalających na monitorowanie poziomu HTL w płynach ustrojowych, w tym w moczu.

Przedmiotem badań wykonanych w ramach przedstawianej dysertacji było wykorzystanie SDME do izolacji i zateżenia HTL w jego wykrywaniu i oznaczaniu w moczu człowieka techniką CE. Używając roztwory moczu człowieka wzbogacone roztworem standardowym HTL, opracowano optymalne warunki ekstrakcji oraz elektroforetycznej separacji HTL. SDME zrealizowano na dwa sposoby, ręcznie poza układem elektroforetycznym albo w sposób automatyczny w kapilarze bezpośrednio przed separacją. W jednej z procedur zastosowano dodatkowo zateżanie analitu w kapilarze techniką spiętrzania podczas elektrokinetycznego wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola. Opracowane i walidowane metody zastosowano następnie do oznaczania HTL w próbce biologicznej.

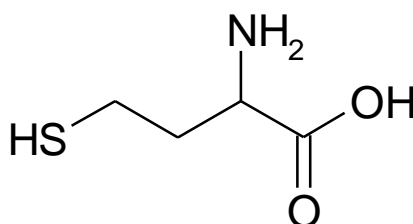
CZEŚĆ TEORETYCZNA

1. Chemia i biochemia homocysteiny

Homocysteina (Hcy) jest związkiem chemicznym naturalnie powstającym w komórkach u wszystkich organizmów żywych, jako produkt przejściowy w szlakach metabolicznych dwóch ważnych aminokwasów siarkowych, tj. metioniny (Met) oraz cysteiny (Cys), które uczestniczą w biosyntezie białek [1]. Odkrycie tego znaczącego niebiałkowego aminokwasu nastąpiło, kiedy to po raz pierwszy Hcy została zsyntezowana w warunkach laboratoryjnych w 1932 r. w reakcji utlenienia disulfidu homocystyny poprzez demetylację metioniny za pomocą kwasu siarkowego (VI) [2]. Natomiast w 1935 r. Hcy została otrzymana w wyniku redukcji homocystyny z wykorzystaniem metalicznego sodu w ciekłym amoniaku [3].

1.1. Właściwości fizykochemiczne

Hcy jest czterowęglowym niebiałkowym aminokwasem, czyli takim, który nie wchodzi w skład strukturalny żadnego białka, zawierającym w swojej strukturze atom siarki. W cząsteczce Hcy wyróżnić można trzy różne grupy funkcyjne, mianowicie: karboksylową, aminową i sulfhydrylową. Jej nazwa systematyczna to kwas 2-amino-4-merkaptobutanowy, a wzór strukturalny przedstawiony jest na **rysunku 1**.



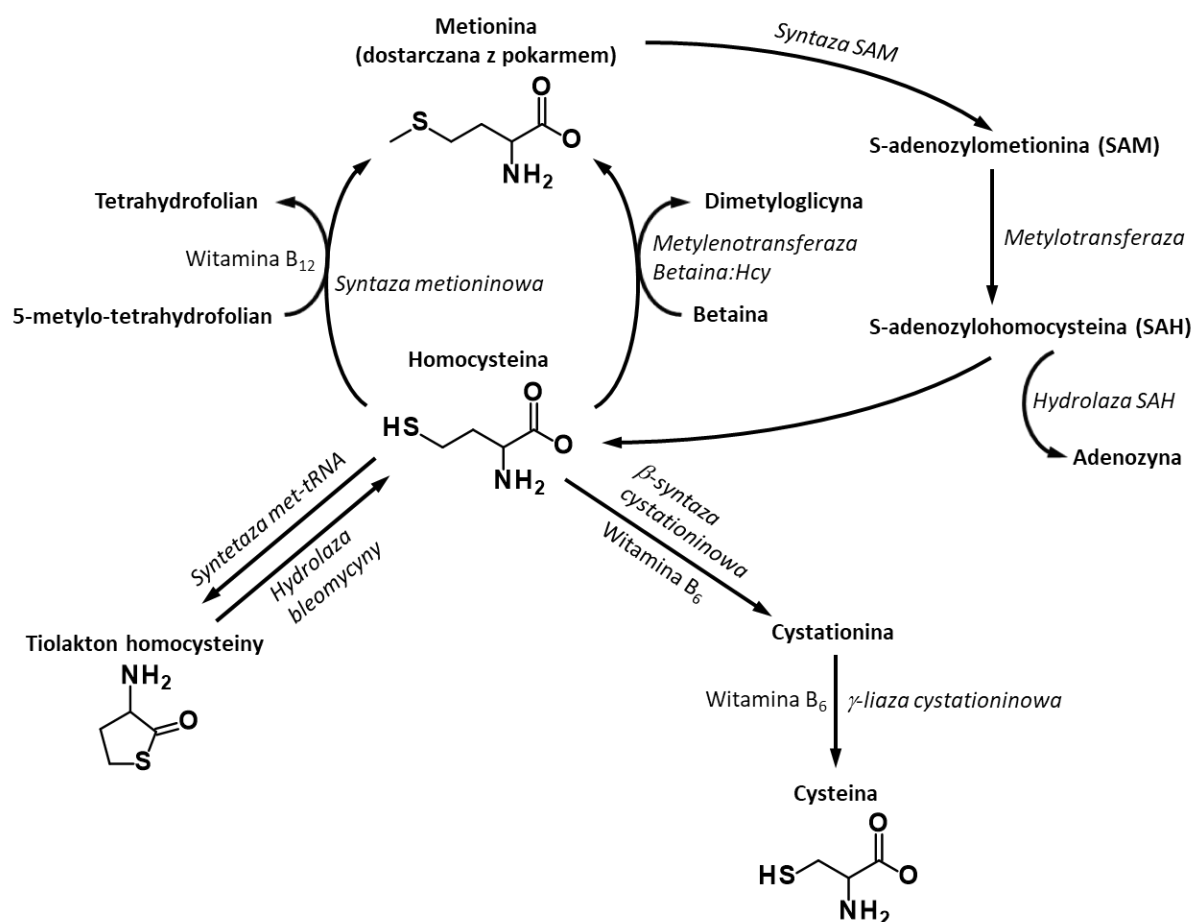
Rys. 1. Wzór strukturalny homocysteiny.

Zsyntezowana Hcy występuje w postaci białego krystalicznego proszku. Jej masa molowa przyjmuje wartość 135,19 g/mol. Temperatura topnienia obejmuje zakres 232 - 233 °C. Rozpuszczalność w wodzie, mierzona w temperaturze 25 °C, jest bardzo dobra i wynosi 148 g/L. Wartość LD₅₀ dla Hcy podawanej myszom wynosi: dootrzewnowo – 500 mg/kg, dożylnie – 770 mg/kg [4].

1.2. Właściwości biochemiczne

Szlak metaboliczny

Biochemia homocysteiny związana jest ściśle z biosyntezą metioniny oraz cysteiny. Najlepiej obrazuje to **rysunek 2**, na którym można zauważyć, że Hcy powstaje jako produkt przejściowy w poszczególnych szlakach metabolicznych Met i Cys.



Rys. 2. Poglądowy schemat metabolizm homocysteiny u człowieka.

Ssaki, w odróżnieniu od bakterii i roślin, nie syntezują w komórkach aminokwasu Met. W związku z czym ludzie oraz zwierzęta muszą dostarczać ten ważny aminokwas w postaci białek z pokarmu. W dalszej kolejności dzięki układowi pokarmowemu białka są hydrolizowane na poszczególne aminokwasy. Uwolniona Met jest pobierana przez nabłonek przewodu pokarmowego i transportowana przez układ krwionośny do komórek różnych narządów [1]. Następnie Met jest przekształcana przez każdą komórkę organizmu na drodze dwóch głównych szlaków metabolicznych:

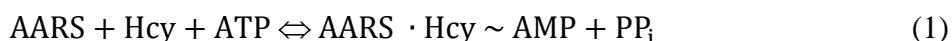
1. jako budulec do tworzenia nowych aminokwasów przez rybosomalny białkowy aparat biosyntezy,
2. jako prekursor S-adenosylometioniny, czyli uniwersalnego dawcy grupy metylowej do biologicznych reakcji metylacji.

Ścieżka metaboliczna Met w punkcie 2 prowadzi do powstania Hcy, tak jak zostało to przedstawione na **rysunku 2** [5]. Met wchodząc w reakcję z ATP aktywuje atom siarki w swojej cząsteczce, co prowadzi do powstania S-adenosylometioniny (SAM), przy udziale również enzymu syntazy S-adenosylometioninowej. W wyniku enzymatycznego przeniesienia grupy

metylowej do akceptora (RNA, DNA, białka i lipidy) przez metylotransferazę, SAM jest przekształcana do S-adenozylhomocysteiny (SAH) [6, 7]. Następnie w wyniku enzymatycznej reakcji hydrolizy SAH przez enzym hydrolazy S-adenozylhomocysteinowej, powstaje Hcy. W ten sposób metabolicznie otrzymana Hcy jest przekształcana na drodze dwóch szlaków. Pierwszym z nich jest powrotna remetylacja do metioniny, zaś drugim jest katabolizm Hcy do Cys na drodze transsulfuracji [8]. Proces remetylacji może zachodzić na dwa sposoby. Pierwszy, gdy cząsteczka Hcy otrzymuje grupę metylową przy udziale enzymu syntazy metioninowej (SMet), w obecności witaminy B₁₂ jako kofaktora, w wyniku reakcji konwersji 5-metylo-tetrafolianu do tetrafolianu. Natomiast drugi rodzaj remetylacji polega na dołączeniu grupy metylowej do Hcy katalizowanej przez metylotransferazę homocysteinową przy udziale betainy jako donora grupy metylowej [9]. Z kolei w szlaku transsulfuracji, Hcy najpierw ulega kondensacji z seryną w obecności β-syntazy cystationinowej (CBS), w wyniku czego otrzymywana jest cystationina (połączenie homocysteiny oraz seryny) jako produkt pośredni, a następnie przez działanie γ-liazy cystationinowej zachodzi przeniesienie grupy sulfhydrylowej z części homocysteinowej w cystationinie na część serynową, w wyniku czego powstaje w ten sposób cysteina. Proces transsulfuracji wymaga obecności witaminy B₆ jako kofaktora reakcji enzymatycznych [8, 9].

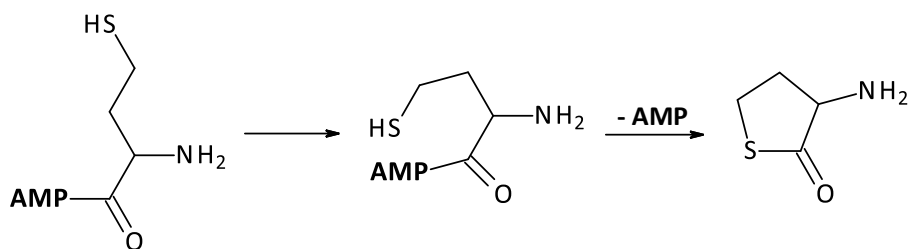
Homocysteina – prekursor tiolaktonu homocysteiny

W metabolizmie wszystkich organizmów żywych część Hcy jest przekształcana w tiolakton homocysteiny (HTL). Przekształcenie to następuje w wyniku tzw. błędnej reakcji edycji, kiedy to niebiałkowa Hcy, strukturalnie bardzo podobna do Met (na **rysunku 2** przedstawione są wzory strukturalne cząsteczek Met i Hcy), jest wyłapywana przez syntetazy aminoacylo-tRNA (AARS) zamiast Met podczas biosyntezy białek [10, 11]. W związku z tym, Hcy bierze udział w pierwszym etapie biosyntezy białek, kiedy to jej cząsteczka łączy się z adenozynotrójfosforanem (ATP) tworząc adenylan Hcy (Hcy-AMP), przy udziale syntetaz metionilo-, leucylo-, lub izoleucylo-tRNA, które to należą do grupy enzymów aktywujących AARS, z wydzielaniem pirofosforanu (PP_i), zgodnie z poniższym równaniem/schematem.



Pomimo tego, błędnie zaktywowana cząsteczka Hcy nie jest transportowana do tRNA, dzięki temu nie wchodzi do kodu genetycznego odpowiedzialnego za biosyntezę białek. Zamiast tego cząsteczka Hcy-AMP ulega wewnątrzcząsteczkowej reakcji edycji przez AARS w wyniku

czego Hcy ulega cyklizacji do pierścienia tiolaktonu homocysteiny (HTL) z uwolnieniem AMP, co schematycznie przedstawiono na **rysunku 3** [12].



Rys. 3. Reakcja edycji Hcy do HTL.

Biosynteza HTL jest niepożądana, ponieważ HTL wykazuje szkodliwe działanie w żywych organizmach. Mimo wszystko powstawanie tego związku z homocysteiny jest ściśle związane z nadmiernym spożywaniem Met wraz z pokarmem (głównie mięso), niedoborem witamin B₆ i B₁₂ oraz folianów w diecie lub uwarunkowanym mutacją genetyczną defektem aktywności enzymów CBS, SMet lub reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR) [13-15]. Jednakże po wytworzeniu, HTL może być w dalszej kolejności metabolizowany w celu zneutralizowania jego toksycznego mechanizmu aktywności jakim jest homocysteinylacja białek. Ponieważ HTL jest wewnątrzcząsteczkowym tioestrem, zjawisko to polega na hydrolizie wiązania wewnątrzestrowego, w wyniku czego zostaje otworzony pierścień HTL otrzymując w ten sposób cząsteczkę Hcy. Reakcja ta jest katalizowana przez wewnątrzkomórkową tiolaktonazę homocysteiny, znaną lepiej jako hydrolazę bleomycyny [16], oraz zewnątrzkomórkową paraoksonazę 1 [17].

Homocysteina – choroby cywilizacyjne

Badania kliniczne prowadzone od wielu lat wyraźnie wskazują na związek przyczynowo skutkowy pomiędzy zaburzeniami metabolizmu Hcy a rozwojem chorób cywilizacyjnych. Powszechnie wiadomo, że enzymatyczna synteza Hcy i jej obecność w komórkach jest zjawiskiem fizjologicznym [1]. Aczkolwiek gdy stężenie Hcy w organizmie człowieka jest podwyższone, to może być to związane z niektórymi chorobami i jest znaczącym predyktorem śmiertelności pacjentów oraz ma szkodliwy wpływ na ludzkie zdrowie [1, 18, 19]. Zaburzenie metabolizmu Hcy jest głównie spowodowane genetycznym niedoborem enzymu CBS, a także MTHFR oraz SMet, których niedobór może spowodować 20-krotny wzrost stężenia Hcy. Z powodu tych wad genetycznych Hcy nie może być przekształcana w Met czy w Cys lub przekształcanie to jest znacząco zahamowane [13, 20]. Lecz nie tylko to jest przyczyną zwiększonej ilości Hcy gromadzonej w organizmie człowieka. Również styl życia, starzenie oraz przyjmowanie niektórych leków, takich jak azarybina, metotreksat, podtlenek azotu, leki

przeciwdrgawkowe i moczopędne, negatywnie wpływają na aktywność powyższych enzymów biorących udział w przemianie Hcy. Ponadto palenie tytoniu, picie alkoholu i kawy również powoduje zwiększenie poziomu Hcy w organizmie [21-23]. Zgodnie z przedstawionym szlakiem metabolicznym Met, witaminy B₆ i B₁₂ są ważnymi kofaktorami współpracującymi z enzymami metabolizującymi Hcy. Niewłaściwe nawyki żywieniowe oraz niedobór tych witamin w pożywieniu prowadzą do podwyższenia poziomu Hcy w organizmie człowieka [14, 24]. Przeprowadzone badania nad przyczyną podwyższonej zawartości Hcy w organizmie człowieka sugerują związek przyczynowo skutkowy z rozwojem nowotworów, chorób układu krążenia i neurodegeneracyjnych [25-28]. U zdrowego człowieka stężenie Hcy powinno mieścić się w zakresie 5 - 15 nmol/mL osocza, a przekroczenie dopuszczalnego stężenia tego tiolu w osoczu określane jest hiperhomocysteinemią (HHcy) [15]. Ponadto w zależności od poziomu przekroczenia dopuszczalnej wartości, wyróżnia się umiarkowaną, pośrednią i ciężką HHcy, gdzie:

- w postaci umiarkowanej – średnie stężenie Hcy wynosi od 15 do 30 $\mu\text{mol/L}$ osocza,
- w postaci pośredniej – średnie stężenie Hcy w osoczu wynosi 31 - 100 $\mu\text{mol/L}$,
- w postaci ciężkiej – średnie stężenie Hcy w osoczu wynosi powyżej 100 $\mu\text{mol/L}$.

Ciężka postać HHcy jest nazywana homocystynurią [29]. U pacjentów z chorobą nowotworową HHcy spowodowana jest ograniczoną zdolnością remetylacji Hcy, głównie z powodu diety ubogiej w foliany oraz witaminy z grupy B. Oznacza to, że podczas rozwoju choroby nowotworowej stężenie Hcy w osoczu może wzrastać [30-32]. Podwyższone stężenie Hcy w osoczu jest przede wszystkim powiązane z rozwojem chorób układu krążenia (choroby niedokrwiennej serca, chorób naczyń obwodowych, zawału mięśnia sercowego, chorób zakrzepowo-zatorowych) oraz układu nerwowego (choroby Alzheimera, demencji) [33, 34]. Związek ten powoduje dysfunkcję śródbłonna naczyń krwionośnych przez obecną w jego cząsteczce grupę sulfhydrylową, co jest powiązane ze zwiększeniem stresu oksydacyjnego oraz nasileniem się utleniania lipoprotein o małej gęstości, w wyniku czego następuje uszkodzenie ścian tętnic i żył. W konsekwencji obserwuje się akumulację cholesterolu na ścianach naczyń i rozwój miażdżycy [35]. Uszkodzenie ścian naczyń krwionośnych niesie ze sobą inne ryzyko, które polega na zwiększonej agregacji i adhezji płytek krwi do ściany naczynia, w wyniku czego następuje aktywacja procesu krzepnięcia powodując zator żył i tętnic [36]. Z kolei związek pomiędzy nadmiernym stężeniem Hcy a chorobami układu nerwowego nie jest do końca poznany. W wielu badaniach wykazano, że podwyższony poziom Hcy w osoczu sprzyja procesom powodującym uszkodzenie komórek nerwowych poprzez nadmierne pobudzenie komórek

w wyniku wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Procesy te są głównie związane z takimi uszkodzeniami mózgu, które występują w demencji oraz chorobach Parkinson'a i Alzheimer'a [37, 38].

W Stanach Zjednoczonych śmiertelność z powodu choroby niedokrwiennej serca osiągnęła szczytowy poziom 560 zgonów na 100 000 mieszkańców w 1958 r. Następnie śmiertelność z powodu choroby niedokrwiennej serca stale spadała do 180 zgonów na 100 000 w 2010 r., co stanowi imponujący spadek o 68% w ciągu 52 lat. W tym samym okresie, spadek śmiertelności z powodu udaru był jeszcze bardziej znaczny, zmniejszając się ze 180 zgonów na 100 000 mieszkańców w 1958 r. do 40 zgonów na 100 000 w 2010 r., co oznacza zmniejszenie śmiertelności z powodu udaru aż o 79%. W 1978 r. spadek umieralności z powodu chorób wieńcowych w Stanach Zjednoczonych był już ewidentny, a National Institutes of Health zwołały ogólnokrajową konferencję w celu ustalenia przyczyn spadku w ostatnich 20 latach [39]. Panele ekspertów z danej dziedziny stwierdziły, że istnieją korzystne trendy w rzucaniu palenia, zwiększenia ilości osób wykonujących ćwiczenia fizyczne, zwiększenia ilości oraz skuteczności leczenia w oddziałach opieki wieńcowej poprzez wykonywanie operacji pomostowania tętnic wieńcowych, terapii nadciśnienia tętniczego i 5% obniżenia poziomu cholesterolu we krwi. Jednakże wzrosło spożycie tłuszczu i mięsa oraz udokumentowano zwiększoną częstość występowania otyłości. Kończącym wnioskiem konferencji było to, że „choć panowało ogólne przekonanie, że spadek liczby chorób wieńcowych jest rzeczywisty, nie można było określić prawdopodobnej przyczyny ani przyczyn”. Konferencja zakończyła się, zanim w latach osiemdziesiątych zaczęto szeroko stosować leki obniżające poziom cholesterolu. Odpowiedź na pytanie, dlaczego śmiertelność z powodu chorób wieńcowych spadła w Stanach Zjednoczonych w latach 1958 - 1978, wiąże się ze wzrostem witaminy B6 (fosforan pirydoksalu) i witaminy B9 (kwas foliowy) w diecie. Niedobory tych dwóch witamin powodują podwyższenie stężenia Hcy we krwi, z powodu niewystarczającej konwersji tego produktu przejściowego do cystationiny, katalizowanej przez fosforan pirydoksalu oraz z powodu niedostatecznej remetylacji Hcy do Met, katalizowanej przez metyloctetrahydrofolian i metylokobalaminę. Różne metody przetwarzania żywności, takie jak podgrzewanie, dodatki chemiczne, ekstrakcja węglowodanów i olejów z całej żywności oraz mielenie ziaren, powodują duże straty wyżej wspomnianych witamin, a także znaczne straty minerałów śladowych i innych witamin [40]. Zwiększone spożycie wysoko przetworzonej żywności na początku XX wieku mogło przyczynić się do gwałtownego wzrostu śmiertelności z powodu choroby niedokrwiennej serca w latach czterdziestych i pięćdziesiątych XX wieku. W 1993 roku przełomowe badanie uczestników Framingham Heart Study w wieku od 67 do 96 lat wykazało poważne niedobory pirydoksalu i kwasu

foliowego w diecie oraz zmniejszone wchłanianie witaminy B12 (kobalaminy), co prowadzi do podwyższenia poziomu Hcy we krwi [41]. Zwiększone spożycie pirydoksalu i kwasu foliowego w wyniku wzbogacenia pożywienia o te witaminy jest wyjaśnieniem spadku śmiertelności wywołanej chorobą wieńcową serca w Stanach Zjednoczonych od lat pięćdziesiątych XX wieku. Dzielne spożycie witaminy B6 było bardzo niskie przed 1958 r. i wynosiło 0,04 mg/dobę w 1944 r. oraz 0,23 mg/dobę w 1955 r. [42]. Z kolei po 1961 r. nastąpił wzrost dzielnego spożycia witaminy B6 przez ludzi do 0,53 mg/dobę, a w latach 60 i 70 XX wieku jej spożycie wzrosło odpowiednio do 2,5 i 3,5 mg/dobę, dostarczając większe niż zalecane dzielnne dawki tej witaminy. Kwas foliowy, który jest prekursorem witaminy B9, był również dostarczany wraz z dietą w formie dobrowolnej suplementacji począwszy od lat 60 XX wieku. W 1998 roku Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków zaleciła wzbogacenie przetworzonej żywności zbożowej kwasem foliowym. W 1999 roku na podstawie przeprowadzonych badań uczestników Framingham Heart Study stwierdzono, że poziom folianów w osoczu podwoiły się po wzbogaceniu pokarmów zbożowych witaminą B9, a poziom Hcy w osoczu spadł o 15% [43]. Średnie stężenie Hcy w osoczu uczestników Framingham Heart Study zmniejszyło się z 10,1 $\mu\text{mol/L}$ przed suplementacją do 9,4 $\mu\text{mol/L}$ po wprowadzeniu suplementacji, a częstość występowania wysokiego poziomu Hcy, powyżej 13 $\mu\text{mol/L}$, zmniejszyła się z 18,7% do 9,8% [44]. Na podstawie powyższej analizy stwierdzono, że spadek umieralności z powodu chorób wieńcowych od 1958 r. można częściowo przypisać zastosowaniu suplementacji pirydoksyną i kwasem foliowym [45]. Na poparcie tego wniosku, podczas badań przeprowadzonych w Stanach Zjednoczonych i Kanadzie zaobserwowano przyspieszony spadek śmiertelności wywołanej udarem mózgu, począwszy od 1998 r., kiedy to w tych krajach obowiązywał nakaz wzbogacania pokarmu kwasem foliowym. Z kolei w Wielkiej Brytanii, w której brak było suplementacji pokarmów, taka zmiana w śmiertelności z powodu udaru nie została zauważona [46].

Po odkryciu homocystynurii w 1962 roku, zauważono, że wielu dotkniętych nią pacjentów miało wyraźne cechy przyspieszonego starzenia. Choroby układu sercowo-naczyniowego, takie jak choroba wieńcowa, udar, zakrzepica głównych tętnic i żył oraz choroba naczyń obwodowych, są główną przyczyną zgonów w ogólnoswiatowym badaniu przypadków homocystynurii [47]. Wraz z opracowaniem metod pozwalających na wykrycie oraz oznaczenie Hcy w osoczu, przeprowadzono badania, które ujawniły, że zawartość tego aminokwasu stopniowo rośnie wraz z wiekiem. Zawartość Hcy w osoczu noworodków i małych dzieci mieści się w zakresie od 3 do 6 $\mu\text{mol/L}$, u młodzieży 5 - 8 $\mu\text{mol/L}$, u osób dorosłych w młodym i średnim wieku od 5 do 13 $\mu\text{mol/L}$, natomiast u osób powyżej 65 roku życia zakres ten wynosi od 10 do

18 $\mu\text{mol/L}$ a u stulatków od 25 do 27 $\mu\text{mol/L}$ [48]. Przyczynami postępującego wzrostu poziomu Hcy we krwi wraz z wiekiem jest niedostateczna ilość spożywanych witamin B6 i B9 w diecie oraz niewystarczające wchłanianie witaminy B12 [41], a co za tym idzie wyczerpywanie się tych witamin w organizmie [40].

Toksykologia tiolaktonu homocysteiny

Jak już wspomniano w **podrozdziale 1.2 – Homocysteina – prekursor tiolaktonu homocysteiny**, Hcy jest prekursorem innego cytotoksycznego związku chemicznego, który ma znaczący wpływ na zdrowie człowieka. Związek ten to HTL, który jest metabolicznie powiązany z Hcy ze względu na jego przemianę enzymatyczną. Na początku mechanizm tworzenia HTL polega na usuwaniu Hcy do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, głównie do osocza, w przypadku, gdy zdolność metaboliczna komórki jest nasycona, tzn. więcej Hcy jest produkowane niż metabolizowane przez CBS i MTHFR. Następnie, część Hcy ulega konwersji do HTL przez AARS, która omyłkowo wychwytuje Hcy zamiast Met podczas tzw. błędnej reakcji edycji z wykorzystaniem ATP [49]. W związku z powyższym można wykorzystać obecność HTL jako pochodnej Hcy, do obserwowania i kontrolowania negatywnego wpływu Hcy na zdrowie organizmu, gdyż stężenie HTL wzrasta wraz ze zwiększaniem się metabolicznej syntezy Hcy w organizmie człowieka [44].

Zanim zostanie omówiony wpływ HTL na zdrowie człowieka, poniżej przedstawione są jego właściwości fizykochemiczne. Poza organizmem związek ten najczęściej jest syntezowany w postaci chlorowodoru, który występuje ostatecznie w postaci białego, bezzapachowego proszku i jest stabilny w temperaturze pokojowej, natomiast w roztworach wodnych w warunkach fizjologicznych, tj. takich, gdzie pH wynosi ok. 7,4 a temperatura 37 °C, okres półtrwania tego wewnątrzcząsteczkowego tioestru wynosi ok. 25 godzin [50]. Zjawisko hydrolizy w wyniku której powstaje Hcy, zachodzi znacznie szybciej w bardziej zasadowych roztworach. Poddając HTL działaniu silnego kwasu, otrzymuje się stabilną, zjonizowaną, rozpuszczalną w wodzie sól. Zauważono, że działając na HTL kwasem chlorowym(V) nie ulega on utlenieniu, lecz tworzy trwałą sól chloranową, która jest rozpuszczalna w mieszaninie chloroform-metanol lub w etanolu [51, 52]. O niezwykłej reaktywności chemicznej HTL świadczy analiza produktów reakcji słabej zasady z jego solą chlorowodorową. W tych warunkach utlenianie nie daje homocystyny, lecz otrzymuje się amorficzną substancję polimerową o wysokiej temperaturze topnienia, której właściwości rozpuszczalności są podobne do keratyny [53]. Jeśli natomiast chlorowodorek HTL jest poddany ekstrakcji w obecności dichlorometanu, niezjonizowana wolna zasada HTL jest ekstrahowana do warstwy organicznej, którą można wyizolować poprzez wysuszenie oraz odparowanie dichlorometanu. W wyniku tej czynności otrzymuje się bezbarwny,

lepki olej, który jest dobrze rozpuszczalny zarówno w wodzie, jak i rozpuszczalnikach organicznych. Olej ma ostry, siarkowy, rybi zapach. Po odstawieniu na godzinę w obecności powietrza w temperaturze pokojowej olej spontanicznie tworzy nierozpuszczalną białą substancję stałą [54]. Należy również wspomnieć o jego istotnej właściwości fizykochemicznej, którą jest wartość współczynnika ujemnego logarytmu dziesiętnego stałej dysocjacji kwasowej (pK_a) wynosząca 6,67 [1], co jest ważne z punktu widzenia żywej komórki, ponieważ w warunkach fizjologicznych HTL występuje w postaci niejonizowanej, dzięki czemu związek ten jest kumulowany w przestrzeni pozakomórkowej, czyli przedostaje się do krwi i jest selektywnie wychwytywany przez nerki, a następnie usuwany wraz z moczem [55].

Wpływ HTL na funkcje biologiczne zdrowych komórek i tkanek zbadano analizując zmiany histopatologiczne u zwierząt doświadczalnych. Wstrzyknięcie tej substancji myszom drogą dootrzewną i domięśniową jest wyjątkowo toksyczne dla tych zwierząt, ponieważ spowodowało szybką i wysoką śmiertelność dla dawki od 0,2 do 2,0 mg/g masy ciała. Wolna zasada HTL powoduje intensywną martwicę tkanek w miejscu wstrzyknięcia oraz w obrębie wątroby, nerek i innych narządów, prowadząc do śmierci z powodu zapalenia otrzewnej, krwotoku i wewnątrznaczyniowych zakrzepów fibrynowych. U osobników, które przeżyły wstrzyknięcie domięśniowe, HTL wytwarza obszary martwicy tkanek otoczone zwłóknieniem, ostrym i przewlekłym stanem zapalnym angiogenezy, powstawaniem ziarninowania, przerostem nerwów oraz tworzeniem metaplastycznego nabłonka płaskiego z hiperkeratozą. Miejscowe stosowanie wolnej zasady homocysteiny w postaci tiolaktonu na ogoloną skórę nie jest szczególnie toksyczne, ale po przeprowadzeniu eksperymentu zaobserwowano owrzodzenie, zwłóknienie, ostre i przewlekłe zapalenie, angiogenezę, hiperkeratozę, dysplazję oraz rozwój mikroinwazyjnego raka płaskonabłonkowego. Badanie to pokazuje, że tiolakton homocysteiny sprzyja tworzeniu się keratyny przez nabłonek płaskonabłonkowy, zaburza procesy komórkowe niezbędne do przeżycia, powoduje dysplazję nabłonka, rozrost zrębu, a także wewnątrznaczyniowe skrzepy i ma działanie rakotwórcze [56]. Angiogeną, desmoplastyczną reakcją zapalną otaczającą nowotwory złośliwe oraz zwiększoną skłonność do powstawania skrzepin u chorych na raka można tłumaczyć wpływem nadmiaru HTL wytwarzanego przez komórki nowotworowe otaczające tkanki łączne oraz agregację płytek krwi [56, 57].

Homocysteina jest powszechnie uznawana za czynnik ryzyka rozwoju miażdżycy tętnic wieńcowych, mózgowych i obwodowych. Uważa się, że czynniki etiologiczne wywołujące miażdżycę tętnic, takie jak: palenie papierosów, spożywanie alkoholu, czy nieodpowiednia dieta, zwiększają konwersję Met do Hcy, która jest następnie przekształcana w HTL, czyli cykliczny wewnątrzcząsteczkowy tioester. Zwiększona synteza HTL towarzyszy chorobom zwyrodnienie-

niowymi. Badając przyczynę rozwoju miażdżycy tętnic stwierdzono wysokie stężenie tego związku w płynach ustrojowych, co więcej w komórkach nowotworowych zauważono podwyższoną wewnątrzkomórkową produkcję HTL. Ta reaktywna forma Hcy reaguje z wolnymi grupami aminowymi lipoprotein o małej gęstości (LDL), powodując agregację i zwiększoną podatność na wytrącanie i wychwytywanie homocysteinyłowanego LDL, co wyjaśnia odkładanie się tych lipidów w blaszkach miażdżycowych [58-60]. W układzie krwionośnym człowieka homocysteinyłowane agregaty LDL ulegają fagocytozie przez makrofagi, w wyniku czego tworzą się komórki piankowate. Za czynnik inicjujący powstawanie blaszek miażdżycowych uważa się właśnie komórki piankowate. Następnie HTL, uwalniany z homocysteinyłowanego LDL w ścianie naczyniowej, sprzyja uszkodzeniu błony wewnętrznej, utlenianiu cholesterolu i nienasyconych lipidów, agregacji płytek krwi, czynnikom zakrzepowym, przerosłowi błony wewnętrznej mięśnia sercowego, zwłóknieniu i zwapnieniu blaszek miażdżycowych [61]. Powiązanie zmian miażdżycowych z HHcy spowodowaną różnymi dziedzicznymi zaburzeniami metabolizmu homocysteiny jest kluczowym związkiem przyczynowo-skutkowym, który doprowadził do powstania homocysteinowej teorii miażdżycy [42, 62, 63]. Od czasu odkrycia tej teorii, miażdżycowy wpływ akumulacji homocysteiny został ustalony na podstawie kilku badań. U zwierząt poddanych eksperymentom wywołano HHcy, a następnie po przeprowadzonych obserwacjach stwierdzono u tych zwierząt zmiany miażdżycowe podobne do tych obserwowanych u osób ze zmianami miażdżycowymi naczyń krwionośnych [42]. Badanie pacjentów z chorobą miażdżycową tętnic mózgowych, wieńcowych i obwodowych wykazało podwyższony poziom homocysteiny we krwi w porównaniu z grupą kontrolną, u której nie występowała ta choroba [64]. Nieprawidłowości hormonalne wywołane niedoczynnością tarczycy, czy przyjmowaniem doustnych środków antykoncepcyjnych, a także przewlekła niewydolność nerek, są również czynnikami podwyższającymi poziom Hcy we krwi [65]. W badaniu pacjentów płci męskiej wykazano, że HHcy wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zawału mięśnia sercowego [66]. Obecnie HHcy jest ogólnie uznawana jako niezależny czynnik ryzyka choroby wieńcowej serca i innych postaci chorób naczyń krwionośnych [29, 67].

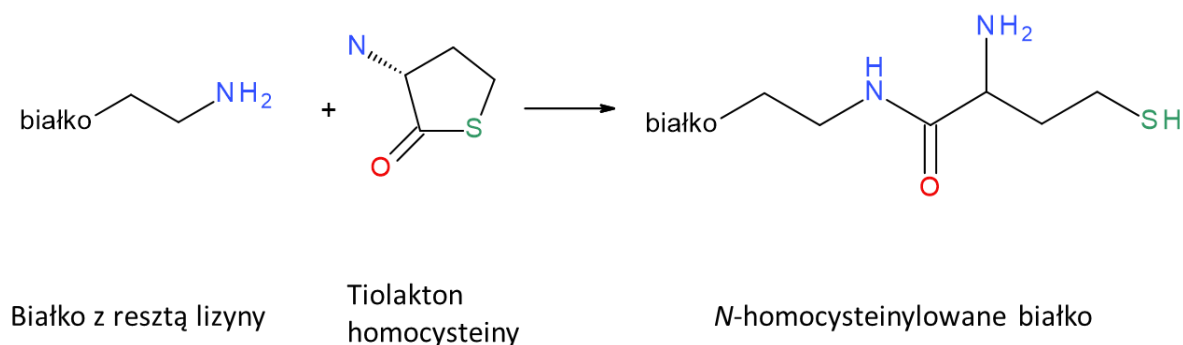
Po odkryciu ważnych aminokwasów siarkowych, tj. Met, Hcy i jej pochodnej, czyli HTL na początku XX wieku, wykazano, że Hcy jest kluczowym związkiem pośrednim w metabolizmie Met, reakcjach transmetylacji i konwersji Met do cystationiny i Cys na drodze transsulfuracji [68]. Niewiele jednak było wiadomo o znaczeniu Hcy w rozwoju chorób człowieka do 1962 r., kiedy to kilku pacjentów z upośledzeniem umysłowym, osteoporozą oraz zakrzepicą żylną i tętniczą wydalalo homocysteinę wraz z moczem w dużych stężeniach [69]. Stwierdzono, że uwarunkowane genetycznie niedobory trzech enzymów metabolizmu Met i Hcy, tj. CBS,

MTHFR i SMet powodują wydalanie takiej ilości Hcy wraz z moczem w przypadkach homocystynurii [70-72]. Obserwacja blaszek miażdżycowych u pacjentów z homocystynurią spowodowaną niedoborami któregoś z powyższych trzech enzymów doprowadziła badaczy do wniosku, że Hcy jest czynnikiem powodującym rozwój miażdżycy, poprzez bezpośredni wpływ tego aminokwasu na ściany tętnic. Ponieważ podwyższenie poziomu Hcy we krwi było częstym czynnikiem rozwoju miażdżycy, wyciągnięto wniosek, że ten niebiałkowy aminokwas powoduje powstawanie blaszek tętnicznych przez bezpośredni wpływ na komórki budujące ściany tętnic [62, 72, 73].

W 1974 r. przeprowadzono badanie wpływu zastąpienia Met przez Hcy na rozwój komórek nowotworowych względem normalnych komórek w hodowli. Eksperyment ten wykazał, że komórki nowotworowe wymagają Met do wzrostu w pożywce hodowlanej zawierającej Hcy, kobalaminę i kwas foliowy, w przeciwieństwie do normalnych komórek, które mogą rosnąć w tej pożywce bez dodatku Met [74]. W doświadczeniach z hodowlami komórek złośliwych HTL znakowany promieniotwórczym izotopem siarki S³⁵, wnikał w strukturę białek poprzez wytworzenie wiązania peptydowego z grupami aminowymi białek, podczas gdy takiego wiązania nie zaobserwowano w hodowli normalnych komórek [75]. Okrycie wiązania się HTL z białkami komórek złośliwych przeprowadzono poprzez wykrycie znakowanego HTL dzięki poniższemu eksperymentowi. W pierwszej kolejności przeprowadzono wytrącenie białka uzyskanego z homogenatów złośliwych kultur komórkowych poprzez poddanie działaniu białka gorącym kwasem trichlorooctowym. Następnie przeprowadzono proteolityczną hydrolizę enzymatyczną i hydrolizę alkaliczną, które powodowały przejście związanego HTL do roztworu. Następnie przeprowadzono analizę chromatograficzną otrzymanego hydrolizatu kultur komórkowych. Na podstawie otrzymanych wyników analizy wykryto HTL znakowany promieniotwórczą siarką. Wyniki te pozwoliły ustalić, że HTL bierze udział w reakcji z wolnymi grupami aminowymi białek komórek złośliwych poprzez wiązanie peptydowe w procesie zwanym homocysteinylacją [58]. Na podstawie otrzymanych wyników eksperymentów stwierdzono, że tiolacja makrocząstek takich jak: białka, kwasy nukleinowe i glikozaminoglikany przez HTL jest bardziej preferowana w komórkach złośliwych, niż w komórkach prawidłowych [75]. Potwierdzeniem na gromadzenie się HTL w komórkach nowotworów złośliwych jest wykazanie niewielkich ilości pochodnej Hcy w komórkach nowotworów złośliwych pobranych od pacjentów [76]. Homocysteinylacja białek błon komórkowych i glikozaminoglikanów poprzez nadmierną akumulację HTL może być odpowiedzialna za rozległe nieprawidłowości w funkcjonowaniu błony komórkowej, takie jak zwiększony ładunek ujemny, reaktywność immunologiczną z powodu tiolowanych antygenów i zmienioną funkcję mitochondriów [77].

Homocysteinyłacja białek

We wczesnych badaniach Hcy wykryto w osoczu i moczu pacjentów z niedoborem CBS lub MTHFR [78, 79], ale jej obecność nie była obserwowana u osób zdrowych. Zaskakująca w tych badaniach była niemożność wykrycia Hcy w tkankach pacjentów z niedoborem CBS lub MTHFR [73, 80]. N-homocysteinyłacja białka została po raz pierwszy odkryta w badaniach metabolizmu HTL w hodowli komórek człowieka. Badania te wykazały, że fibroblasty pobrane od pacjentów z niedoborem CBS oraz komórki po transformacji nowotworowej od pacjentek z rakiem piersi, produkują więcej HTL i N-homocysteinyłowanych białek niż komórki zdrowych osób [50]. Mechanizm biologiczny N-homocysteinyłacji obejmuje dwa etapy. Pierwszy obejmuje biosyntezę HTL, gdzie cząsteczka Hcy zostaje zaktywowana przez syntetazę metionynylo-tRNA, która następnie łączy się z ATP. Następnie dochodzi do cyklizacji Hcy do pierścienia HTL poprzez odłączenie AMP, w wyniku czego powstaje wewnątrzcząsteczkowy tioester HTL (równanie 1 i rysunek 3). To wysokoenergetyczne wiązanie tioestrowe jest odpowiedzialne za reaktywność chemiczną HTL wobec grup aminowych w białkach. W drugim etapie HTL reaguje z resztami białkowymi, dając białka N-Hcy (rysunek 4) [50, 81, 82].



Rys. 4. N-homocysteinyłacja białka przez tiolakton homocysteiny.

Proces N-homocysteinyłowania białek niesie ze sobą wiele niekorzystnych konsekwencji. Jedną z nich jest to, że białka N-Hcy mają skłonność do agregacji i wytrącania z roztworów [60, 81-83], co może indukować śmierć komórek, ponieważ białka, w tym ważne enzymy biorące udział w procesach życiowych, zostają zdezaktywowane [84]. Kolejne badania wykazały, że agregacja białek wywołana przez N-homocysteinyłację obejmuje amyloidowe przekształcanie białek o strukturze głównie helikalnej, takich jak albumina [85].

2. Przegląd metod oznaczania tiolaktonu homocysteiny

Literatura zawierająca procedury oznaczania HTL jest niezbyt obszerna i liczy 18 publikacji naukowych. Opisywane w nich metody dotyczą oznaczania tego związku chemicznego w różnych matrycach:

- płynach ustrojowych człowieka, takich jak mocz, osocze, ślina,
- komórkach bakterii, drożdży, człowieka,
- mieszaninie reakcyjnej.

Jednak cztery ze wszystkich metod [86-89], nie zawierały w sobie żadnych danych dotyczących wyznaczania któregoś z parametrów walidacyjnych, dlatego ich nie opisano. Natomiast pozostałe metody przedstawiono w taki sposób, aby scharakteryzować je pod kątem sposobu pobierania oraz przygotowania próbki do analizy, rodzaju zastosowanej techniki analitycznej (chromatografia, elektroforeza lub analiza przepływowa) oraz warunków prowadzenia analizy daną techniką, a także zakresu liniowości, wartości precyzji i dokładności oraz wartości granic wykrywalności i oznaczalności.

2.1. Metoda analizy przepływowej

Pierwsza metoda wykorzystująca technikę analizy przepływowej była zaproponowana do jednoczesnego oznaczania HTL i Hcy w moczu człowieka [90]. Oznaczanie HTL polegało na rozcieńczeniu 50 μL moczu poprzez dodanie 450 μL wody i 500 μL roztworu zawierającego zawiesinę nanocząstek złota modyfikowanych fluorowanymi środkami powierzchniowymi. Otrzymaną mieszaninę pozostawiono na 20 min w temperaturze pokojowej w celu adsorpcji na powierzchni nanocząstek Hcy obecnej w moczu. Następnie nanocząstki oddzielono od roztworu poprzez odwirowanie przy 18000 obr./min przez 20 min. Do analizy przepływowej wykorzystano klarowny roztwór. Aparatura do wykonania analizy przepływowej składała się z pompy perystaltycznej, 10-kanalowego zaworu, przepływowego detektora spektrofluorymetrycznego pracujący z wysoką czułością. Teflonowe rurki stanowiły przyłącza przepływowe (średnica wewnętrzna 0,5 lub 0,7 mm), z wyjątkiem przyłącza zastosowanego w pompie perystaltycznej, które wykonane było z rurek termoplastycznych. Rurkę reakcyjną o długości 100 cm i 0,5 mm średnicy wewnętrznej ciasno owinięto wokół metalowego pręta (długość: 10 cm, średnica: 4,6 mm) i termostatowano do żądanej temperatury (z dokładnością do 0,1°C), stosując termostat kolumny od chromatografu cieczowego. Procedura oznaczania HTL składała się z następujących kroków: 50 μl OPA o stężeniu 10 mmol/l, 50 μl NaOH o stężeniu 1 mol/l i 150 μl próbki wprowadzono w tej kolejności do pętli magazynującej przez odpowiednie porty zaworu wielokanalowego. W następnym kroku przepływ odwrócono, w wyniku czego poszczególne strefy zostały wprowadzone do rurki reakcyjnej z szybkością przepływu 0,6 ml/min. W rurce następuje najpierw reakcja hydrolizy HTL do Hcy, a zaraz potem reakcja derywatywacji utworzonej Hcy z OPA. Detekcja utworzonej pochodnej zachodziła przy stosowaniu długości fali wzbudzenia wynoszącej 370 nm, rejestrując emisję promieniowania przy długości fali

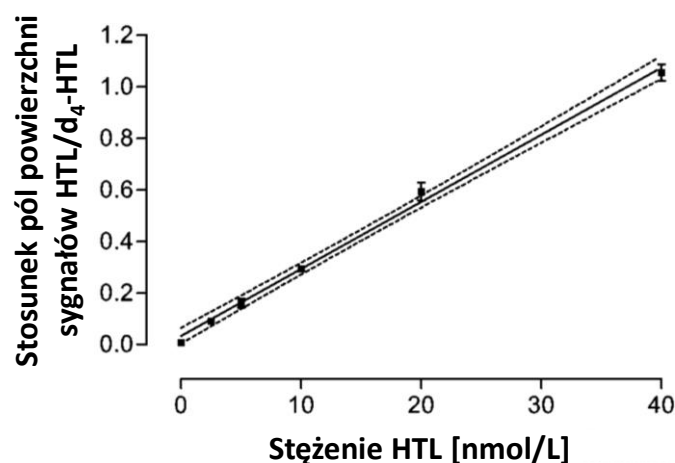
480 nm. Walidacja prezentowanej metody obejmowała kalibrację, wyznaczenie LOD i LOQ oraz precyzji. Kalibracja obejmowała zakres stężeń HTL od 2 do 30 $\mu\text{mol/L}$ moczu. Otrzymana krzywa kalibracyjna wykazała charakter linowy w badanym zakresie stężeń, a jej równanie miało postać $y = 29,12 \cdot x + 1,24$, natomiast współczynnik korelacji R wynosił 0,998. Wartość LOD dla HTL, obliczona na podstawie odchylenia standardowego nachylenia prostej kalibracyjnej, wyniosła 0,6 $\mu\text{mol/L}$ moczu, zaś jako LOQ przyjęto stężenie 2 $\mu\text{mol/L}$ moczu (najniższy poziom stężenia na krzywej kalibracyjnej). Precyzję wewnątrzdnioową wyznaczono poprzez przygotowanie dwóch serii 8 próbek moczu. Dla pierwszej serii zawartość HTL wynosiła 2 $\mu\text{mol/L}$, zaś dla drugiej 10 $\mu\text{mol/L}$. Wartości RSD wyrażonego w procentach dla obydwu serii mieściły się w przedziale od 1,1 do 2,4%. Precyzję międziodniową wyznaczono poprzez obliczenie względnego odchylenia standardowego dla wartości współczynnika kierunkowego prostej dla krzywych kalibracyjnych przygotowanych w ciągu sześciu nienastępujących po sobie dni. Na podstawie wyników eksperymentów wartość precyzji międziodniowej wyniosła 5,9%.

2.2. Metody chromatograficzne

Chromatografia gazowa:

Jedną z pierwszych metod wykorzystujących chromatografię gazową była przeznaczona do oznaczania HTL w osoczu [91]. W procedurze oznaczania wykorzystano ekstrakcję do fazy stałej (SPE) jako element przygotowania próbki, derywatyzację analitu za pomocą bezwodnika heptafluorobutanowego (HFBA) oraz separację za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas. Osocze pozyskiwano z pełnej krwi pobranej do próbek zawierających EDTA (jako odczynnik antykoagulujący). Próbkę osocza przygotowano w następujący sposób. Do jednorazowej borokrzemowej próbki dodano 200 μL osocza i 10 μL roztworu deuterowanego HTL (d_4 -HTL) o stężeniu 5 $\mu\text{mol/L}$ jako standardu wewnętrznego. Mieszaninę wymieszano i odwirowano przez 60 s. Następnie próbkę odbiałczano przez dodanie 1 mL acetonitrylu (ACN) po czym ponownie odwirowano przy $1000 \times g$ przez 5 min. Roztwór supernatantu przeniesiono do nowej próbki borokrzemowej i odparowano rozpuszczalnik w 40 °C w atmosferze azotu. Pozostałość rozpuszczono w 1 mL ACN i naniesiono na 3 mL kolumnkę SPE. Kolumnkę wcześniej kondycjonowano w następujący sposób: 5 mL wody, 2 mL metanolu i 2 mL heksanu. Po przepuszczeniu roztworu próbki przez kolumnkę, kolumnki przemywano 1 mL octanu etylu, po czym pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez 3 min. Na koniec HTL eluowano za pomocą 4 mL metanolu, zaś eluat wysuszone w atmosferze azotu w 40 °C. W dalszej kolejności przeprowadzono derywatyzację

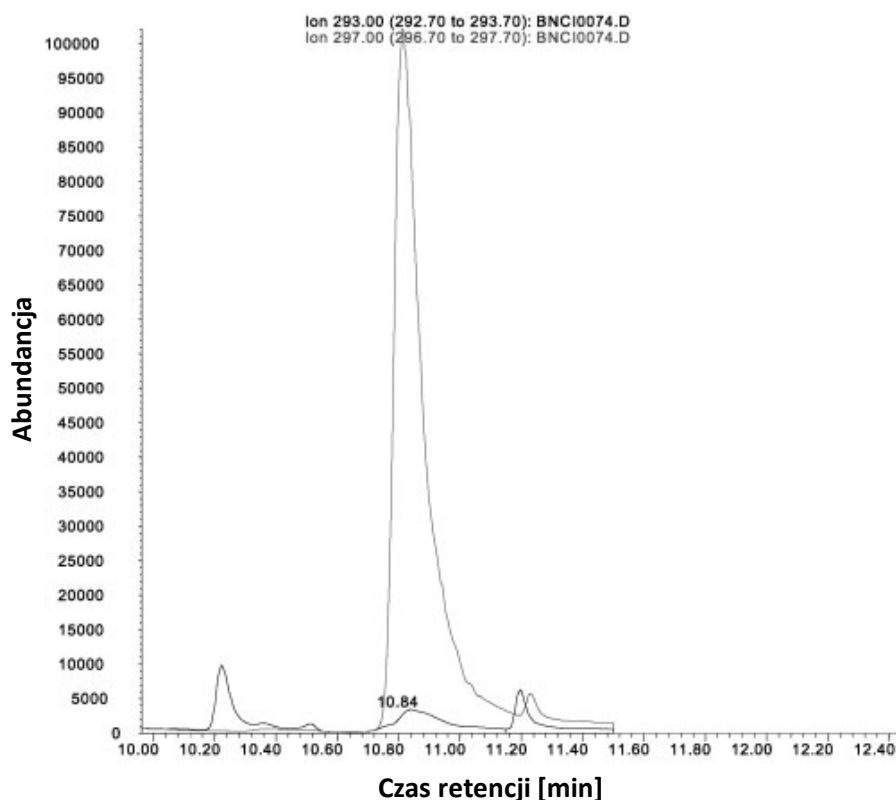
analitu poprzez rozpuszczenie próbki w 50 μL ACN i 50 μL HFBA, po czym mieszaninę inkubowano w 60 $^{\circ}\text{C}$ przez 30 min w suchym bloku grzejącym. Po reakcji derywatywacji odparowano HFBA strumieniem azotu a pozostałość rozpuszczono w 200 μL heksanu. Rozdzielanie HTL przeprowadzono stosując kolumnę HP-5ms o wymiarach: długość całkowita – 30 m, średnica wewnętrzna – 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm . Fazę ruchomą stanowił hel, który przepuszczano przez kolumnę ze stałą prędkością przepływu wynoszącą 1 mL/min. Próbkę wprowadzano do układu chromatograficznego w objętości 2 μL z wykorzystaniem dozownika typu split/splitless który pracował w trybie pulsacyjnym bez podziału strumienia. Podczas analizy chromatograficznej temperatura dozownika wynosiła 250 $^{\circ}\text{C}$, zaś temperaturę kolumny wynoszącą 50 $^{\circ}\text{C}$ utrzymywano przez 1 min po czym podwyższono z prędkością 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do 300 $^{\circ}\text{C}$ i utrzymywano przez 1 min. Pochodną HTL-HFBA analizowano za pomocą spektrometru mas z wykorzystaniem trybu jonizacji chemicznej ujemnymi jonami w atmosferze metanu. Monitorowano dwie wartości jonów molekularnych (m/z) 293 dla HTL-HFBA oraz 297 dla d_4 -HTL. Krzywą kalibracyjną sporządzono w zakresie stężeń HTL od 0 do 0,040 $\mu\text{mol}/\text{L}$ osocza, przy stałej ilości standardu wewnętrznego d_4 -HTL (365 nmol), odczytując pole powierzchni sygnału pochodzącego od HTL oraz obliczając stosunek pól powierzchni sygnałów HTL względem pola powierzchni sygnału d_4 -HTL. Na **rysunku 5** przedstawiono sześciopunktową krzywą kalibracyjną uzyskaną dla HTL w osoczu.



Rys. 5. Krzywa kalibracyjna HTL w próbkach osocza wykonana na podstawie stosunków pól powierzchni sygnałów pochodzących od HTL i d_4 -HTL [91].

Powyższa zależność wykazała charakter liniowy w badanym zakresie stężeń, gdzie $R^2 = 0,9949$. Wewnętrzna oraz międzydniowa precyzja przy stałym stężeniu HTL wynoszącym 0,0052 $\mu\text{mol}/\text{L}$ wyniosła odpowiednio 0,96% i 3,9%. W publikacji nie podano wartości

dokładności metody. Z kolei wartości granic wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) wyznaczono na podstawie następujących wzorów: $LOD = 3,3 \cdot SD/S$, $LOQ = 10 SD/S$, gdzie S oznacza wartość nachylenia krzywej a SD odchylenie standardowe wyrazu wolnego. W związku z czym otrzymano następujące wartości tych granic: 0,0017 $\mu\text{mol/L}$ dla LOD oraz 0,0052 $\mu\text{mol/L}$ dla LOQ. Podjęto także próbę oznaczenia HTL w próbkach osocza, otrzymana zawartości tego związku w osoczu wyniosła 0,018 i 0,025 $\mu\text{mol/L}$, które były znacznie wyższe od wartości LOQ. Przykładowy chromatogram uzyskany po analizie osocza wykorzystując podane powyżej warunki chromatograficzne przedstawiono na **rysunku 6**.

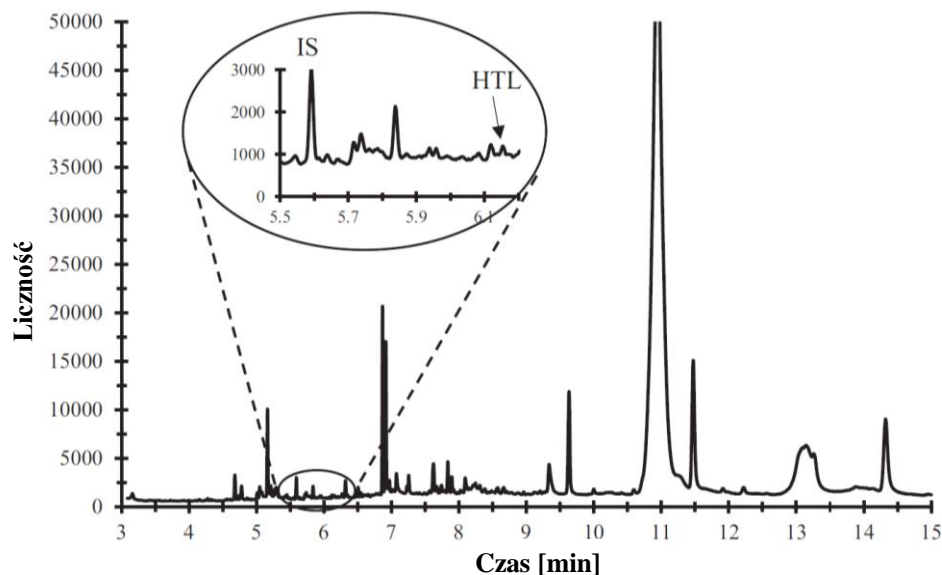


Rys. 6. Przykładowy chromatogram uzyskany po analizie osocza za pomocą techniki GC-MS. Czarna linia - chromatogram uzyskany podczas monitorowania jonu molekularnego 293 m/z dla HTL. Szara linia - chromatogram uzyskany podczas monitorowania jonu molekularnego 297 m/z dla d₄-HTL. Czas retencji HTL wynosi 10,84 min [91].

Druga z opisywanych metod była pierwszą wykorzystującą chromatografię gazową do oznaczania HTL w moczu człowieka [92]. Do procedury oznaczania stosowano tradycyjną ekstrakcję ciecz-ciecz (LLE) podczas etapu przygotowania próbki, przeprowadzono derywatyzację analitu za pomocą chloromrówczanu izobutyłu (ICF), zaś do analizy moczu stosowano chromatograf gazowy sprzężony z spektrometrem mas. Próbki porannego moczu do badań pobrane od 12 pozornie zdrowych wolontariuszy, 5 mężczyzn i 7 kobiet w wieku 25 - 46 lat, były

analizowane od razu po ich dostarczeniu do laboratorium albo przechowywane w temperaturze $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Procedura przygotowania próbki moczu była następująca: $150\text{ }\mu\text{L}$ moczu wymieszano z $250\text{ }\mu\text{L}$ $0,05\text{ mol/L}$ buforu fosforanowego o $\text{pH} = 7$. Następnie dodano $50\text{ }\mu\text{L}$ ICF, a otrzymaną próbkę wzbogacono $50\text{ }\mu\text{L}$ roztworu laktonu homoseryny (HSL), tak aby jego stężenie końcowe wynosiło 2 nmol/L moczu i mieszano przez 20 s . Do próbki dodano $300\text{ }\mu\text{L}$ chloroformu, a otrzymaną mieszaninę energicznie mieszano za pomocą wortexu przez 3 min przy $3000\times\text{g}$, po czym odwirowano przy $14000\times\text{g}$ przez 3 min . W kolejnym etapie warstwę chloroformową przeniesiono do polipropylenowych fiolek i odparowano do sucha w temperaturze $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Otrzymaną pozostałość rozpuszczono w $80\text{ }\mu\text{L}$ octanu etylu i wymieszano przez 3 min przy $3000\times\text{g}$. Do układu chromatograficznego wprowadzono $1\text{ }\mu\text{L}$ otrzymanego roztworu. Podczas analiz chromatograficznych wykorzystywano następujące warunki: kolumna kwarcowa o długości 60 m i średnicy wewnętrznej $0,25\text{ mm}$ z warstwą filmu o grubości $0,25\text{ }\mu\text{m}$, gaz nośny stanowił hel, którego prędkość przepływu wynosiła 1 mL/min . Temperaturę dozownika ustawiono na $270\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kolumnę termostatowano w $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 2 min po czym wartość tą zwiększono do $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ z prędkością $30\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, którą następnie utrzymywano przez 8 min . Próbkę wprowadzano w trybie podziału strumienia w stosunku $10:1$. Detektor spektrometrii mas pracował w trybie jonizacji strumieniem elektronów przy energii 70 eV , gdzie temperaturę źródła jonów ustawiono na $230\text{ }^{\circ}\text{C}$. Temperatura kwadrupola wynosiła $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, zaś temperatura interfejsu z MS była ustawiona na $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. Detektor ustawiono na monitorowanie następujących jonów molekularnych $161,1\text{ m/z}$ oraz $189,1\text{ m/z}$ dla pochodnej HTL, a $146,1\text{ m/z}$ dla pochodnej HSL. W następnym etapie przeprowadzono kalibrację metody, podczas której próbki moczu były wzbogacane standardem HTL o wzrastających stężeniach w zakresie od $0,01$ do $0,20\text{ }\mu\text{mol/L}$ moczu. Krzywą kalibracyjną sporządzono poprzez wyznaczenie zależności stosunku pól powierzchni sygnałów pochodzących od HTL i HSL od stężenia HTL w moczu. Zależność ta wykazała charakter liniowy w badanym zakresie stężeń, otrzymano równanie prostej w postaci $y = 1,485x$, gdzie R^2 był równy $0,999$. Dokładność metody mieściła się w zakresie od 98% do $103,2\%$, zaś precyzja metody wewnątrz- oraz międzydniowa mieściła się w zakresie odpowiednio $6,4 - 9,5\%$ oraz $10,7 - 16,9\%$. Wartości LOD i LOQ wyznaczono metodą stosunku sygnału do szumu S/N (S oznacza wysokość sygnału dla analitu a N wysokość szumu linii podstawowej). W związku z tym eksperymentalnie wyznaczone wartości LOD i LOQ były następujące $0,005$ oraz $0,010\text{ }\mu\text{mol/L}$ moczu. Powyższą metodą wykorzystano do analizy próbek moczu od 12 ochotników. Wyznaczona zawartość HTL w moczu była w zakresie od $0,007$ do $0,162\text{ }\mu\text{mol/L}$ moczu. Podczas wyznaczania stężenia HTL

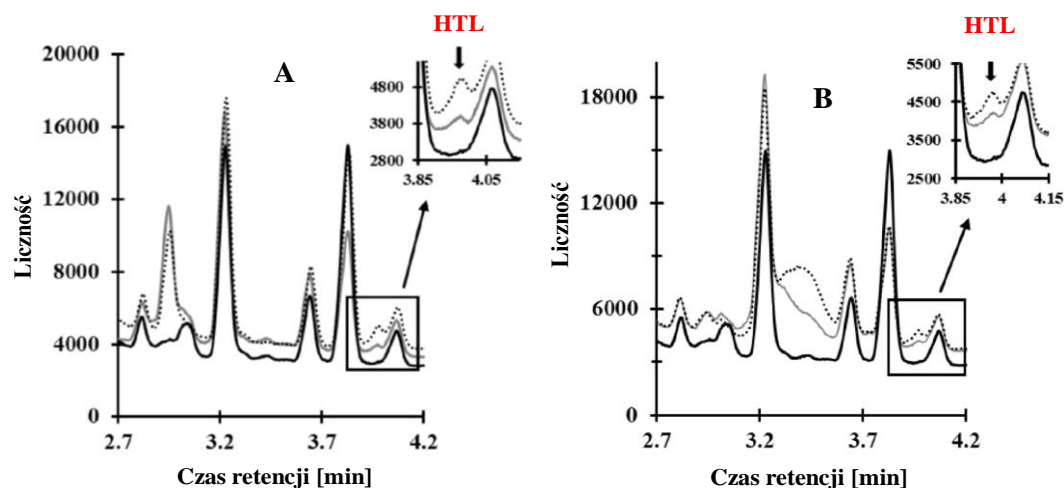
w próbkach moczu okazało się, że w dwóch przypadkach zawartość HTL była niższa od LOQ, jednakże RSD otrzymanych wyników było mniejsze niż 5%. Reprezentatywny chromatogram przedstawiono na **rysunku 7**.



Rys. 7. Reprezentatywny chromatogram próbki moczu, w której stężenie HTL wyniosło 13,5 $\mu\text{mol/L}$ moczu [92].

Trzecia metoda dotyczyła oznaczania HTL w ślinie oraz moczu [93]. W tej procedurze do przygotowania próbki do analizy stosowano tradycyjną LLE, następnie derywatyzację analitu za pomocą N-metylo-N-(trimetylosililo)trifluoroacetamidu (MSTFA) z 1% trimetylochlorosilanu (TMCS) dla próbek śliny oraz za pomocą MSTFA z 1% bezwodną pirydyną. Do analizy próbek wykorzystywano chromatograf gazowy sprzężony z detektorem spektrometrii mas. Warunki pobierania oraz przechowywania próbek śliny i moczu były następujące: poranną ślinę oraz mocz pobierano od pozornie zdrowych ochotników, przy czym próbki śliny były odwirowane przy $12\,000 \times g$ przez 10 min w temperaturze $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analizę obu rodzajów próbek przeprowadzano zaraz po ich otrzymaniu lub przechowywano w temperaturze $-81\text{ }^{\circ}\text{C}$. Proces przygotowania próbki składał się z następujących etapów: pobierano $300\ \mu\text{L}$ moczu lub śliny i mieszano z $100\ \mu\text{L}$ $0,2\ \text{mol/L}$ buforu fosforanowego o $\text{pH} = 7,8$. Następnie mieszaninę ekstrahowano przy pomocy $800\ \mu\text{L}$ mieszaniny $\text{CHCl}_3/\text{MetOH}$ (2:1, v/v) wytrząsając za pomocą worteksu przez 3 min. Po odwirowaniu ($12\,000 \times g$ przez 2 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) pobrano $515\ \mu\text{L}$ fazy organicznej do próbki polipropylenowej o pojemności $1,5\ \text{mL}$ i odparowano w próżni w temperaturze $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 15 min. Pozostałość poddano derywatywacji za pomocą $25\ \mu\text{L}$ MSTFA z 1% TMCS lub $50\ \mu\text{L}$ MSTFA z 1% bezwodną pirydyną przez 5 min w temperaturze

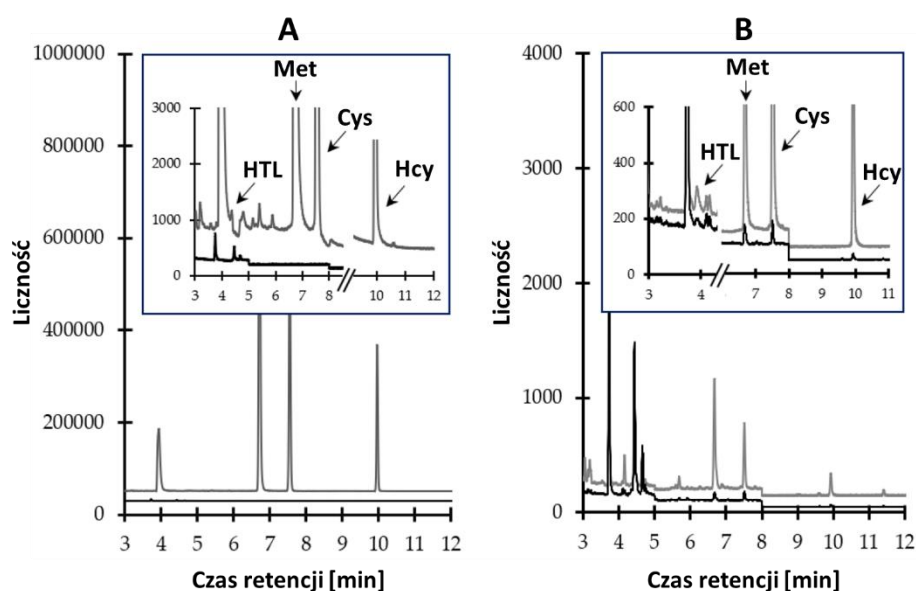
50 °C, odpowiednio dla śliny i moczu. Po ochłodzeniu do temperatury otoczenia mieszaninę reakcyjną przeniesiono do fiolek i roztwór w objętości 1 µL wprowadzono do układu GC-MS. Do analiz chromatograficznych stosowano jako gaz nośny hel przy stałej prędkości przepływu wynoszącej 1 mL/min. Do rozdzielania składników próbki stosowano kolumnę o wymiarach 30 m (długość), 0,25 mm (średnica wewnętrzna) i grubości filmu 0,25 µm. Temperatura poszczególnych podzespołów GC była następująca: dozownik – 280 °C, termostat piecowy – 146 °C przez 4,2 min, natomiast dla MS, który pracował w trybie jonizacji strumieniem elektronów przy energii 70 eV, temperatura źródła jonów detektora – 230 °C, temperatura kwadrupola – 150 °C, temperatura interfejsu z MS – 250 °C. Podczas detekcji poszczególnych jonów detektor MS ustawiono na monitorowanie takich jonów molekularnych pochodnej trimetylosililo-HTL jak 100,1 m/z, 115,1 m/z, 128,1 m/z oraz 161,1 m/z, gdzie wartość 128,1 m/z była wybrana do oznaczeń ilościowych HTL. Podczas kalibracji metody próbki moczu lub śliny wzbogacono taką ilością HTL, aby jego stężenia końcowe mieściły się w zakresie od 50 do 1000 nmol/L. Następnie wyznaczono zależność pola powierzchni pików od stężenia HTL, gdzie otrzymane krzywe wykazały w badanym zakresie stężeń charakter liniowy dla obu rodzajów próbek biologicznych. Równanie prostej kalibracyjnej dla śliny miało postać $y = 739,0x + 40,9$ ($R = 0,996$), a dla moczu $y = 761,2x + 46,4$ ($R = 0,998$). Wyznaczone RSD dla punktów krzywej kalibracyjnej mieściło się w zakresie od 7,06% do 13,54% dla śliny oraz od 2,23% do 14,47% dla moczu, zaś odzysk był w zakresie od 98,7% do 112,6 oraz od 91,9% do 110,9%, odpowiednio dla śliny oraz moczu. Na podstawie przeprowadzonej przez eksperymentatorów walidacji metody wewnątrz- oraz międzydniowej otrzymano, że precyzja metody wewnątrzdniowa nie przekraczała dla obu rodzajów próbek 12%, a dokładność metody mieściła się w zakresie 103 - 105% (ślina) oraz 103 - 111% (mocz). Z kolei precyzja metody międzydniowa nie przekraczała 15%, a dokładność metody była od 90,2% do 100,5% dla śliny oraz od 91,2% do 103,3% dla moczu. Wyznaczono również wartość LOQ metody, której odpowiadało stężenie HTL dla którego otrzymywano wysokość sygnału 10 razy większą od wysokości szumu linii podstawowej, w związku z tym stężenie to wyniosło 0,05 µmol/L śliny oraz moczu. W kolejnym etapie po walidacji prezentowaną metodę zastosowano do analizy próbek moczu od 18 ochotników, których stanowiło 7 mężczyzn oraz 11 kobiet w wieku od 24 do 65 lat. Zawartość HTL w ślinie i moczu wynosiła odpowiednio od 0,07 do 0,19 µmol/L oraz od 0,08 do 0,27 µmol/L. Reprezentatywne chromatogramy próbki śliny oraz moczu przedstawiono na **rysunku 8**.



Rys. 8. Reprezentatywne chromatogramy próbki śliny (A) oraz moczu (B) – szara linia, próbek doszczepionych, gdzie stężenie HTL wynosiło 0,5 µmol/L – linia przerywana oraz próbek niezawierających analitu - linia czarna [93].

Kolejną metodą oznaczania HTL w obecności Met, Cys i Hcy w ludzkiej ślinie za pomocą chromatografii gazowej w połączeniu z spektrometrią mas była procedura opracowana przez Piechocką z zespołem [94]. Procedura ta rozpoczyna się od odwirowania 2 mL pobranej próbki śliny przy $12\ 000 \times g$ przez 10 min w temperaturze 4 °C. Następnie, do 50 µL pobranego po odwirowaniu roztworu znad osadu dodano 200 µL ACN i 10 µL roztworu 1 mol/L tris(2-karboksyetylo)fosfiny. Otrzymaną mieszaninę wytrząsano (nie podano czasu wytrząsania), a następnie odwirowano przy $12\ 000 \times g$ przez 5 min w temperaturze 10 °C. Po odwirowaniu, 200 µL górnej fazy organicznej przeniesiono do próbki polipropylenowej o pojemności 0,5 mL i odparowano rozpuszczalnik pod próżnią przez 25 min w temperaturze 100 °C. Otrzymaną pozostałość rozpuszczono w 60 µL mieszaniny derywatyzującej (N-metylo-N-(trimetylosililo)trifluoroacetamid i 1% chlorotrimetylosilanu w pirydynie (1:1, v/v)). Całość wymieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 min, po czym mieszaninę reakcyjną przeniesiono do fiolki, a do układu chromatograficznego niezwłocznie wprowadzono 1 µL roztworu próbki. Do przeprowadzania eksperymentów wykorzystano chromatograf gazowy wyposażony w automatyczny podajnik próbek, spektrometr mas, oraz dozownik typu split/splitless. Rozdzielanie HTL od Met, Cys i Hcy prowadzono stosując kolumnę HP-5ms o wymiarach: długość całkowita – 30 m, średnica wewnętrzna – 0,25 mm, grubość filmu 0,25 µm. Fazę ruchomą stanowił hel, który przepuszczano przez kolumnę ze stałą prędkością przepływu wynoszącą 1 mL/min. W trakcie trwania analiz temperaturę dozownika ustawiono na 280 °C. Chromatograficzne rozdzielanie wszystkich analitów prowadzono w warunkach gradientu temperatury: przez pierwsze 5 min utrzymywano temperaturę 146 °C, którą następnie

zwiększono do 200 °C z prędkością 5 °C/min, a potem z prędkością 20 °C/min temperaturę kolumny zwiększono do 300 °C. Na koniec piec chromatografu schłodzono z prędkością 20 °C/min. Pochodną trimetylosililo-HTL analizowano za pomocą spektrometru mas stosując tryb jonizacji elektronami przy energii 70 eV. Temperatura źródła jonów detektora wynosiła 230 °C, temperatura kwadrupola – 150 °C, a temperatura interfejsu z MS – 250 °C. Podczas detekcji poszczególnych jonów pochodzących od pochodnej HTL detektor MS ustawiono na monitorowanie jonów 128,1 m/z oraz 161,1 m/z, gdzie wartość 161,1 m/z była wybrana do oznaczeń ilościowych. Walidacja obejmowała takie parametry jak: selektywność, liniowość, granica oznaczalności (LOQ), dokładność i precyzja. Badanie selektywności przeprowadzono poprzez analizę ślepej próby wodnego roztworu i wodnego roztworu standardów zawierającego mieszaninę HTL, Met, Cys i Hcy o stężeniu 10 µmol/l każdy. Roztwór każdego z badanych związków przygotowano oddzielnie w celu upewnienia się, że pojedynczy analit nie dał więcej niż jednego pików chromatograficznego. Zgodnie z **rysunkiem 9A**, można zauważyć że profil elucji jest wolny od jakichkolwiek interferentów w czasie retencji analitów. W taki sam sposób przeprowadzono sprawdzenie selektywności dla próbki śliny. Natomiast na **rysunku 9B** można zauważyć, że na chromatogramie otrzymanym po analizie próbki śliny wzbogaconej znanymi ilościami standardów HTL, Met, Cys i Hcy zaobserwowano przyrost wysokości sygnałów pochodzących od analitów względem sygnałów tych związków na chromatogramie uzyskanym po analizie ślepej próby.



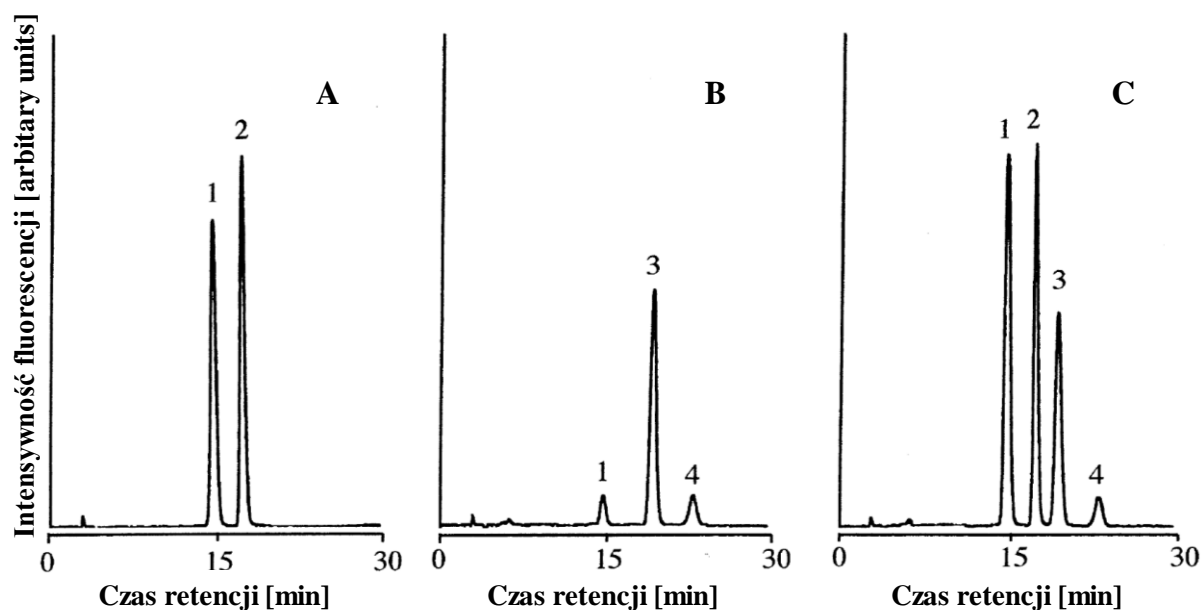
Rys. 9. Reprezentatywne chromatogramy roztworów standardów HTL, Met, Cys i Hcy oraz ludzkiej śliny. A - wodny roztwór ślepej próby (czarna linia) i roztwór wodnych standardów HTL, Met, Cys i Hcy (szara linia); B - próbka ludzkiej śliny (czarna linia) i ta sama próbka z dodatkami docelowych analitów (10 µmol/L) (szara linia) [94].

Ponadto badania selektywności obejmowały ocenę czystości pików. W tym celu detektor MS ustawiono na zbieranie widm w czasie trwania całej analizy chromatograficznej i porównywano widma zarejestrowane podczas elucji każdego z pików pochodzących od analitów. Co ważne, zaobserwowano te same widma, uzyskane w różnych przekrojach sygnału danego analitu. Wskazuje to na brak interferencji ze strony innych związków zawartych w matrycy próbki. Kalibrację metody przeprowadzono poprzez wzbogacanie próbki śliny taką ilością HTL, aby jego stężenie końcowe mieściło się w zakresie od 1 do 20 $\mu\text{mol/L}$ śliny. Następnie wyznaczono zależność pola powierzchni pików od stężenia HTL. Otrzymana zależność wykazała charakter liniowy w badanym zakresie stężeń, zaś otrzymane równanie prostej kalibracyjnej miało postać $y = 2,935x + 1,890$ ($R = 0,997$). Wyznaczona precyzja metody wewnątrz- oraz międzydniowa mieściła się w zakresie odpowiednio 8,5 - 12,8% oraz 11,0 - 12,2%. Zakres wewnątrz- i międzydniowej dokładności metody wynosił odpowiednio 89,5 - 102,2% i 92,5 - 101,5%. Wartość LOQ wyznaczono eksperymentalnie metodą stosunku sygnału do szumu. W tym celu próbkę matrycy zastępczej, którą stanowił 0,9% roztwór NaCl w 0,1 mol/l buforu fosforanowego o pH 7,4, wzbogacano zmniejszającymi się stężeniami HTL i przygotowano zgodnie z procedurą opisaną jak dla próbki śliny. Na podstawie eksperymentów jako LOQ przyjęto stężenie, dla którego otrzymano wysokość sygnału analitycznego 10 razy wyższą od wysokości szumu linii podstawowej. Uzyskana wartość LOQ dla HTL wyniosła 0,05 $\mu\text{mol/L}$ śliny.

Chromatografia cieczowa

Jedną z pierwszych metod oznaczania HTL za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) była procedura przeznaczona do analizy próbek ludzkich hodowli komórkowych [95]. W metodologii tej wykorzystano ludzką linię komórkową raka wątroby (Hep G2) oraz do analizy próbek chromatograf cieczowy sprzężony z detektorem fluorescencyjnym. Linie komórkową Hep G2 inkubowano na 60 mm szalkach w pożywce Harry'ego Eagle'a zmodyfikowanej przez Renato Dulbecco (DMEM), która zawierała 10% płodowej surowicy bydlęcej oraz penicyliny (100 jednostek/mL) i streptomycyny (100 $\mu\text{g/mL}$). Następnie komórki Hep G2 hodowano w monowarstwie zmieniając pożywkę na świeżą co 3 dni, aż do otrzymania naczynia zajętego przez komórki w 85%. Pożywkę zamieniono na 4 mL DMEM zawierającą 10% dializowanej płodowej surowicy bydlęcej pozbawionej metioniny oraz antybiotyków. Potem w ten sposób przygotowaną hodowlę inkubowano w atmosferze 5% CO_2 przez 24 godziny. Ekstrakty komórkowe przygotowano po 4 oraz 24 godzinach inkubacji w pożywce wolnej od metioniny. Po oddzieleniu komórek od pożywki komórki przemyto 1 mL lodowatego

roztworu soli fizjologicznej buforowanej fosforanem sodu i potasu (PBS), po czym komórki zeszkobano i ekstrahowano 0,3 mL buforu do lizy komórkowej (10 mmol/L bufor fosforanowy o pH = 6 zawierający 1% niejonowy surfaktant Triton X-100 oraz 0,1% SDS). Po 10 min przetrzymywania na lodzie, ekstrakt odwirowano przez 10 min przy $10\ 000 \times g$. Otrzymany supernatant poddano procesowi redukcji i odbiałczania w następujący sposób: 200 μ L ekstraktu lub pożywki hodowlanej rozcieńczono dwukrotnie wodą destylowaną, dodano 200 μ L 2,5 mmol/L tris(2-karboksyetylo)fosfiny w 0,1 mol/L buforze fosforanowym o pH = 6 i wymieszano. Mieszaninę przykryto i inkubowano w temperaturze 37 °C przez 10 min. Następnie próbkę odwirowano przy $5\ 000 \times g$ przez 20 min, a 200 μ L supernatantu przenoszono do fiolki chromatograficznej, a do układu wprowadzano 20 μ L próbki. Podczas rozdzielania chromatograficznego stosowano następujące warunki: kolumna o wymiarach 150 mm \times 4,6 mm z wypełnieniem typu C30, przedkolumna o wymiarach 10 mm \times 4 mm zawierająca ten sam typ wypełnienia, temperaturę kolumny ustawiono na 30 °C, faza ruchoma składała się z mieszaniny 50 mmol/L kwasu fosforowego/NaOH (pH = 2) z metanolem w stosunku 98:2 (v/v), która zawierała 0,5 mmol/L oktanosulfonianu sodu, a jej prędkość przepływu wynosiła 1 mL/min. Uzytykiwany eluat z kolumny mieszano w trójniku z 6 mmol/L aldehydem ortoftalowym (OPA) (w 0,5 mol/L NaOH), którego prędkość przepływu wynosiła 0,5 mL/min, po czym mieszanina trafiała do spirali reakcyjnej, którą stanowiła rurka teflonowa o wymiarach 0,5 mm (średnica wewnętrzna) \times 10 m (długość). Długości fal wzbudzenia oraz emisji detektora fluorescencyjnego wynosiły odpowiednio 370 nm oraz 480 nm. Kalibrację metody przeprowadzono w zakresie stężeń HTL od 0,01 do 10 μ mol/L, a wyznaczona zależność wykazała charakter liniowy. Wyznaczona granica wykrywalności dla HTL wyniosła 0,01 μ mol/L. Po wykonanej analizie próbki wzbogaconej znaną ilością HTL wyznaczono precyzję wewnątrzdniowa metody wyrażoną współczynnikiem zmienności równą 4,2%, z kolei wartość międzydniowej precyzji nie przekraczała 7,7%. Odzysk metody wyznaczono poprzez dodanie znanej ilości HTL do próbki przed procesem redukcji, a średnia wartość odzysku wyniosła $95,2 \pm 3,5\%$. Na **rysunku 10** zostały przedstawione reprezentatywne chromatogramy.



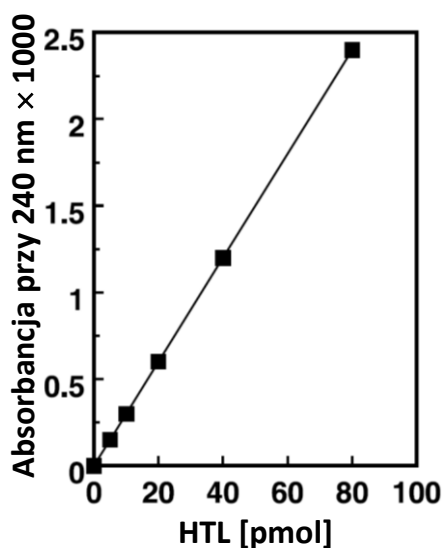
Rys. 10. Reprezentatywne chromatogramy ekstraktów komórek Hep G2, gdzie A – 1 $\mu\text{mol/L}$ HTL, B – ekstrakt komórek Hep G2, C – ekstrakt komórek wzbogacony 1 $\mu\text{mol/L}$ HTL, 1 – Hcy, 2 – HTL, 3 – glutation, 4 – histydyna [95].

Na koniec podjęto próbę oznaczenia HTL w komórkach Hep G2 za pomocą omawianej metody. Na podstawie wyników eksperymentów zaobserwowano zwiększającą się zawartość HTL w kulturach komórek wraz z wydłużeniem się czasu inkubacji, podczas stosowania pożywki nie zawierającej metioniny.

W kolejnej procedurze oznaczania HTL w próbkach biologicznych takich jak komórki bakterii, drożdży oraz człowieka, a także ludzkim osoczu, wykorzystano chromatograf cieczowy sprzężonej z detektorem z matrycą diodową [96]. Podczas przygotowania próbek komórek do badań stosowano różne rodzaje pożywek oraz warunki inkubacji. Komórki bakterii *Escherichia coli* oraz *Mycobacterium smegmatis* inkubowano przez noc w temperaturze 37 °C na pożywce M9, która zawierała mieszaninę różnych soli oraz azot, z dodatkiem glukozy, aminokwasów i witamin. Następnie otrzymaną kulturę zebrano poprzez odwirowanie przez 5 min przy 10 000 \times g i ponownie umieszczono w dwukrotnie większej objętości pożywki M9, która dodatkowo zawierała *D,L*-Hcy. Komórki bakterii inkubowano w warunkach aerobowych na waku przez 24h w temperaturze 30 °C. Z kolei komórki różnych szczepów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* inkubowano przez noc w temperaturze 30 °C na pożywce SD (*Synthetic Defined mini medium*), na bazie azotu bez aminokwasów, zawierającej źródła węgla takie jak glukoza, galaktoza, rafinoza, bursztynian lub ich kombinację. Komórki potem zebrano poprzez odwirowanie przez 5 min przy 5 000 \times g i ponownie umieszczono w dwukrotnie większej objętości pożywki SD z dodatkiem *D,L*-Hcy, po czym komórki inkubowano przez 24 godziny

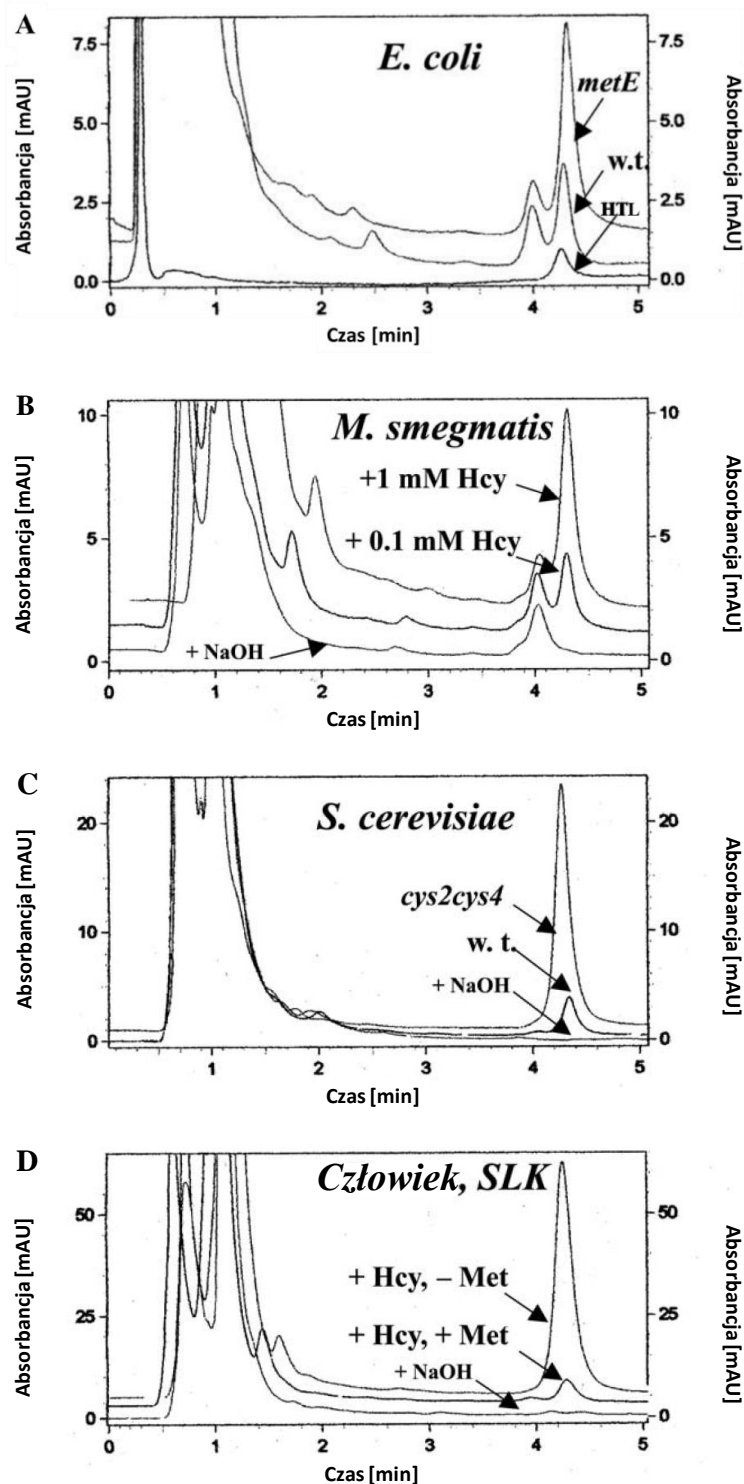
w temperaturze 30 °C. Tymczasem, ludzkie komórki diploidalne śródbłonna inkubowano jako pojedynczą warstwę kultury komórek na 10 cm szalkach Petriego z pożywką RPMI 1640, która zawierała glukozę, sole, aminokwasy i witaminy, z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej, 50 µg/mL penicyliny oraz 100 µg/mL streptomycyny, w temperaturze 37 °C w atmosferze 5% CO₂, 95% powietrza. W celu oznaczania HTL, na 3,5 cm szalkę naniesiono komórki i hodowano do całkowitego jej pokrycia. Następnie zużytą pożywkę zastąpiono nową pożywką (1,5 mL RPMI 1640 bez metioniny) zawierającą dodatek 10% dializowanej płodowej surowicy bydlęcej oraz *D,L*-Hcy, Met lub obydwie te związki. Tak otrzymaną hodowlę inkubowano w temperaturze 37 °C w atmosferze 5% CO₂, przez 24 godziny. Jednakże z powodu tego, że streptomycyna rozkłada HTL, przed drugą inkubacją komórki monowarstwy były dokładnie przemyte PBS, po czym do rozwijania hodowli używano pożywki niezawierającej streptomycyny. Do oznaczania HTL, wszystkie rodzaje kultur komórkowych, tj. bakterii, drożdży oraz człowieka, odwirowano (10 000 × g, przez 5 min w temperaturze 4 °C), otrzymany roztwór bez komórek poddano ultrafiltracji na membranach typu cut-off, z kolei 20 µL ultrafiltratu rozcieńczono do 50 µL wodą o czystości do HPLC i wprowadzono do układu chromatograficznego. Do przeprowadzania analiz na zawartość HTL w osoczu, krew pobierano od zdrowych wolontariuszy do próbek zawierających EDTA, które przechowywano w lodzie, zaś osocze otrzymywano poprzez odwirowanie w temperaturze 4 °C, przy 2 000 × g przez 15 min. Następnie 0,5 - 1 mL osocza odbiałczono poprzez przefiltrowanie przez filtr membranowy typu cut-off. Do adsorpcji HTL na węglu aktywnym odbiałczony filtrat przepuszczono przez węglowy sorbent, który został wcześniej przemyty roztworem PBS. W kolejnym kroku przeprowadzono desorpcję HTL poprzez trójkratne przemycie węglowego sorbentu za pomocą 0,07 mL 20 mmol/L HCl. Otrzymany roztwór liofilizowano, a pozostałość rozpuszczono w 50 µL 20 mmol/L K₂HPO₄ i wprowadzono do układu chromatograficznego. Do oznaczania HTL w ludzkim osoczu wykorzystywano następujące warunki chromatograficzne: chromatograf cieczowy z ręcznym zaworem dozującym typu Rheodyne, którego pętla miała objętość 0,1 mL oraz detektorem spektrofotometrycznym UV-Vis z matrycą diodową. Próbkę wprowadzano na kolumnę typu C18 o wymiarach 2,1 mm × 150 mm, o wielkości ziaren wypełnienia 3 µm, temperatura kolumny wynosiła 25 °C, zaś fazę ruchomą stanowił 1% ACN w 10 mmol/L buforze fosforanowym o pH = 7,4. Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,5 mL/min. W trakcie analizy stosowano elucję gradientową, gdzie w pierwszej minucie faza ruchoma zawierała 1% ACN, następnie przez kolejne 4 minuty stężenie ACN wzrastało z 1% do 5%, po czym zawartość ACN w fazie ruchomej znów malała do 1%. Z kolei podczas analiz

chromatograficznych próbek ekstraktów *E. coli*, *M. smegmatis*, *S. cerevisiae* oraz ludzkich komórek diploidalnych śródbłonna stosowano warunki chromatograficzne takie jak: kolumna kationitowa o wymiarach $2,1 \times 200$ mm, średnica ziaren wypełnienia $5 \mu\text{m}$, faza ruchoma składała się z dwóch składników, gdzie składnikiem A był roztwór 10 mmol/L diwodorofosforanu sodu o $\text{pH} = 5,0$, zaś składnikiem B był roztwór 200 mmol/L NaCl w 10 mmol/L diwodorofosforanie sodu. Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła $0,5 \text{ mL/min}$. Po nałożeniu próbki na kolumnę składnik B stanowił 25% składu fazy ruchomej przez $0,5 \text{ min}$, po czym przez 5 min zawartość składnika B wzrastała liniowo z 25% do 80% i przez kolejne $0,5 \text{ min}$ utrzymywano 80% zawartości składnika B, a następnie w ciągu 3 min zawartość składnika B obniżano z powrotem do 25% w fazie ruchomej. Sygnał analityczny pochodzący od HTL rejestrowano przy długości fali wynoszącej 240 nm . Z poszczególnych elementów procesu walidacji metody została opisana procedura kalibracji oraz podana wartość precyzji metody i granicy wykrywalności. Krzywa kalibracyjna do oznaczania HTL w próbkach biologicznych, sporządzona w zakresie stężeń od $0,1$ do $500 \mu\text{mol/L}$, wykazała charakter liniowy, a wewnątrzdniowa precyzja metody nie przekraczała $6,4\%$. Otrzymałą zależność przedstawiono na **rysunku 11**.



Rys. 11. Zależność absorbancji ($\lambda_{\text{HTL}} = 240 \text{ nm}$) od stężenia HTL w roztworze kalibracyjnym [96].

W następnej kolejności przeprowadzono oznaczanie HTL w ekstraktach komórkowych w celu wykazania ich zdolności do syntezy HTL w zależności rodzaju hodowli komórkowej oraz dodatku Hcy i/lub Met w pożywce. Na **rysunku 12** przedstawiono reprezentatywne chromatogramy uzyskane po analizie poszczególnych rodzajów ekstraktów komórkowych.



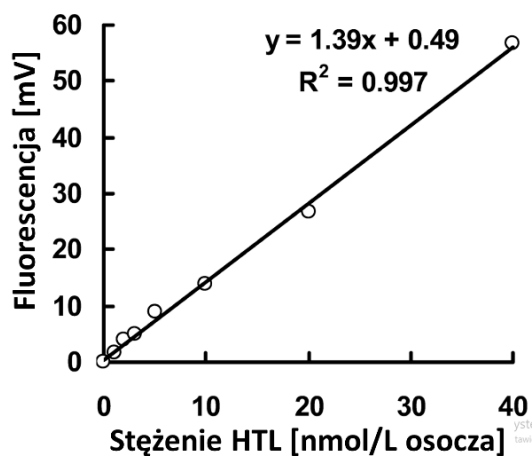
Rys. 12. Reprezentatywne chromatogramy uzyskane po analizie poszczególnych rodzajach ekstraktów komórkowych. MetE – szczep *E. coli* z genetycznie indukowanym niedoborem syntazy metioniny; *cys2cys4* - szczep *S. cerevisiae* z genetycznie indukowanym niedoborem β -syntazy cystationinowej; w.t. – typ dziki szczepu *S. cerevisiae*; SLK – linia komórek śródbłonna człowieka [96].

Przeprowadzono również oznaczenie HTL w ludzkim osoczu. W próbkach osocza trzech wolontariuszy zawartość HTL mieściła się w zakresie 0,07 - 0,2 $\mu\text{mol/L}$, jednakże w próbkach

osocza pobranych od innych trzech wolontariuszy nie zaobserwowano sygnału od oznaczanego analitu.

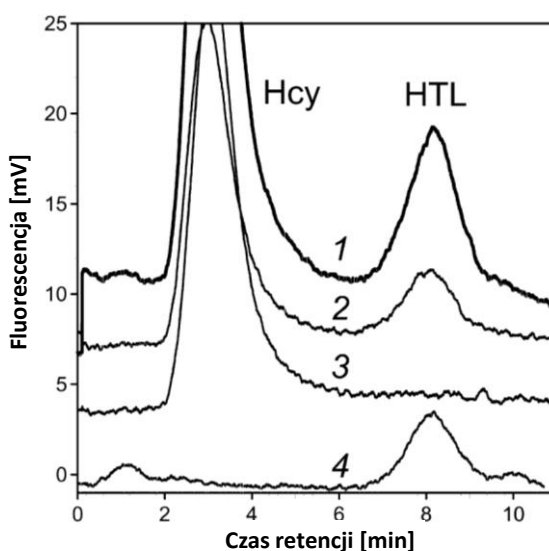
Kolejna metoda, którą opracowano do oznaczania HTL, dotyczyła wykorzystania techniki HPLC do analizy ludzkiego osocza na zawartość tego analitu [97]. W procedurze oznaczania HTL wykorzystano odbiałczanie próbek, ekstrakcję ciecz-ciecz (LLE), rozdzielanie składników ekstraktu za pomocą chromatografii cieczowej, pokolumnową derywatyzację analitu za pomocą OPA oraz detekcję z wykorzystaniem detektora fluorescencyjnego. Osocze do eksperymentów otrzymano poprzez pobranie krwi od pozornie zdrowych ochotników w wieku od 35 do 76 lat, z których 58,3% stanowili mężczyźni, bezpośrednio do przechowywanych w lodzie probówek zawierających EDTA. Następnie próbki krwi natychmiast poddano wirowaniu w temperaturze 4 °C, przy 2 000 × g przez 15 min. Otrzymane osocze przechowywano w temperaturze -80 °C. Próbkę osocza, w objętości 400 µL, poddano odbiałczaniu poprzez filtrowanie z wykorzystaniem filtrów membranowych typu cut-off. Do 200 µL bezbiałkowego osocza dodano 10 µL roztworu 1 M K₂HPO₄ aby pH próbki wynosiło 8,0. Następnie przeprowadzono ekstrakcję LLE za pomocą mieszaniny chloroform:metanol (2:1, v/v) w temperaturze pokojowej. W celu rozdzielania faz, mieszaninę poddano odwirowaniu przy 15 000 × g przez 0,5 min w temperaturze 4 °C, po czym przeprowadzono reekstrakcję HTL z fazy organicznej do 200 µL 0,1 mol/L HCl. Fazę wodną liofilizowano, a pozostałość rozpuszczono w 20 µL wody dejonizowanej. Z otrzymanego roztworu pobrano 10 µL, dodano 10 µL fazy ruchomej i całość wprowadzono do układu HPLC. Podczas rozdzielania chromatograficznego stosowano poniższe warunki: chromatograf cieczowy z ręcznym zaworem dozującym próbki (typ Rheodyne, objętość pętli 100 µL, objętość wprowadzanej próbki 10 - 20 µL), kolumna kationitowa o wymiarach 150 × 1 mm, średnica ziaren wypełnienia kolumny 5 µm, faza ruchoma składała się z roztworu 10 mmol/L buforu fosforanowego o pH = 6,6, który zawierał 5 mmol/L NaCl, prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,15 mL/min. Pokolumnową derywatyzację przed detekcją fluorymetryczną przeprowadzono za pomocą roztworu 2,5 mmol/L OPA w 0,25 mol/L NaOH. Po separacji na kolumnie chromatograficznej eluat był mieszany z roztworem OPA, który do układu chromatograficznego dostarczano za pomocą trójnika z prędkością przepływu 0,07 mL/min. Mieszanina była przepuszczana przez teflonową rurkę reakcyjną o długości 3 m i średnicy wewnętrznej 300 µm, po czym pochodna HTL trafiała do detektora, którego długość fali wzbudzenia ustawiono na 370 nm, a długość rejestrowanej fali emisji na 480 nm. Podczas walidacji metody przeprowadzono jej kalibrację stosując stężenia

HTL w osoczu w zakresie 0,001 - 0,04 $\mu\text{mol/L}$, a wyznaczona zależność wykazała w tym zakresie stężeń charakter liniowy. Na **rysunku 13** przedstawiono uzyskaną krzywą kalibracyjną.



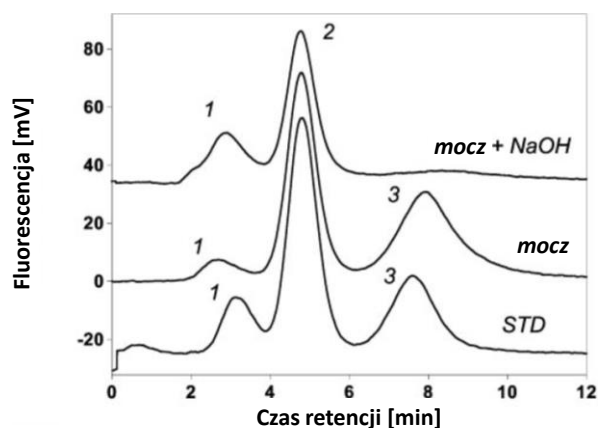
Rys. 13. Zależność fluorescencji od stężenia HTL w osoczu człowieka [97].

Granica wykrywalności została wyznaczona z wykorzystaniem następującego wzoru: $3,3 \cdot \text{SD}/S$, gdzie S to współczynnik nachylenia prostej kalibracyjnej, a SD odchylenie standardowe wyrazu wolnego i wynosiła 0,00036 $\mu\text{mol/L}$. Przeprowadzono oznaczanie HTL w ludzkim osoczu pobranym od 60 ochotników stosując opracowaną procedurę, a wyznaczona zawartość HTL w próbkach osocza mieściła się w zakresie od 0 do 0,0348 $\mu\text{mol/L}$ osocza. Reprezentatywne chromatogramy uzyskane po analizie osocza przedstawiono na **rysunku 14**.



Rys. 14. Reprezentatywne chromatogramy ludzkiego osocza, gdzie 1 – stężenie HTL równe 6,7 nmol/L osocza, 2 – stężenie HTL równe 2,8 nmol/L osocza, 3 – próbka osocza potraktowana NaOH przed analizą HPLC, 4 – roztwór standardu HTL (100 fmol) [97].

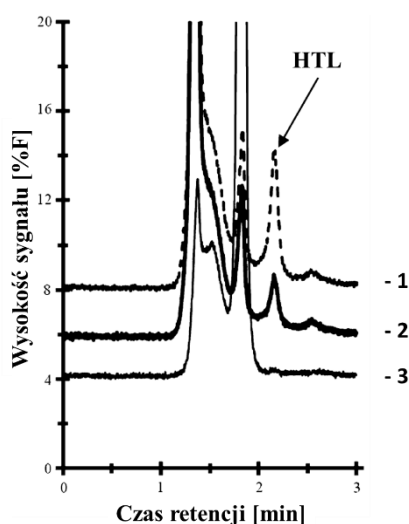
Następna z opisywanych procedur była pierwszą metodą oznaczania HTL w ludzkim moczu, w której wykorzystano technikę chromatografii cieczowej [55]. W procedurze oznaczania wykorzystano następujące elementy: pobranie i przechowywanie próbki porannego moczu, przygotowanie próbki do badań poprzez ekstrakcję SPE na węglu aktywnym, rozdzielanie chromatograficzne składników próbki, pokolumnową derywatyzację analitu za pomocą OPA oraz detekcję fluorymetryczną. Próbkę moczu pobrane od zdrowych ochotników w wieku 30 - 57 lat przechowywano do badań w 10 mL porcjach w $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Następnie $500\text{ }\mu\text{L}$ moczu przefiltrowano za pomocą filtrów membranowych typu cut – off w temperaturze $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, po czym do $250\text{ }\mu\text{L}$ filtratu dodano $20\text{ }\mu\text{L}$ K_2HPO_4 , aby doprowadzić pH próbki do wartości 8,0. Otrzymaną mieszaninę zmieszano z 10 mg węgla aktywnego. Przed użyciem węgiel aktywny był dwukrotnie przemyty $100\text{ }\mu\text{L}$ 1 mol/L HCl , $100\text{ }\mu\text{L}$ soli fizjologicznej buforowanej fosforanem, a na koniec $100\text{ }\mu\text{L}$ wody dejonizowanej. Uwolnienie cząsteczek HTL z węgla aktywnego przeprowadzono poprzez trójkratne przemycie $100\text{ }\mu\text{L}$ 10 mmol/L HCl . Otrzymany roztwór poddano liofilizacji, a następnie pozostałość rozpuszczono w $100\text{ }\mu\text{L}$ fazy ruchomej, z czego $10\text{ }\mu\text{L}$ zostało pobrane i wprowadzone do układu chromatograficznego. Podczas analiz z wykorzystaniem aparatu do HPLC stosowano następujące warunki oraz parametry: chromatograf cieczowy wyposażony w ręczny zawór dozujący typu Rheodyne (objętość pętli $100\text{ }\mu\text{L}$), kationitowa kolumna o wymiarach $150 \times 1\text{ mm}$, średnica ziaren wypełnienia $5\text{ }\mu\text{m}$, typ elucji izokratyczny, gdzie faza ruchoma składała się z roztworu buforu fosforanowego o stężeniu 10 mmol/L i $\text{pH} = 6,6$ zawierającego 5 mmol/L NaCl , prędkość przepływu ustawiono na $0,15\text{ mL/min}$. Po separacji HTL został poddany derywatywacji pokolumnowej z OPA, gdzie roztwór odczynnika derywatyżującego o stężeniu $2,5\text{ mmol/L}$ w $0,25\text{ mol/L}$ NaOH dostarczany był za pomocą trójnika, z prędkością przepływu $0,7\text{ mL/min}$. Następnie mieszanina trafiała do teflonowej rurki reakcyjnej o długości 3 m i średnicy wewnętrznej $0,3\text{ mm}$ oraz do detektora fluorymetrycznego, gdzie następowała detekcja wytworzonej pochodnej stosując wzbudzenie cząsteczki przy długości fali 370 nm i rejestrując emisję przy długości fali 480 nm . Prezentowaną metodę skalirowano w zakresie stężeń od $0,1$ do 500 nmol/L , otrzymana krzywa kalibracyjna wykazała charakter liniowy w badanym zakresie. Precyzje wewnątrzdniowa oraz międzydniowa wyniosły odpowiednio $7,1\%$ oraz 12% . Za pomocą prezentowanej metodologii po raz pierwszy wykryto obecność HTL w ludzkim moczu. Stężenie HTL w badanych próbkach moczu mieściło się w zakresie od $0,011$ do $0,4737\text{ }\mu\text{mol/L}$, przy czym średnie stężenie wynosiło $0,1448\text{ }\mu\text{mol/L}$. Na **rysunku 15** zaprezentowane zostały reprezentatywne chromatogramy uzyskane po analizie moczu człowieka.



Rys. 15. Reprezentatywne chromatogramy ludzkiego moczu, gdzie górny wykres – próbka moczu po 5 min inkubacji roztworem NaOH o stężeniu 0,1 mol/L, środkowy wykres – próbka moczu zawierająca HTL o stężeniu 538 nmol/L, dolny wykres – roztwór standardu (HTL – pik nr 3) [55].

Kolejna metoda oznaczania HTL w moczu człowieka, była pierwszą w której wykorzystywano derywatyzację kolumnową w trakcie analizy chromatograficznej [98]. W skład procedury oznaczania wchodziły przygotowanie próbki do badań poprzez ekstrakcję SPE, rozdzielanie chromatograficzne, kolumnowa derywatywacja analitu za pomocą OPA oraz detekcja fluorymetryczna. Próbkę moczu, które do badań pobrano od zdrowych ochotników w wieku 30 – 57 lat, przechowywano do czasu analizy w 10 mL porcjach w temperaturze $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Procedura przygotowania próbki do analizy była następująca: do 2 mL moczu dodano 200 μL 0,2 mol/L buforu fosforanowego o $\text{pH} = 7,7$ i wymieszano. Otrzymaną mieszaninę naniesiono na kolumnienki do SPE z wypełnieniem typu C-18, które przed użyciem kondycjonowano 2 mL 2-propanolu, 1 mL 0,2 mol/L buforu fosforanowego o $\text{pH} = 7,7$. Po naniesieniu próbki, w celu wymycia zanieczyszczeń, złożę kolumnienek przemyto 250 μL 0,02 mol/L HCl w 50% wodnym roztworze metanolu. Elucję HTL przeprowadzono stosując 250 μL 0,02 mol/L HCl w 70% wodnym roztworze ACN, po czym pobrano 20 μL otrzymanego roztworu i wprowadzono na kolumnę chromatograficzną. Podczas analiz chromatograficznych stosowano chromatograf cieczowy z automatycznym dozownikiem próbek, kolumnę chromatograficzną typu PRP-1 o wymiarach $150 \times 4,6\text{ mm}$ i średnicy ziaren wypełnienia 5 μm , elucję izokratyczną, gdzie faza ruchoma składała się z 0,01 mol/L OPA w 0,1 mol/L NaOH oraz 30% ACN, a jej prędkość przepływu wynosiła 1 mL/min. Podczas separacji chromatograficznej stosowano następujące parametry detekcji spektrofluorymetrycznej: długość fali wzbudzenia 370 nm, długość fali emisji 480 nm. Przeprowadzono walidację metody, podczas której wyznaczono linowość, precyzję, dokładność, wartość LOQ oraz specyficzność metody. Sporządzono siedmiopunktową krzywą kalibracyjną w zakresie stężeń HTL 20 - 3000 $\mu\text{mol/L}$ moczu, wykorzystując zależność

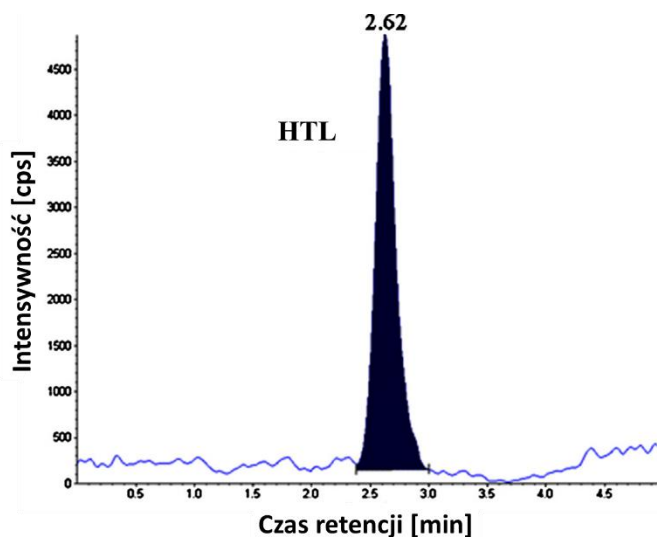
wysokości sygnału względem stężenia analitu. Wyznaczona zależność, w badanym zakresie stężeń, wykazała charakter liniowy. Na jej podstawie wyznaczono równanie prostej w postaci $y = 0,0195 \cdot x + 1,3$, a wartość kwadratu współczynnika korelacji liniowej wyniósł $R^2 = 0,9986$. Precyzję oraz dokładność metody wyznaczono dla trzech stężeń reprezentujących cały zakres krzywej kalibracyjnej, gdzie wartość pierwszego stężenia była bliska początku zakresu zależności, drugie w jego połowie, a trzecie blisko końca zakresu. Próbki moczu były przygotowane pięciokrotnie w ten sam sposób jak opisano powyżej, przy czym do próbki moczu dodano odpowiednią ilość standardu HTL, aby jego stężenia wynosiły 0,025, 1,500, 2,800 $\mu\text{mol/L}$ moczu. Na podstawie uzyskanych wyników precyzja metody nie przekraczała 6,5%, a dokładność metody mieściła się w zakresie 96,3 - 106,1%. Wartość LOQ wyznaczono metodą pomiaru stosunku sygnału do szumu S/N, gdzie S oznacza wartość wysokości sygnału, a N wartość wysokości szumu. Specyficzność metody wyznaczono poprzez doszczepienie próbki moczu metabolicznie powiązаныmi tiolami, takimi jak: cysteiną, cysteinyloglicyną, glutationem, γ -glutamylcysteiną, lizyną, leucyną, tryptofanem, treoniną, kwasem glutaminowym, seryną, alaniną oraz metioniną, a uzyskany chromatogram oceniono wizualnie poprzez zidentyfikowanie sygnałów pochodzących od dodanych składników. Przy zastosowaniu warunków kolumnowej derywatywacji analitów, widoczny był tylko sygnał pochodzący od HTL. Opracowaną metodę oznaczania HTL w moczu człowieka zastosowano do analizy próbek rzeczywistych. Stężenia HTL w moczu pobranym od 15 osób mieściły się w zakresie od 0,025 do 0,297 $\mu\text{mol/L}$ moczu, a wartość średnia wyniosła $0,103 \pm 0,089$ $\mu\text{mol/L}$ moczu. Uzyskane reprezentatywne chromatogramy uzyskane po analizie moczu człowieka przedstawiono na **rysunku 16**.



Rys. 16. Reprezentatywne chromatogramy uzyskane po analizie moczu człowieka. 1 – mocz doszczepiony 0,4 $\mu\text{mol/L}$ HTL, 2 – próbka moczu bez doszczepienia, 3 – próbka moczu inkubowana w roztworze NaOH oraz H_2O_2 [98].

Kolejną znaną chromatograficzną metodą oznaczania HTL w ludzkim osoczu była pierwsza, która wykorzystywała chromatograf cieczowy sprzężony z tandemowym detektorem spektrometrii mas (LC-MS/MS) [99]. W procedurze oznaczania zastosowano następujące etapy przygotowania próbki: ekstrakcję mieszaniną ACN i wody (zawierającą 1% siarczanu(VI) cynku) w stosunku 70:30, rozdzielanie chromatograficzne oraz detekcję za pomocą spektrometru mas. Próbkę osocza uzyskane z lokalnego centrum krwiodawstwa były przechowywane w temperaturze $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ do czasu prowadzenia eksperymentów. Procedura przygotowania próbki była następująca: do $20\text{ }\mu\text{L}$ osocza dodano $200\text{ }\mu\text{L}$ roztworu ekstrakcyjnego (ACN:1% wodny roztwór ZnSO_4 , 70:30), a otrzymaną mieszaninę wytrząsano przez 1 min, po czym odwirowano przy $7\ 840 \times g$ przez 10 min. Podczas analiz chromatograficznych korzystano z następujących parametrów pomiarowych: chromatograf cieczowy sprzężony z tandemowym detektorem spektrometrii mas, wyposażony w automatyczny podajnik próbek, do rozdzielania chromatograficznego stosowano kolumnę typu HILIC o wymiarach $50\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$, średnica ziaren wypełnienia $3,5\text{ }\mu\text{m}$. Temperatura kolumny wynosiła $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Faza ruchoma składała się z dwóch składników, gdzie składnikiem **A** był ACN z 0,1% kwasem mrówkowym, a składnikiem **B** była woda z 0,1% kwasem mrówkowym. Podczas separacji stosowano elucję gradientową w trakcie której zawartość składnika **A** malała z 70% do 50% przez 5 min, po czym wzrastała z powrotem do 70% w ciągu 4 min, a na koniec pozostawiono układ chromatograficzny przy takim składzie fazy na 5 min. Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła $0,5\text{ mL/min}$, a do analizy pobierano $20\text{ }\mu\text{L}$ supernatantu. Z kolei parametry detektora MS jakie stosowano podczas rozdzielania chromatograficznego były następujące: jonizacja poprzez elektrorozpylanie w dodatnim trybie jonizacji, napięcie jonizacji 5500 V , temperatura $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, podczas oznaczeń ilościowych monitorowano dwa rodzaje jonów, tj. molekularny oraz fragmentacyjny dla HTL których m/z wynosiły odpowiednio 118 i 56. Walidację prezentowanej metody przeprowadzono poprzez wyznaczenie liniowości, wartości LOQ oraz LOD, dokładności oraz precyzji metody. Kalibrację metody przeprowadzono poprzez wzbogacenie osocza znaną ilością HTL, aby uzyskać jego końcowe stężenia w zakresie od $0,5$ do $32,5\text{ }\mu\text{mol/L}$ osocza. Otrzymana zależność wykazała charakter liniowy, dla której współczynnik korelacji R^2 wyniósł 0,995. Wyznaczona przez eksperymentatorów granica oznaczalności wyniosła dokładnie $0,5\text{ }\mu\text{mol/L}$ osocza, którą zdefiniowano jako stężenie, które wyznaczono z dokładnością 80 - 120% i precyzją $<20\%$. Eksperymentalnie wyznaczona wartość LOD wynosiła natomiast $0,105\text{ }\mu\text{mol/L}$. Wewnątrz- oraz międzydniowa precyzja mieściła się w zakresach odpowiednio 6,49 - 13,56 % oraz 6,98 - 13,37%, zaś wewnątrz- oraz międzydniowa dokładność metody wyniosła odpowiednio 96,79 - 106,61%

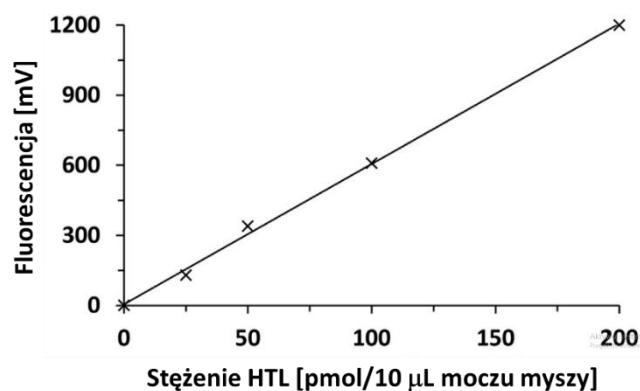
oraz 98,84 - 111,54%. Podczas oznaczeń HTL w próbkach rzeczywistych krew pobrano od sześciu zdrowych ochotników do probówek zawierających EDTA. Osocze zostało oddzielone od krwi poprzez odwirowanie przez 10 min przy $1960 \times g$, po czym przygotowane zgodnie z powyżej opisaną procedurą. Wyznaczona zawartość HTL w ludzkim osoczu mieściła się w zakresie od 0,11 do 0,25 $\mu\text{mol/L}$ osocza. Na **rysunku 17** przedstawiono reprezentatywny chromatogram próbki osocza zdrowego ochotnika.



Rys. 17. Reprezentatywny chromatogram próbki osocza zdrowego ochotnika [99].

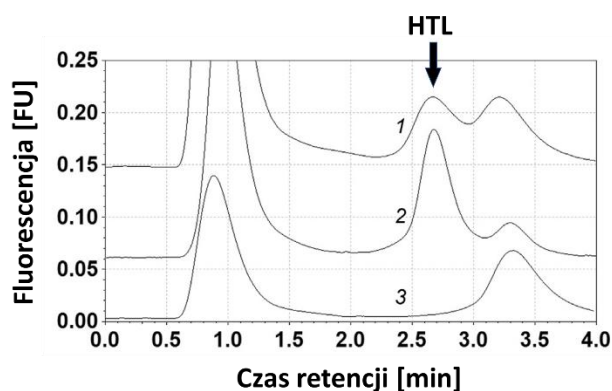
Ostatnią z opisywanych metod jest chromatograficzna metoda oznaczania HTL w moczu myszy, która wykorzystywała kationowymienną odmianę chromatografii ciekowej [100]. Procedura przygotowania próbki moczu była następująca: w pierwszej kolejności w celu zubożenia dodatkowo naładowanej kwasowej postaci cząsteczki HTL do 10 μL moczu dodano 10 μL 1 mol/L K_2HPO_4 . Całość utrzymywano w niskiej temperaturze za pomocą lodu. Następnie do otrzymanej mieszaniny dodano 100 μL lodowatego roztworu ekstrakcyjnego składającego się z chloroformu i metanolu w stosunku 2:1 (v/v), po czym całość wytrząsano przez 5 min. Dolną warstwę organiczną (chloroformową) zebrano do innej probówki, do której potem dodano 100 μL 0,1 mol/L HCl i ponownie wytrząsano przez 5 min. W następnej kolejności odczekano chwilę w celu rozdzielenia fazy wodnej od fazy organicznej. Górną fazę wodną zebrano do nowej probówki i poddano odparowaniu za pomocą koncentratora próżniowego w temperaturze 70 $^\circ\text{C}$ przez 40 min. Pozostałość po odparowaniu rozpuszczono w 50 μL wody, z czego pobrano 5 μL otrzymanego roztworu, który wprowadzono do układu chromatograficznego. Podczas analiz chromatograficznych stosowano następujące parametry pomiarowe: chromatograf ciekowy wyposażony w automatyczny podajnik próbek, zaawansowany moduł

dostarczania fazy ruchomej, spektrofotometryczny detektor UV-Vis z matrycą diodową o wysokiej rozdzielczości, a także ręczny zawór dozujący typu Rheodyne, którego pętla miała objętość 0,1 mL. Do rozdzielania chromatograficznego stosowano kationowymienną kolumnę polisulfoetyloaspartamidową o wymiarach 35 mm × 2 mm, średnica ziaren wypełnienia 5 μm, a wielkość porów 300 Å. Podczas separacji stosowano elucję izokratyczną stosując fazę ruchomą składającą się z roztworu buforu fosforanowego o stężeniu 10 mmol/L i pH = 6,6, zawierającego 30 mmol/L NaCl, przy czym prędkość przepływu ustawiono na 0,6 mL/min. Po separacji chromatograficznej HTL został poddany derywatywacji pokolumnowej za pomocą odczynnika derywatyżującego OPA o stężeniu 2,5 mmol/L w 0,25 mol/L NaOH. Roztwór OPA dostarczany był za pomocą trójnika z prędkością przepływu 0,3 mL/min. Następnie mieszanina trafiała do teflonowej rurki reakcyjnej o długości 3 m i średnicy wewnętrznej 0,3 mm i kolejno do detektora fluorymetrycznego, gdzie detekcja wytworzonej pochodnej następowała przy zastosowaniu długości fali wzbudzenia wynoszącej 370 nm i rejestrując emisję promieniowania przy długości fali 480 nm. Kalibrację metody przeprowadzono w zakresie stężeń HTL od 0,2 do 20 μmol/L moczu myszy. Precyzja metody wewnątrzdniowa mieściła się w zakresie 2,7-10,3%, z kolei precyzja metody międzydniowa w zakresie 9,3-13,9%. Na **rysunku 18** przedstawiono uzyskaną krzywą kalibracyjną.



Rys. 18. Zależność fluorescencji od stężenia HTL w moczu myszy [100].

Prezentowaną metodę oznaczania HTL zastosowano do analizy próbek moczu, pobranych od pięciu myszy z genetycznie indukowanym niedoborem enzymu CBS oraz w próbkach moczu pobranych od pięciu zdrowych myszy. Na podstawie uzyskanych wyników u myszy z niedoborem CBS średnia zawartość HTL w moczu wyniosła $10,8 \pm 4,14$ μmol/L. Z kolei w próbkach moczu zdrowych myszy stężenie HTL było poniżej zakresu oznaczalności metody ($<0,2$ μmol/L moczu). Na **rysunku 19** przedstawiono reprezentatywny chromatogram po analizie próbki moczu myszy.

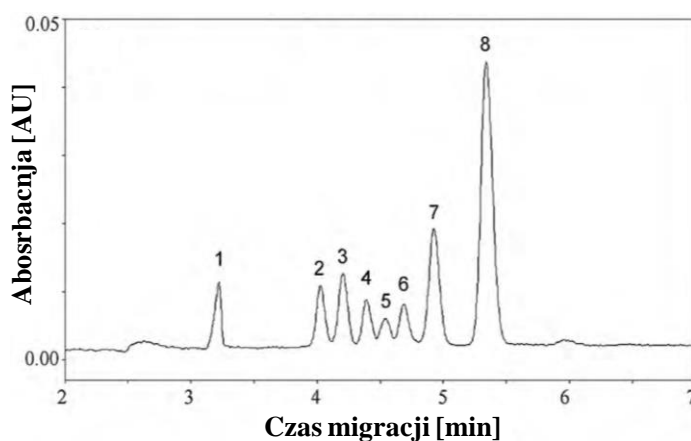


Rys. 19. Reprezentatywne chromatogramy mysiego moczu, gdzie 1 – próbka moczu pobrana od myszy z niedoborem CBS, 2 – próbka moczu pobrana od myszy z niedoborem CBS wzbogacona 20 pmol HTL, 3 – próbka moczu potraktowana 0,1 mol/L NaOH przed analizą HPLC [100].

2.3. Metody elektromigracyjne

Pierwsza elektroforetyczna metoda oznaczania HTL została opracowana do wyznaczenia zawartości tego związku w mieszaninie reakcyjnej [101]. W procedurze oznaczania HTL, który był jednym z składników mieszaniny wykorzystano wodne roztwory standardów, separację poszczególnych analitów za pomocą strefowej elektroforezy kapilarnej (CZE) oraz detekcję spektrofotometryczną. Próbkę stanowił wodny roztwór standardów, z których jednym ze składników był HTL. Celem pracy było rozdzielenie wszystkich składników i jednocześnie oznaczenie poszczególnych związków tiolowych. Podczas analiz elektroforetycznych stosowano następujące warunki i parametry pomiarowe: aparat do elektroforezy kapilarnej wyposażony w automatyczny podajnik próbek oraz detektor spektrofotometryczny, kapilara krzemionkowa o wymiarach: średnica wewnętrzna – 75 μm , długość całkowita – 40 cm (długość efektywna – 30 cm), temperatura kapilary 15 $^{\circ}\text{C}$, objętość wprowadzanej próbki 35 nL (48 mbar przez 7 s). Separację składników prowadzono stosując napięcie 15 kV i dodatkowe ciśnienie wynoszące 7 mbar. Elektrolit podstawowy (BGE) stanowił 40 mmol/L bufortris (2-amino-2-(hydroksymetylo)propan-1,3-diol), który miareczkowano 1 mol/L kwasem fosforowym(V) do uzyskania pH = 1,6. Przed każdą analizą kapilara była płukana w następującej sekwencji: roztworem 0,1 mmol/L HCl przez 0,5 min, po czym roztworem BGE przez 1 min. Detekcję sygnałów pochodzących od HTL rejestrowano stosując długość fali wynoszącą 232 nm. Kalibrację metody przeprowadzono w zakresie stężeń HTL od 0,02 do 2 mmol/L. Otrzymana zależność pola powierzchni względem stężenia HTL wykazała charakter liniowy, gdzie współczynnik korelacji liniowej R^2 wynosił 0,999, a równanie prostej miało następującą postać $y = 21,943 \cdot x - 95$. Sprawdzone również powtarzalność uzyskiwanych pól powierzchni sygnałów analitycznych

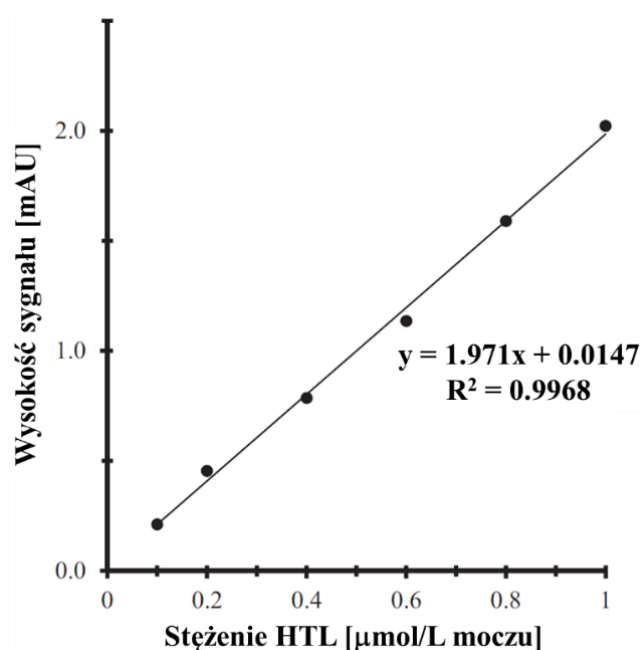
pochodzących od HTL oraz czasów jego migracji przy zastosowaniu dodatkowego ciśnienia podczas analizy elektroforetycznej oraz bez przykładania ciśnienia. Otrzymano większe pola powierzchni sygnałów po analizie, podczas której nie przykładano ciśnienia, lecz czasy migracji analitów były dłuższe. Wyznaczono LOD metodą stosunku sygnału do szumu, który ustalono na 3. Stężenie HTL odpowiadające LOD wynosiło 1 $\mu\text{mol/L}$. **Rysunek 20** przedstawia reprezentatywny elektroforegram uzyskany po analizie mieszaniny reakcyjnej wszystkich analitów.



Rys. 20. Reprezentatywny elektroforegram uzyskany po analizie mieszaniny standardów wszystkich analitów, gdzie 1 - HTL [101].

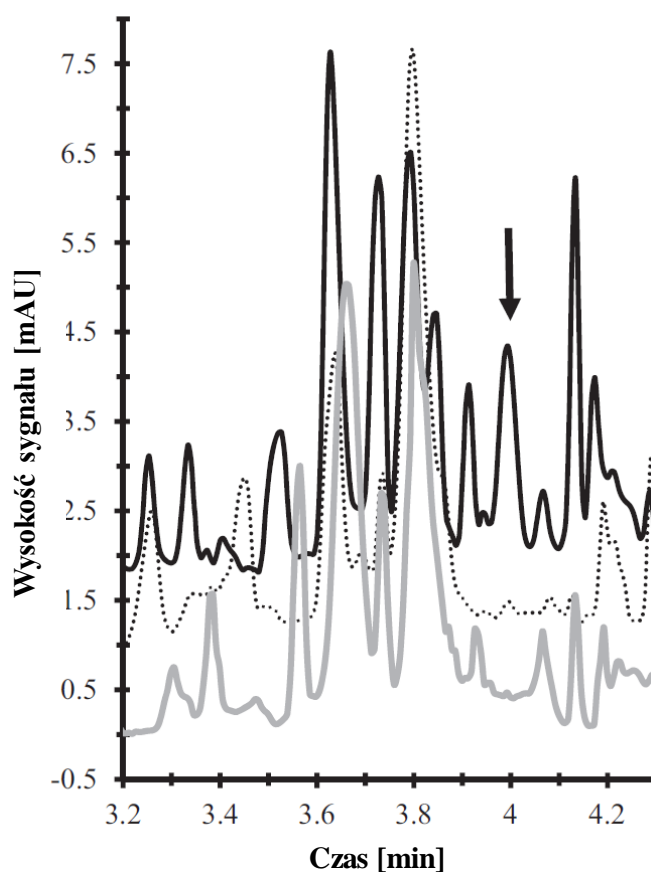
Druga metoda elektroforetycznego oznaczania HTL dotyczyła wyznaczenia zawartości analitu w moczu człowieka [102]. W procedurze tej wykorzystano ekstrakcję ciecz-ciecz jako element przygotowania próbki do analizy, pierwszy etap zatężania z wykorzystaniem spiętrzenia na drodze wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola (FASI), drugi etap zatężania przez zmiatanie za pomocą micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (sweeping-MEKC), rozdzielanie elektroforetyczne wg mechanizmu MEKC oraz detekcję spektrofotometryczną UV-Vis. Próbkę do badań porannego ludzkiego moczu otrzymano od pozornie zdrowych wolontariuszy i przechowywano w temperaturze $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lub analizowano zaraz po pobraniu. Procedura przygotowania próbki była następująca: 300 μL moczu przeniesiono do probówek polipropylenowych o objętości 1,5 mL, dodano 20 μL 0,1 mol/L Na_2HPO_4 i dodano 1,5 mL roztworu ekstrakcyjnego, który stanowiła mieszanina chloroformu i metanolu w stosunku objętościowym 2:1 (v/v). Otrzymaną mieszaninę wytrząsano przez 10 min, którą następnie odwirowano przy $12\ 000 \times g$ przez 1 min. Po czym pobrano 850 μL warstwy chloroformowej, którą przeniesiono do probówki polipropylenowej o objętości 1,5 mL i odparowano do sucha, a otrzymaną pozostałość rozpuszczono w 0,0075 mol/L HCl. Część tak otrzymanego roztworu

wprowadzono do kapilary. Wszystkie analizy elektroforetyczne przeprowadzono stosując następujące warunki i parametry pomiarowe: aparat do elektroforezy kapilarnej wyposażony w automatyczny podajnik próbek oraz detektor spektrofotometryczny, kapilara krzemionkowa o średnicy wewnętrznej 50 μm i długości całkowitej 60 cm (długość efektywna 51,5 cm), temperaturę kapilary ustawiono na 25 $^{\circ}\text{C}$, pomiędzy analizami kapilarę przemywano w następującej kolejności: wodą dejonizowaną przez 1 min, 0,1 mol/L NaOH przez 1 min, ponownie wodą dejonizowaną przez 1 min oraz 5 min za pomocą BGE. Przed analizą kapilarę przemywano 0,1 mol/L buforem fosforanowym o $\text{pH} = 6,0$, następnie próbka została elektrokinetycznie wprowadzona do kapilary przykładając do elektrod napięcie 15 kV przez 20 s, następnie fiołki z roztworem BGE zostały zamienione na roztwór fosforanów o stężeniu 0,1 mol/L i $\text{pH} = 4,75$ zawierający 15% ACN i 0,1 mol/L soli sodowej kwasu dodecylosiarkowego (SDS) i w celu separacji przyłożono napięcie o wartości 20 kV. Analityczna długość fali została ustawiona na 240 nm. Walidację metody przeprowadzono poprzez wyznaczenie liniowości, wartości LOD oraz LOQ, a także precyzji oraz dokładności metody. Kalibrację metody przeprowadzono metodą dodatku wzorca w zakresie stężeń HTL od 0,1 do 1,0 $\mu\text{mol/L}$ moczu, gdzie uzyskana zależność wysokości sygnału względem stężenia analitu wykazała charakter liniowy o równaniu prostej w postaci $y = 1,971 \cdot x + 0,0147$, przy czym współczynnik korelacji liniowej miał postać $R^2 = 0,9968$. Na **rysunku 21** przedstawiono uzyskaną krzywą kalibracyjną do oznaczania HTL w próbkach moczu.



Rys. 21. Krzywa kalibracyjna HTL w próbkach moczu wykonana na podstawie wysokości sygnałów pochodzących od HTL [102].

Wartość LOQ została wyznaczona eksperymentalnie poprzez przygotowanie serii próbek moczu o malejącym stężeniu HTL. Na podstawie wyników eksperymentów LOQ odpowiadało stężeniu HTL, dla którego uzyskano wysokość sygnału analitycznego dziewięciokrotnie większego od wysokości szumu linii podstawowej. Zgodnie z powyższym, dla LOQ stężenie to wyniosło $0,09 \mu\text{mol/L}$ moczu. Wewnątrz- oraz międzylabowa precyzja i dokładność metody mieściły się w zakresie odpowiednio 3,2 - 14,4% (średnio 5,1% oraz 9,3%) oraz 92,5 - 112,6% (średnio 99,8% oraz 99,1%). Przeprowadzono oznaczanie HTL za pomocą opracowanej metody w próbkach moczu u 15 pozornie zdrowych ochotników, a próbki przygotowano zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Zawartość HTL w moczu mieściła się w zakresie od 129 do $0,229 \mu\text{mol/L}$ moczu, gdzie wartość średnia wynosiła $0,17 \pm 0,29 \mu\text{mol/L}$ moczu. Reprezentatywny elektroforegram uzyskany po analizie próbki moczu przedstawiono na **rysunku 22**.



Rys. 22. Reprezentatywne elektroforegramy próbki moczu (linia kropkowana), moczu wzbogaconego $0,100 \mu\text{mol/L}$ HTL (czarna linia) oraz próbki moczu inkubowanego z $0,1 \text{ mol/L NaOH}$ (szara linia) [102].

2.4. Podsumowanie i porównanie metod oznaczania tiolaktonu homocysteiny

Wszystkie opisane wcześniej metody zebrano i przedstawiono w formie **tabeli 1**. Analizując dane zebrane w poniższej tabeli można zauważyć, że większość z metod opiera się na

oznaczaniu HTL w prawdopodobnie najłatwiej dostępnym materiale diagnostycznym tj. w moczu [55, 90, 92, 93, 98, 100, 102]. W czterech procedurach oznaczano HTL w osoczu [91, 96, 97, 99], a w dwóch w ślinie [93, 94]. Spośród opublikowanych metod, aż 11 wykorzystuje w celu separacji techniki chromatografii cieczowej lub gazowej [55, 91-100], tylko dwie bazują na elektroforezie kapilarnej z detekcją UV-Vis [101, 102], natomiast jedna opiera się na wstrzykowej analizie przepływowej [90]. Do metod charakteryzujących się najkrótszymi całkowitymi czasami analizy (uwzględniającymi etap przygotowania próbki), należy procedura HPLC [96] do oznaczania HTL w komórkach bakterii, drożdży, czy ludzkich liniach komórkowych, oraz procedura CE [101] służąca do oznaczania HTL w mieszaninie reakcyjnej. W praktycznie wszystkich procedurach uwzględniono etap przygotowania próbki, najczęściej poprzez przeprowadzenie ekstrakcji LLE lub SPE oraz reakcji derywatyzacji. Metoda GC-MS [91] charakteryzowała się najniższą wartością LOQ wynoszącą 0,0052 $\mu\text{mol/L}$ osocza, z kolei najszerszy zakres liniowości, wynoszący od 0,0001 do 0,5 $\mu\text{mol/L}$ moczu otrzymano dla procedury oznaczania HTL w ludzkim moczu [55].

Tabela 1. Podsumowanie i porównanie metod oznaczania HTL.

Technika analityczna	Metoda przygotowania próbki do analizy	Całkowity czas analizy [min]	LOD [$\mu\text{mol/L}$]	LOQ [$\mu\text{mol/L}$]	Zakres liniowości [$\mu\text{mol/L}$]	Matryca próbki	Rodzaj detekcji
FIA [90]	20-krotne rozcieńczenie próbki + separacja Hcy od HTL za pomocą modyfikowanych nanocząstek złota	40	0,6	2	2 - 30	mocz	FLD
GC [91]	SPE + derywatywacja analitu	50	0,0017	0,0052	0 - 0,4	osocze	MS
GC [92]	LLE + derywatywacja analitu	26	0,005	0,01	0,01 - 0,2	mocz	MS
GC [93]	LLE + derywatywacja analitu	29	Nie podano	0,05	0,05 - 1	mocz	MS
	LLE + derywatywacja analitu	39				ślina	
GC [94]	LLE + derywatywacja analitu	49	Nie podano	0,05	1 - 20	ślina	MS
HPLC [95]	Odbiałczanie, redukcja mostków siarczkowych, derywatywacja on-line	65	Nie podano	0,01	0,01 - 10	ludzkie linie komórkowe	FLD
HPLC [96]	Filtrowanie na membranach cut-off, 2,5-krotne rozcieńczenie supenatantu za pomocą wody o czystości HPLC	10	Nie podano	0,1	0,1 - 500	komórki bakterii, drożdży, ludzkie linie komórkowe	UV-Vis
	Filtrowanie na membranach cut-off	20				osocze	
HPLC [97]	LLE + derywatywacja analitu w trybie on-line	24	0,00036	Nie podano	0,001 - 0,04	osocze	FLD

Tabela 1. Ciąg dalszy.

Technika analityczna	Metoda przygotowania próbek do analizy	Całkowity czas analizy [min]	LOD [$\mu\text{mol/L}$]	LOQ [$\mu\text{mol/L}$]	Zakres liniowości [$\mu\text{mol/L}$]	Matryca próbek	Rodzaj detekcji
HPLC [55]	SPE + derywatywacja	Podano tylko czas trwania analizy chromatograficznej – 8 min	Nie podano	Nie podano	0,0001 - 0,5	mocz	FLD
HPLC [98]	SPE + derywatywacja	Podano tylko czas trwania analizy chromatograficznej – 2,2 min	Nie podano	0,02	0,02 - 3	mocz	FLD
HPLC [99]	LLE	14	0,105	0,5	0,5 - 32,5	osocze	MS
HPLC [100]	LLE + derywatywacja	53	Nie podano	Nie podano	0,2 - 20	mocz myszy	FLD
CE [101]	–	7	1	Nie podano	20 - 2000	mieszanka reakcyjna	UV-Vis
CE [102]	LLE	42	Nie podano	0,09	0,1 - 1	mocz	UV-Vis

3. Elektroforeza kapilarna

3.1. Podstawy teoretyczne

Techniki elektroforetyczne są znane niemalże na całym świecie i znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach badań naukowych, m. in. biologicznych czy chemicznych, oraz wykorzystywane są w rutynowych analizach zarówno klinicznych, farmaceutycznych jak i środowiskowych. Ale po raz pierwszy termin „elektroforeza” został sformułowany w 1909 r., który zdefiniowano ruchem naładowanych cząstek pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego. Odkrywcą tej techniki separacyjnej był Leonor Michaelis [103]. Z kolei w 1937 r. pierwszym, który zastosował elektroforezę do rozdzielania składników mieszaniny białek był Arne Wilhelm Kaurin Tiselius. Dzięki swojej pracy 11 lat później otrzymał Nagrodę Nobla za osiągnięcia w dziedzinie chemii [104]. Przełomowym momentem w rozwoju elektroforezy kapilarnej był 1967 rok, kiedy to Stellan Hjertén zastosował szklane kapilary, dodatkowo zmodyfikowane metylocelulozą, o średnicy wewnętrznej 3 mm, co pozwoliło mu na wyeliminowanie przepływu elektroosmotycznego i nadmiernego wydzielania ciepła [105, 106]. Dalsze badania potwierdziły zasadność stosowania kapilar o małych średnicach wewnętrznych. W 1983 roku James Wallace Jorgenson i Kryn DeArman Lukacs wykorzystali kapilary wykonane z krzemionki, których średnica wewnętrzna wynosiła poniżej 100 μm . Dzięki zastosowaniu tak niewielkiej średnicy jak na tamte czasy, osiągnęli wysoką wydajność rozdzielania, a na podstawie uzyskanych wyników eksperymentów opisali teoretyczne aspekty analizy elektroforetycznej [107]. Kolejny ważny krok w kierunku rozwoju techniki elektroforezy miał miejsce w 1984 r., kiedy to Shigeru Terabe zastosował dodatek w postaci środków powierzchniowo czynnych do sporządzania BGE. Odpowiednie stężenie środka powierzchniowo czynnego skutkowało tworzeniem się miceli jonowych w roztworze wodnym, co umożliwiała rozdzielanie analitów obojętnych, czyli takich, które nie posiadały ładunku elektrycznego w swojej cząsteczce lub których ładunki dodatnie i ujemne znajdujące się w cząsteczce kompensują się wzajemnie [108].

Za pomocą technik elektromigracyjnych rozdzielanie analizowanych składników próbki możliwe jest dzięki przykładanemu napięciu, które powoduje wystąpienie dwóch zjawisk elektrokinetycznych – elektroforezy i elektroosmozy. Pierwsze zjawisko dotyczy ruchu jonów w polu elektrycznym, kiedy to kationy migrują w stronę katody, a aniony w kierunku anody. Dzięki elektroosmozie następuje natomiast przepływ całej objętości cieczy przez kapilarę w wyniku zastosowanego pola elektrycznego. W większości przykładów zastosowań elektroforezy kapilarnej, rozdzielanie mieszaniny składników próbki odbywa się w roztworze wodnym zwanym buforem podstawowym - BGE. W kapilarze wypełnionej BGE podczas przykładania napięcia na jon działają dwie siły, z których pierwsza to siła elektrostatyczna, a druga to skierowana

przeciwnie siła tarcia. W oparciu o prawo Stokesa cząsteczki, na które działa siła tarcia, traktowane są jako kula. Podczas elektroforezy siły elektrostatyczne i tarcia są w równowadze. Biorąc powyższe pod uwagę, otrzymuje się równanie 2, gdzie ruchliwość elektroforetyczna jest proporcjonalna do ładunku cząstki i odwrotnie proporcjonalna do jej promienia. Dzięki temu otrzymujemy równanie 3 na prędkość elektroforetyczną poszczególnych jonów:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi r \eta} \quad (2)$$

$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E \quad (3)$$

Zgodnie z **równaniem 2** rozdzielanie naładowanych cząstek następuje dzięki różnicy w ich ruchliwościach elektroforetycznych, czyli stosunkowi ładunku do wielkości, co jest podstawą technik elektromigracyjnych. Równanie to dowodzi, że ruchliwość elektroforetyczna jest większa dla małych cząstek o dużym ładunku i mniejsza dla dużych cząstek o małym ładunku, a ruchliwość cząstek nie mających ładunku jest równa zero, ponieważ $q = 0$. A zatem dla elektrolitu podstawowego o danym pH i stężeniu ruchliwość elektroforetyczna danego jonu jest wielkością charakterystyczną i niezmienną [109, 110].

Najczęściej stosowanym rodzajem kapilar są kapilary wykonane ze stopionej krzemionki, o niezmodyfikowanej chemicznie ścianie wewnętrznej. W takiej kapilarze, która jest wypełniona BGE o odpowiednim stężeniu oraz pH zazwyczaj wyższym niż 7, kierunek przepływu elektroosmotycznego (EOF), czyli ruchu całej objętości cieczy wypełniającej kapilarę wywołanego różnicą potencjałów, odbywa się w kierunku od anody do katody. Zjawisko EOF jest możliwe dzięki obecności ładunku ujemnego zlokalizowanego na wewnętrznej powierzchni ściany kapilary. W zależności od pH elektrolitu wypełniającego kapilarę ujemny ładunek na wewnętrznej ścianie kapilary powstaje poprzez oderwanie protonów z grup silanolowych zgodnie z poniższym równaniem [111].



Ujemnie naładowana ściana kapilary przyciąga kationy roztworu BGE wypełniającego kapilarę. W wyniku tego tworzy się trwała warstwa, zwana warstwą Sterna. Pomimo to nie wszystkie ładunki na powierzchni kapilary są kompensowane, co prowadzi do powstania drugiej warstwy, tzw. dyfuzyjnej, która jest słabiej związana z powierzchnią kapilary. Tylko jony z warstwy dyfuzyjnej biorą udział w zjawisku elektrokinezy, czyli EOF, ponieważ jony te ulegają ciągłej wymianie z jonami BGE z głębi roztworu [112].

Dzięki istnieniu EOF możliwe jest jednoczesne rozdzielanie oraz oznaczanie kationów i anionów w trakcie trwania jednej analizy. Innymi słowy, jeżeli ruchliwość elektroosmotyczna (μ_{EOF}) jest większa i w kierunku przeciwnym do ruchliwości elektroforetycznej anionów ($\mu_{ep}^{(-)}$), to wszystkie jony zawarte w próbce będą poruszać się w tym samym kierunku, ale z różną prędkością [113, 114]. Zgodnie z powyższym, do detektora będą najpierw migrowały kationy, których ruchliwość pozorna jest sumą ruchliwości elektroforetycznej kationu i ruchliwości EOF zgodnie z poniższym równaniem:

$$\mu_{obs}^{(+)} = \mu_{ep}^{(+)} + \mu_{EOF} \quad (5)$$

Kolejne do detektora będą migrowały nierozdzielone cząsteczki obojętne, których ruchliwość pozorna jest taka sama jak ruchliwość EOF:

$$\mu_{obs}^{(0)} = \mu_{EOF} \quad (6)$$

Z kolei aniony migrują na końcu, ponieważ ich ruchliwość pozorna jest równa różnicy ruchliwości elektroforetycznej anionu i EOF, zgodnie z poniższym równaniem:

$$\mu_{obs}^{(-)} = \mu_{EOF} - \mu_{ep}^{(-)} \quad (7)$$

W przypadku gdy oznaczanymi analitami są aniony, których czasy migracji mogą być bardzo długie ze względu na "normalny" kierunek EOF (od anody do katody), istnieje możliwość odwrócenie kierunku przepływu EOF w celu skrócenia czasu analizy anionów. Odwrócenie EOF można uzyskać poprzez chemiczną lub dynamiczną modyfikację wewnętrznej ściany kapilary za pomocą odpowiedniego modyfikatora, który oddziałując z wewnętrzną ścianą kapilary powoduje zmianę jej ładunku z ujemnego na dodatni, a zmiana kierunku i prędkości EOF zależy od rodzaju i stężenia tego modyfikatora. Aby anionowe anality mogły migrować od wlotu do wylotu kapilary, należy również zmienić polaryzację elektrod w ten sposób, aby anoda znajdowała się za detektorem. W takim przypadku, przy dostatecznie dużym i odwróconym EOF, anality będą migrowały do detektora w następującej kolejności: pierwsze aniony, drugie cząstki obojętne, a ostatnie kationy [114, 115].

3.2. Metody poprawiania czułości w elektroforezie kapilarnej

Ogromną zaletą technik CE jest szybki proces rozdzielania, wysoka rozdzielczość i selektywność, wymaganie małych objętości próbki do analizy, kompatybilność z takimi samymi detektorami jakie stosowane są w aparatach do HPLC oraz duża przepustowość. Jednakże

optymalizując warunki elektroforetyczne w CE, jednym z wielu wyzwań któremu należy sprostać, jest obniżenie granicy wykrywalności (LOD) wyrażonej w jednostkach stężenia (np. $\mu\text{mol/mL}$, ng/mL). Wysokie wartości LOD wynikają z dwóch czynników: ograniczonej długości drogi optycznej w kapilarze, gdy stosowana jest jedna z najpopularniejszych technik detekcji w CE, czyli spektrofotometria UV-Vis, a także małej objętości próbki wprowadzanej do kapilary [116]. Optymalna objętość zastosowanej próbki nie powinna przekraczać 1 - 3% pojemności kapilary, gdyż wprowadzenie większej ilości próbki powoduje tzw. przeładowanie kapilary, czego objawem jest poszerzenie pasm i w konsekwencji znaczne pogorszenie rozdzielczości. Dodatkowo w celu uzyskania wysokiej wydajności i krótkiego czasu analizy, niezbędne jest stosowanie kapilar o małych średnicach wewnętrznych (25 - 100 μm). W kapilarze o przekroju okrągłym rzeczywista długość drogi optycznej zmniejsza się do 80% średnicy wewnętrznej [117], dlatego podjęto wiele prób i wykorzystano różne metody, aby sprostać problemowi niskiej czułości stężeniowej. Są to:

- stosowanie bardzo czułych detektorów, takich jak detektor elektrochemiczny, chemiluminescencyjny czy z laserowo indukowaną fluorescencją (LIF) oraz spektrometr mas [118, 119];
- wydłużenie drogi optycznej poprzez zastosowanie kapilary o specjalnej budowie [120, 121] lub zastosowanie tzw. celki wysokiej czułości [122];
- derywatywacja chemiczna, stosowana po to, aby w wyniku reakcji chemicznej otrzymać pochodną analitu o takich właściwościach, które umożliwiają i/lub ulepszają możliwość jego wykrywania za pomocą danej techniki detekcyjnej. Derywatywacja może być również połączona z innymi technikami zwiększającymi czułość, np. zatężaniem próbki poprzez ekstrakcję, czy zatężaniem w układzie pomiarowym CE [123-125].

Duże znaczenie w polepszaniu czułości stężeniowej w CE mają metody zatężania analitów wewnątrz kapilary. Zjawisko zatężania w kapilarze nazywane jest „spiętrzeniem” (z ang. *stacking*) i opiera się na zmianie prędkości migracji analitów wywołanej zmianami natężenia pola elektrycznego, a także zmianie prędkości migracji analitu uzyskanej innymi sposobami [126]. W mechanizmie zatężania wewnątrz kapilary kluczowym jest obecność efektu elektroforetycznego oraz to, aby anality ulegały zatężaniu na granicy próbka – BGE, ponieważ różnica natężenia pola elektrycznego pomiędzy BGE a próbką powoduje gwałtowne obniżenie prędkości migracji analitów [127].

Derywatywacja w elektroforezie kapilarnej

Derywatyzację stosuje się przede wszystkim w celu zmiany właściwości analitu, aby był kompatybilny z techniką detekcji przeznaczoną do wykrywania danego analitu [128]. Ponadto derywatywacja jest również jedną z technik pozwalającą na osiągnięcie wyższej czułości stężeniowej CE, poprzez przekształcenie związku wykazującego słaby charakter detekcyjny w produkt o znacznie lepszych właściwościach wykrywania [129]. W przypadku stosowania jednej z najpopularniejszych technik detekcji, jaką jest spektrofotometria UV-Vis, derywatywacja ma na celu wprowadzenie do cząsteczki analitu ugrupowania absorbującego promieniowanie, czyli chromoforu. Cząsteczka oznaczanego związku modyfikowana jest w wyniku reakcji chemicznej z odczynnikiem derywatyżującym, otrzymując pochodną analitu o ulepszonych właściwościach absorpcyjnych. Ponadto, w przypadku analizy próbki o skomplikowanej matrycy, w której analit znajduje się w znacznie mniejszym stężeniu niż pozostałe składniki próbki, opracowanie selektywnej metody derywatywacji może zapewnić bardzo czułą detekcję analitu nie wpływając na inne związki zawarte w próbce [130]. Do przeprowadzenia reakcji derywatywacji wymagane jest, aby w cząsteczce występowały grupy funkcyjne, za pomocą których możliwe jest zajście reakcji derywatywacji. Najczęściej są nimi grupy hydroksylowe, karbonylowe, karboksylowe, aminowe oraz grupy tiolowe. Idealna procedura derywatywacji powinna charakteryzować się prostym przygotowaniem próbki, możliwością przeprowadzenia reakcji derywatywacji w środowisku wodnym, najlepiej w temperaturze pokojowej i przy użyciu tanich odczynników, zaś sama reakcja powinna zachodzić w bardzo krótkim czasie, ilościowo oraz jednoetapowo [128, 131-133]. W procedurach wykorzystujących CE, derywatywacja może być przeprowadzona w trzech trybach, tj.:

- poza układem pomiarowym (inaczej w trybie off-line),
- wewnątrz kapilary,
- po rozdzielaniu elektroforetycznym.

Wybór najbardziej odpowiedniego trybu zależy od celu wprowadzenia derywatywacji, liczby próbek do analizy oraz właściwości analitu i odczynnika [134].

Reakcja derywatywacji realizowana w trybie off-line, jest niezależna od rozdzielania, tzn. najpierw przeprowadzana jest derywatywacja, a następnie do kapilary wprowadza się roztwór z uzyskaną pochodną analitu. Niewątpliwą korzyścią derywatywacji wykonanej poza układem separacyjnym jest to, że zapewnia elastyczność co do wyboru odczynnika oraz warunków reakcji. Przeprowadzenie reakcji można wykonać w sposób bardziej kontrolowany i w bardziej rygorystycznych warunkach niż w porównaniu z innymi trybami derywatywacji. Główne wady tego podejścia to natomiast możliwość powstawania produktów ubocznych, utrata czułości

spowodowana rozcieńczeniem próbki, czasochłonność przeprowadzenia procesu derywatywacji, a także konieczność użycia do przeprowadzenia procedury większych objętości próbek i odczynników. Ponadto, należy wziąć pod uwagę, że przy stosowaniu tego typu derywatywacji istnieje ryzyko zmiany kształtu sygnałów, a także wydajności i selektywności separacji (w sposób pozytywny lub negatywny). Oznacza to, że w wyniku przeprowadzenia derywatywacji nie tylko wykrywalność analitów, ale także charakterystyka separacji może zostać zmieniona [135].

Podczas przeprowadzania derywatywacji wewnątrz kapilary, w tzw. trybie on-line, po wprowadzeniu strefy analitu oraz odczynnika derywatywującego do kapilary, do ich mieszania wykorzystuje się dwa zjawiska, tj. dyfuzji oraz różnicę ruchliwości elektroforetycznych. Odczynniki potrzebne do reakcji derywatywacji są przygotowywane i dostarczane w fiolkach kompatybilnych z CE, a cały proces przebiega w sposób automatyczny, zgodnie z wykonaną przez urządzenie sekwencją czynności zaprogramowaną przez eksperymentatora. Do zalet derywatywacji on-line niewątpliwie należy automatyzacja procedury, co minimalizuje prace związane z przygotowaniem próbki, a także niskie zużycie odczynników i próbek. Z tego powodu ten tryb jest odpowiedni dla próbek o bardzo małej objętości, których rozcieńczenie ograniczone musi być do minimum. Ponadto w trybie on-line reakcja derywatywacji zachodzi w bardzo krótkim czasie (zwykle kilka sekund) oraz z wysoką wydajnością. Jednakże osiągnięcie wysokiej wydajności reakcji derywatywacji jest jednocześnie ograniczeniem tej metody, ponieważ wymóg aby reakcja zachodziła szybko i z możliwie jak najwyższą wydajnością, powoduje ograniczony wybór odczynników derywatywujących. Dodatkowo, jeśli reakcja nie zachodzi w sposób całkowity, to nieprzereagowane cząsteczki analitu powinny być oddzielone od pochodnych lub nie dawać sygnału analitycznego [136-138]. Aby uzyskać maksymalną czułość metody warunki derywatywacji muszą zostać odpowiednio zoptymalizowane. Głównymi parametrami podlegającymi optymalizacji są właściwości fizykochemiczne BGE, kolejność wprowadzania odczynników i roztworu próbki, czas oraz sposób mieszania substratów reakcji. W literaturze opisane zostały trzy strategie przeprowadzania derywatywacji wewnątrz kapilary. Pierwsze dwie polegają na wzajemnym przejściu (wymieszaniu) stref próbki oraz odczynnika derywatywującego i obejmują wprowadzenie do kapilary tych stref w odpowiedniej kolejności przed przyłożeniem napięcia. W pierwszym przypadku strefy próbki i odczynnika po wprowadzeniu do wlotowego końca kapilary, pozostawia się do przereagowania w wymaganym czasie, w trakcie ich wzajemnego mieszania na drodze dyfuzji. W drugim przypadku, reakcja derywatywacji zachodzi poprzez wzajemne przenikanie stref analitu i odczynnika pod wpływem pola elektrycznego, zaś mieszanie stref wynika z różnicy ruchliwości elektroforetycznych obydwu składników. Aby

przeprowadzić derywatyzację tym sposobem konieczna jest dobra wydajność derywatywacji, w bardzo krótkim okresie kontaktu analitu z odczynnikiem [139]. Ostatnie podejście do derywatywacji on-line polega na tym, że kapilarę wypełnia się buforem podstawowym, który zawiera dodatek odczynnika derywatywującego, po czym bezpośrednio do kapilary wprowadza się próbkę zawierającą analit i od tego momentu zachodzi reakcja derywatywacji wewnątrz kapilary [140].

W trybie derywatywacji po rozdzielaniu elektroforetycznym, derywatywacja jest przeprowadzana po opuszczeniu kapilary przez rozdzielone składniki próbki, ale przed detekcją. Innymi słowy oznaczane anality są najpierw rozdzielane w kapilarze, a następnie ulegają derywatywacji w specjalnej komorze reakcyjnej. Objętość komory powinna być możliwie jak najmniejsza, aby rozcieńczenie analitu było zminimalizowane [141]. Ponadto kluczowe znaczenie mają tego typu reakcje derywatywacji, które zachodzą w bardzo krótkim czasie. Niewątpliwą korzyścią tego trybu derywatywacji jest znacznie krótszy czas pomiędzy zakończeniem reakcji derywatywacji analitów a detekcją, szczególnie wtedy, gdy otrzymana pochodna wykazuje niską stabilność. Dodatkowo zmniejsza się ryzyko występowania zjawiska niedostatecznie rozdzielonych sygnałów, pochodzących od składników próbki, jak to może mieć miejsce w derywatywacji off- i on-line, gdzie odczynniki do derywatywacji, po wprowadzeniu do kapilary, mogą wpływać na pogorszenie sprawności rozdzielania analitu od składników matrycy próbki [142]. Oprócz zalet przeprowadzania reakcji derywatywacji po separacji elektroforetycznej, istnieją również wady stosowania tego trybu, a są to:

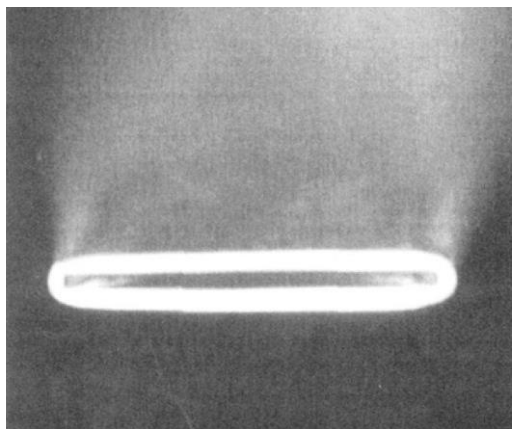
- utrudniony wybór warunków reakcji derywatywacji, które powinny być zgodne z warunkami elektroforetycznymi,
- czas reakcji jest krótszy w porównaniu z innymi trybami derywatywacji, co prowadzi do zwiększenia ryzyka niekompletnego zachodzenia reakcji derywatywacji i w efekcie gorszego efektu polepszania czułości stężeniowej,
- wysoki poziom szumu linii podstawowej,
- właściwości detekcyjne pochodnej analitu powinny być inne niż właściwości odczynnika derywatywującego,
- zastosowanie komory reakcyjnej jest często niekompatybilne z komercyjnym oprzyrządowaniem do CE [142].

Przez wzgląd na wyżej wymienione wady derywatywacja po rozdzielaniu elektroforetycznym jest rzadziej używana.

Technologie budowy kapilar w celu polepszania czułości stężeniowej

Ze względu na swój uniwersalny charakter i łatwość użycia, detekcja UV jest jedną z najpopularniejszych metod wykrywania składników próbki. Niemniej jednak poprzez stosowanie kapilar o średnicy wewnętrznej mniejszej niż 100 μm , występuje znaczna utrata czułości, co jest często przytaczane w literaturze naukowej jako najistotniejsze ograniczenie CE [102, 119, 121, 126]. Jest to rezultat małych objętości próbek wprowadzanych do kapilary (zwykle od 1 do 50 nL) oraz krótkiej drogi optycznej, której długość jest ograniczona średnicą wewnętrzną kapilary. W praktyce jednak długość tej drogi jest dodatkowo zmniejszona w wyniku okrągłego przekroju kapilary. Z tego względu rzeczywista długość ścieżki optycznej wynosi około 80% średnicy wewnętrznej [117]. Aby poprawić czułość analiz CE podjęto kilka prób wydłużenia tej ścieżki w przypadku detekcji UV. Są to: kapilara o prostokątnym przekroju na całej jej długości [143], kapilary z oknem detekcyjnym w kształcie litery Z [144] lub pęcherzyka [117], a także zastosowanie celki wysokiej czułości [145].

Prostokątny przekrój kapilary niesie ze sobą kilka ważnych korzyści. Przede wszystkim chodzi o zwiększenie długości drogi optycznej (**rysunek 23**), a co za tym idzie znacznego polepszenia czułości, ponieważ długość drogi optycznej w tego typu kapilarach jest znacznie dłuższa niż w standardowych (25 - 100 μm) i może dochodzić do 1 mm.

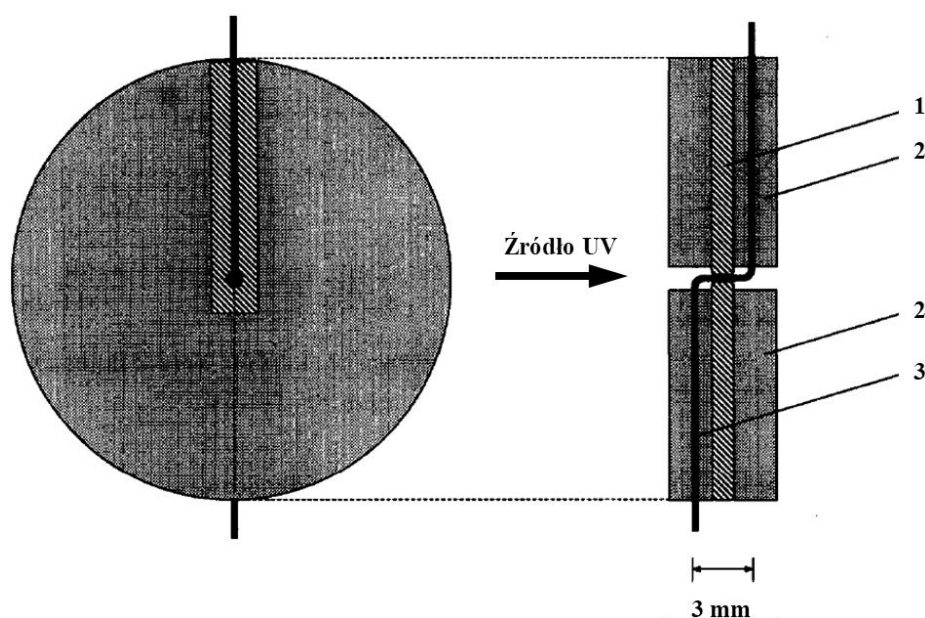


Rys. 23. Fotografia przedstawiająca przekrój prostokątnej kapilary o wymiarach wewnętrznych $50 \times 1000 \mu\text{m}$ i grubości ścian wynoszącej $50 \mu\text{m}$ [143].

Ponadto, ze względu na duży stosunek wysokości do szerokości tego rodzaju kapilary, a co za tym idzie wyjątkowo wysoki stosunek powierzchni do objętości, kapilary prostokątne są niezwykle wydajne w rozpraszaniu ciepła w porównaniu z konwencjonalnymi kapilarami okrągłymi [143]. Możliwe jest również wprowadzanie znacznie większych objętości próbek do kapilary. Dla przykładu do powszechnie stosowanych okrągłych kapilar wprowadza się kilka lub

kilkanaście nanolitrow próbki, natomiast przy zastosowaniu kapilar o przekroju prostokątnym objętość ta może wynosić nawet kilkadziesiąt nanolitrow, co również przekłada się na zwiększenie czułości stężeniowej CE [143]. Użycie tego rodzaju kolumn nie jest jednak w rzeczywistości często stosowane, ze względu na wady jakie mają w porównaniu z cylindrycznymi kapilarami, tj. problemy techniczne związane z montażem kapilar w większości komercyjnych urządzeń [146, 147], konieczność optymalizacji zarówno optyki jak i orientacji prostokątnego okna detekcji kapilary dla uzyskania najefektywniejszej przepustowości wiązki światła [146].

Kolejnym rozwiązaniem mającym na celu polepszenie czułości stężeniowej, jest zastosowanie kapilar z oknami detekcyjnymi w kształcie litery Z. Schemat budowy tego rozwiązania przedstawiono na **rysunku 24**.

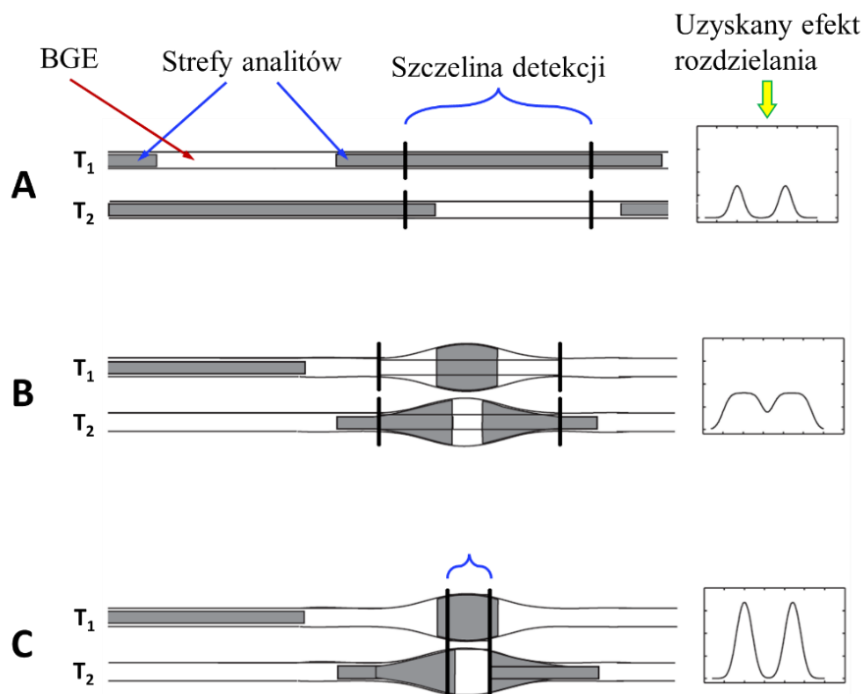


Rys. 24. Schemat budowy kapilary z oknem detekcyjnym w kształcie litery Z, którego długość wynosi 3 mm. (A) widok od góry; (B) widok przekroju okna detekcyjnego. 1 – spiek tlenku glinu z przelotem o średnicy 300 μm ; 2 – dyski z tworzywa sztucznego; 3 – kapilara o średnicy wewnętrznej 50 lub 75 μm [144].

Zgodnie z powyższym rysunkiem kapilara oraz jej okno detekcyjne umieszczone jest w specjalnej okrągłej obudowie. W miejscu detekcji znajduje się otwór, który umożliwia swobodne przechodzenie wiązki światła spolaryzowanego wzdłuż osi kapilary. Okno detekcyjne zbudowane w ten sposób ma długość 3 mm. Takie rozwiązanie, w porównaniu z konwencjonalną kapilarą o średnicy wewnętrznej 50, 75 lub 100 μm , znacznie podwyższa czułość stężeniową techniki CE [144]. Wzrost czułości w tego typu konstrukcjach jest jednak ograniczony przez stosunkowo wysoki szum tła, spowodowany mniejszą przepuszczalnością wiązki światła spolaryzowanego przez wygiętą część kapilary, przez co maksymalny potencjał wzrostu czułości

tą metodą nie jest osiągnięty. Ze względu na dłuższą drogę optyczną zdolność rozdzielcza układu jest zmniejszona, co może powodować problemy z prawidłową separacją migrujących blisko siebie związków. Aby temu zapobiec odległość między pikami powinna wynosić co najmniej jednokrotność długości drogi optycznej. Wadą tej metody jest również koszt, ponieważ zaleca się dedykowane kapilary do konkretnego typu analizy [144, 148].

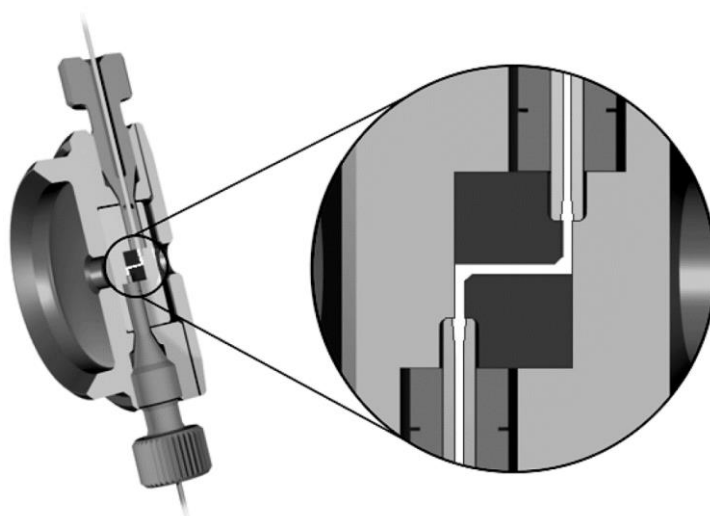
Innym rodzajem kapilar o zwiększonej długości drogi optycznej są kapilary, w których fragment gdzie zachodzi detekcja, jest w kształcie „pęcherzyka” [117]. Kapilara z pęcherzykiem została wprowadzona przez jednego z znanych producentów CE. Została ona wykonana poprzez utworzenie rozszerzonego obszaru, w postaci pęcherzyka, bezpośrednio wewnątrz kapilary w miejscu gdzie zachodzi detekcja. W tym miejscu kapilary uzyskuje się wydłużoną drogę optyczną. Następuje tutaj płynny przyrost średnicy kapilary od jej standardowego odcinka do najszerszej części w miejscu pęcherzyka, który ma średnicę od trzech do pięciu razy większą od średnicy kapilary. W obszarze pęcherzyka opór elektryczny jest zmniejszony, a tym samym pole elektryczne jest zmniejszone, co powoduje, że gdy strefa próbki wchodzi w obszar pęcherzyka, jej prędkość zmniejsza się, w wyniku czego strefa analitu jest ściskana osiowo, ale poszerza się promieniowo (**rysunek 25**). Pomimo zmiany kształtu strefy analitu w obszarze pęcherzyka stężenie analitu pozostaje takie samo [149, 150].



Rys. 25. Kompresja stref próbek w detekcyjnej celce pęcherzykowej oraz wpływ wymiarów szczeliny okna detekcyjnego na rozdzielanie elektroforetyczne: A – standardowa kapilara o standardowych wymiarach szczeliny, B – kapilara z pęcherzykiem o standardowych wymiarach szczeliny, C – kapilara z pęcherzykiem o zwężonej szczeliny [149].

Choć objętość pęcherzyka jest znacznie większa niż miejsce detekcji w standardowej kapilarze, to rozdzielczość pozostaje praktycznie niezmienną, gdyż szczelina okna detekcji jest dostosowana do wielkości pęcherzyka. Co ważne, w obszarze pęcherzyka nie występuje przepływ turbulentny czy laminarny, ani żaden inny mechanizm poszerzania strefy. Jest to spowodowane przede wszystkim przez charakterystyczny dla CE płaski profil przepływu buforu podstawowego wypełniającego kapilarę, czyli przepływu elektroosmotycznego, który powstaje w wyniku obecności ujemnego ładunku na ścianach kapilary. Dodatkowo, nie występuje negatywny wpływ ciepła Joule'a w pęcherzyku, ponieważ zarówno natężenie pola elektrycznego, jak i ilość wytworzonego ciepła są pomniejszone [117, 150].

Jednym z ostatnich rozwiązań mających na celu polepszenie czułości stężeniowej CE jest celka wysokiej czułości, w której podobnie jak we wcześniej omawianych kapilarach, miejsce detekcji zaprojektowano w kształcie litery Z aby wydłużyć drogę optyczną [145]. Celka wysokiej czułości to specjalnie skonstruowany interfejs optyczny, w którym powierzchnia okna detekcji, na którą pada światło jest płaska i wynosi $100\ \mu\text{m}^2$, a długość drogi optycznej jest równa 1,2 mm, natomiast objętość całkowita celki to 12 nL. Schemat takiej celki przedstawiono na **rysunku 26**.



Rys. 26. Schemat budowy celki wysokiej czułości [141].

Kapilara separacyjna jest połączona z celką za pomocą zakręcanych złączek i małych uszczelnień, co ułatwia również jej łatwą wymianę, która zajmuje kilka minut. Celka jest zaprojektowana dla kapilar o średnicy wewnętrznej $75\ \mu\text{m}$, które są rozszerzane do $100\ \mu\text{m}$ w miejscu połączenia z komorą przepływową okna detekcyjnego. Takie rozwiązanie ma na celu wyeliminowanie obecności objętości martwej pomiędzy kapilarą a komorą przepływową. Za pomocą celki wysokiej czułości uzyskiwany jest 20-krotny wzrost sygnału w porównaniu do

standardowej kapilary o średnicy wewnętrznej 75 μm , co przekłada się na 10-krotny wzrost czułości. Z kolei w porównaniu do kapilary w kształcie litery Z w miejscu detekcji, wyeliminowany został efekt rozpraszania światła w miejscach zgięcia celki detekcyjnej [145, 148].

Elektroforetyczne techniki zatężania

Obecnie stosuje się wiele technik zatężania analitu w układzie pomiarowym CE, aby poprawić jej czułość stężeniową oraz znacznie obniżyć LOD. W technikach tych zatężenie zachodzi w miejscu wlotu do kapilary lub w jej wnętrzu, przy czym należy mieć na uwadze to, że etap zatężania występuje bezpośrednio przed separacją i detekcją. Zjawisko to można uzyskać poprzez wprowadzenie dużej objętości roztworu próbki, a następnie spiętrzenie strefy analitu w wąskie pasmo przy użyciu efektów chromatograficznych i/lub elektroforetycznych. Elektroforetyczne techniki zatężania pełnią szczególną rolę w polepszaniu czułości stężeniowej CE, ponieważ dzięki ich zastosowaniu uzyskiwany jest wysoki stopień zatężenia analitów, charakteryzują się prostotą wykonania, a przy tym nie ma konieczności modyfikacji posiadanej aparatury. Techniki te obejmują dwie odmiany, tj. spiętrzenie i zmiatanie. Elektroforetyczne techniki zatężania zazwyczaj realizowane są pojedynczo, ale możliwe jest również wykorzystanie kilku z nich w trakcie przeprowadzania jednej analizy [151].

Literatura opisująca wszystkie możliwe techniki zatężania w układzie pomiarowym CE szczegółowo opisuje sposób ich wykonania oraz zastosowanie [152-154]. Poniżej wymieniono i krótko scharakteryzowano elektroforetyczne techniki zatężania w kapilarze, ale jedynie te które wykorzystują mechanizm kapilarnej elektroforezy strefowej, ponieważ ta odmiana elektroforezy była stosowana w ramach badań eksperymentalnych prezentowanej rozprawy doktorskiej.

Spiętrzenie ze wzmocnieniem pola (FASS)

Technika ta uważana jest za jedną z najprostszych technik zatężania, gdzie próbka jest przygotowywana w buforze charakteryzującym się niską przewodnością, znacznie mniejszą od BGE, który posiada wysokie przewodnictwo. Określoną objętość przygotowanej w ten sposób próbki, wprowadza się hydrodynamicznie do kapilary wypełnionej BGE. Następnie przykładane jest wysokie napięcie o dodatniej polaryzacji, w wyniku czego w strefie próbki pojawia się wysokie natężenie pola elektrycznego. W konsekwencji obserwuje się szybki wzrost prędkości migracji jonowych analitów. Gdy jony te osiągną granicę strefy próbki-BGE, gwałtownie zmniejsza się prędkość jonów, ponieważ w strefie BGE jest niższe natężenie pola elektrycznego. W wyniku gwałtownej zmiany prędkości poruszania się anality ulegają ułożeniu w wąską strefę, czyli ulegają spiętrzeniu [155].

Spiętrzanie na drodze wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola (FASI)

W tej technice anality z próbki wprowadza się do kapilary sposobem elektrokinetycznym. Dzięki temu posiada ona ważną zaletę – jony analitu wprowadzane są do kapilary w wyniku połączenia dwóch zjawisk: elektroforezy i elektroosmozy. W zależności od polaryzacji elektrod oraz wielkości i kierunku EOF do kapilary będą wprowadzane albo kationy albo aniony. W przypadku gdy ruchliwości analitów występują w tym samym kierunku co ruchliwość przepływu EOF, podczas elektrokinetycznego wprowadzania próbki do kapilary trafi większa ilość jonów analitów niż w FASS. Gdy ruchliwości analitów są natomiast skierowane odwrotnie do EOF, do kapilary wprowadzone będzie mniej jonów analitów niż w dozowaniu hydrodynamicznym. Innymi słowy, aby uzyskać jak największy efekt zateżania techniką FASI, należy tak dobrać polaryzację elektrod oraz kierunek i wielkość przepływu EOF, aby ruchliwość jonów analitu była skierowana zgodnie z EOF. Po wprowadzeniu analitów do kapilary za pomocą FASI następnie przeprowadzana jest separacja elektroforetyczna zgodnie z mechanizmem CZE [156].

Spiętrzanie z dużą strefą próbki (LVSS)

Jest to technika podobna do FASS, przy czym różnica polega na tym, że stosuje się zmianę polaryzacji elektrod w celu zmiany kierunku przepływu elektroosmotycznego. Roztwór próbki przygotowywany jest w buforze o niższym przewodnictwie od BGE. Następnie w wyniku przykładania napięcia przy zastosowaniu odwróconej polaryzacji elektrod, przepływ elektroosmotyczny skierowany jest do wlotu kapilary wypełnionej BGE. Anionowe anality zaczynają migrować do wlotowego końca kapilary, gdzie na granicy strefa próbki – BGE wyhamowują w wyniku różnicy natężenia pola elektrycznego, dzięki czemu ulegają one spiętrzeniu w wąską strefę. Konieczne jest przy tym, aby kontrolować wartość natężenia prądu, ponieważ gdy osiągnie ono 95 - 99 % wartości maksymalnej, należy zmienić polaryzację elektrod, co powoduje odwrócenie kierunku EOF. Następnie rozdzielanie analitów wprowadzonych do kapilary tą techniką przeprowadzane jest zgodnie z mechanizmem CZE. Cząstki naładowane dodatnio oraz obojętne, poruszają się w przeciwnym kierunku w wyniku czego nie zostają wprowadzane do kapilary przed właściwą separacją elektroforetyczną [157].

Spiętrzenie ze wzmocnieniem pola na drodze manipulacji pH

Zateżanie analitów w kapilarze tą techniką wykorzystuje się w przypadku, gdy próbka występuje w postaci skomplikowanej matrycy, czyli o bardzo wysokim przewodnictwie. W przypadku gdy oznaczanymi analitami są kationy, próbka jest wprowadzana do kapilary elektrokinetycznie, przy czym aniony BGE migrują w przeciwnym kierunku niż dodatnio naładowane

anality, kierując się do wlotowego końca kapilary. Po zakończeniu wprowadzania, strefa próbki składa się z kationowych analitów oraz anionów BGE. W następnej kolejności do kapilary wprowadza się strefę kationów silnego kwasu, w wyniku czego jony H^+ miareczkują aniony buforu do elektroforezy co powoduje, że w strefie próbki następuje znaczny spadek przewodnictwa. W dalszym etapie procedura zatężania próbki może następować jak w przypadku FASS lub LVSS. W momencie, gdy oznaczanymi związkami są aniony, do kapilary wprowadza się strefę mocnej zasady, której jony OH^- miareczkują kationy znajdujące się w BGE, uzyskując w ten sposób strefę próbki o niskim przewodnictwie [158].

Spiętrzanie według mechanizmu przejściowej izotachoforezy (tITP)

W technice tej wykorzystuje się unikalną cechę izotachoforezy, tzn. analit ulega zatężeniu do wartości stężenia jonu wiodącego. W praktyce zatężanie analitów techniką tITP przeprowadza się w następujący sposób: do roztworu próbki dodaje się jony o dużej ruchliwości, czyli jony pełniące rolę wiodących. Z kolei jony wchodzące w skład BGE stanowią jony zakańczające. Po hydrodynamicznym wprowadzeniu próbki z jonem wiodącym, przykładane jest napięcie co powoduje wytworzenie pola elektrycznego, w którym anality tworzą wąską strefę typową dla ITP. Następnie, stężenie jonów wiodących maleje w wyniku dyfuzji do strefy BGE, w wyniku czego pole elektryczne staje się jednorodne w całej długości kapilary i w rezultacie ITP płynnie przekształca się w CZE [159].

Spiętrzanie według mechanizmu pseudo przejściowej izotachoforezy (pseudo-tITP)

Technika może być stosowana, gdy próbka zawiera wysokie stężenie soli. Polega ona na tym, że do kapilary hydrodynamicznie wprowadza się dużą strefę próbki, którą wcześniej miesza się z ACN lub innym rozpuszczalnikiem organicznym, najczęściej w stosunku 1:2. Ilość wprowadzanej próbki może wynosić nawet ponad 30% pojemności kapilary. Po przyłożeniu napięcia jony soli gwałtownie poruszają się w strefie ACN, zaś po osiągnięciu granicy strefa próbki – BGE gwałtownie zwalniają. To powoduje, że tworzą się dwa regiony o dużej różnicy pola elektrycznego, tj. niskim w soli i wysokim w ACN. Ponieważ w strefie ACN panuje wysokie natężenie pola, anality doznają dużego przyspieszenia i ulegają spiętrzeniu po osiągnięciu strefy BGE o dużym natężeniu pola. Na końcu, cząsteczki analitów ulegają wniknięciu do BGE, gdzie następuje ich rozdzielanie na zasadach CZE. Najważniejszą zasadą tej techniki jest to, że anality po osiągnięciu stanu równowagi migrują z tą samą prędkością jaką determinuje strefa jonu wiodącego, pochodzącego z soli. Natomiast ACN stanowi pseudo jon zakańczający i pełni on rolę utrzymania analitów w poszczególnych dla siebie strefach oraz zapobieganiu ich dyfuzji [160].

Spiętrzenie na drodze dynamicznego skrzyżowania pH

W tej technice zatężania analitu wykorzystuje się różnicę pH w strefach BGE i próbki, co powoduje znaczną zmianę prędkości migracji analitów, uzyskując efekt spiętrzenia. Dynamiczne skrzyżowanie pH może być stosowane do selektywnego zatężania w kapilarze słabych roztworów elektrolitów, których ładunek i ruchliwość zależy od wartości pH. W przypadku oznaczania anionów, w pierwszej kolejności do kapilary wprowadzana jest sposobem hydrodynamicznym długa strefa próbki, której pH jest niższe niż w BGE. Fiolka zawierająca próbkę zostaje wtedy zamieniona na fiolkę z BGE i przykładane jest wysokie napięcie, co powoduje, że jony OH^- pochodzące z BGE przenikają do strefy próbki. Strefa, gdzie panuje wyższe pH powoduje przyspieszenie niezdisocjowanych słabych kwasów w strefie próbki, dzięki czemu następuje ich spiętrzenie w wąskie pasmo. Różnica pH pomiędzy BGE a strefą próbki panuje przez bardzo krótki czas, kiedy to jony OH^- osiągną koniec strefy próbki. Anality, które poddano spiętrzeniu, są następnie rozdzielane zgodnie z zasadami CZE. Jeśli oznaczanymi związkami są kationy, to stosuje się takie same warunki elektroforetyczne, przy czym wykorzystuje się połączenie odwróconej polaryzacji i odwróconego EOF. Strefa próbki oraz BGE przesuwają się zgodnie z EOF w kierunku anody, z kolei kationowe anality migrują w kierunku odwrotnym, czyli do katody. Na końcu strefy próbki wartość pH wzrasta, ponieważ przenikają do niej jony hydroksylowe pochodzące z BGE. Ponadto anality tracą częściowo ładunek, a ich ruchliwość jest mniejsza i ulegają zatężeniu na granicy BGE – strefa próbki, po czym kationowe anality migrują wraz z EOF w kierunku anody [161].

Techniki ekstrakcyjne

W analizie chemicznej, aspekt przygotowania próbki odgrywa ważną rolę. Rola ta jest szczególnie istotna w przypadku, gdy podczas prowadzonych analiz stosowane są techniki separacyjne, takie jak chromatografia lub elektroforeza. Zastosowanie danej metody przygotowania próbki dotyczy wydzielenia i zatężania analitu oraz oczyszczania próbki z niepożądanych składników matrycy [162-164]. Pomimo wielu poczynionych rozwiązań technologicznych w budowie aparatury pomiarowej, przygotowanie próbki do analizy jest często wymaganym etapem przed instrumentalnym wykrywaniem i oznaczaniem analitów. Powodem tego jest obecność innych składników złożonej matrycy próbki, które wykazują potencjalne następstwa interferencyjne w oznaczaniu badanych związków, szczególnie tych, które występują w śladowych ilościach [165-167]. W celu wydzielenia i zatężania analitów z powodzeniem stosuje się klasyczne techniki ekstrakcyjne, np. ekstrakcję ciecz – ciecz (LLE), czy ekstrakcję do fazy stałej (SPE) [165-169]. Techniki te, poza niewątpliwymi zaletami, charakteryzują się jednak istotnymi wadami:

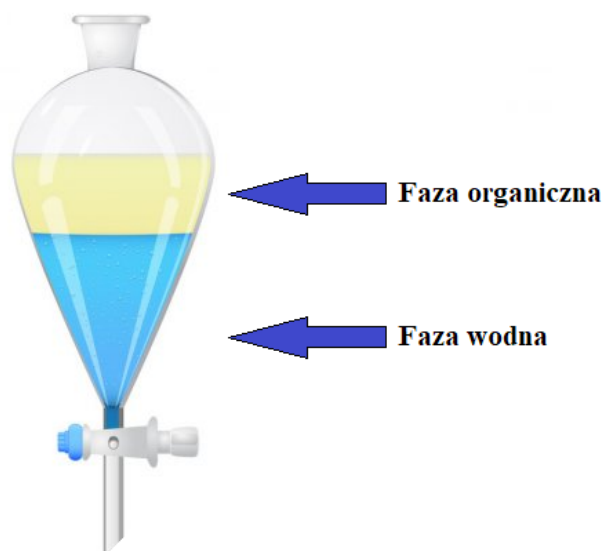
- zapotrzebowaniem na duże objętości potencjalnie toksycznych rozpuszczalników,
- wytwarzają duże ilości odpadów wtórnych podczas procesu,
- potrzebą stosowania złożonej aparatury – w przypadku stosowania SPE,
- wymagają czasochłonnych, żmudnych i wieloetapowych operacji,
- zdarza się, że otrzymywana czułość metody po zastosowaniu tych technik jest nie wystarczająca do analizy śladowej,
- wykorzystują duże objętości rzeczywistych próbek [170, 171].

Nowoczesne trendy w przygotowaniu próbek do analizy zmierzają w kierunku szybszych, bardziej ekologicznych, bezrozsączalnikowych i niedrogich technik ekstrakcji. W tym celu zostały one opracowane w skali „mikro”. Za pomocą mikroekstrakcji zużycie rozpuszczalników organicznych jest znacznie zredukowane. Ponadto, czasochłonność oraz manualne wykonanie ekstrakcji przez laboranta również zostało ograniczone, gdyż do realizacji ekstrakcji w skali mikro może zostać wykorzystana aparatura pomiarowa, jaką jest elektroforeza kapilarna [172-174]. Podatność CE do przeprowadzania procedur ekstrakcyjnych jest godna uwagi i warto rozważyć jej zastosowanie, gdyż pozwala na całkowitą lub prawie całkowitą automatyzację procesu ekstrakcji. Dzięki takiemu rozwiązaniu precyzja wykonywanych analiz jest lepsza, zwiększona została ilość analizowanych próbek w krótszym czasie w porównaniu do procedury ekstrakcji wykonywanej manualnie, uległa poprawie czułość stężeniowa, a także został wyeliminowany problem związany z analizą próbek o małych objętościach. Ponadto, aby przeprowadzić ekstrakcję za pomocą układu pomiarowego CE nie jest wymagana żadna modyfikacja aparatu, wystarczy jedynie odpowiednio zaprojektować i zaprogramować ekstrakcję za pomocą oprogramowania sterującego tym urządzeniem [116]. W **Rozdziale 4** szczegółowo opisano technikę ekstrakcji LLE oraz jej realizację w mikroskali z uwagi na fakt, że do zateżnienia próbki stosowana była jedna z jej odmian, tj. mikroekstrakcja do pojedynczej kropli.

4. Ekstrakcja ciecz-ciecz jako element przygotowania próbki do analizy

4.1. Podstawy teoretyczne

Termin ekstrakcja odnosi się do podziału związku chemicznego między dwie nie mieszające się fazy, które mają stały kontakt ze sobą. Najbardziej znaną techniką ekstrakcji jest ekstrakcja ciecz-ciecz (LLE), zwana również ekstrakcją rozpuszczalnikiem [175]. Sposób wykonania ekstrakcji LLE ilustruje **rysunek 27**.

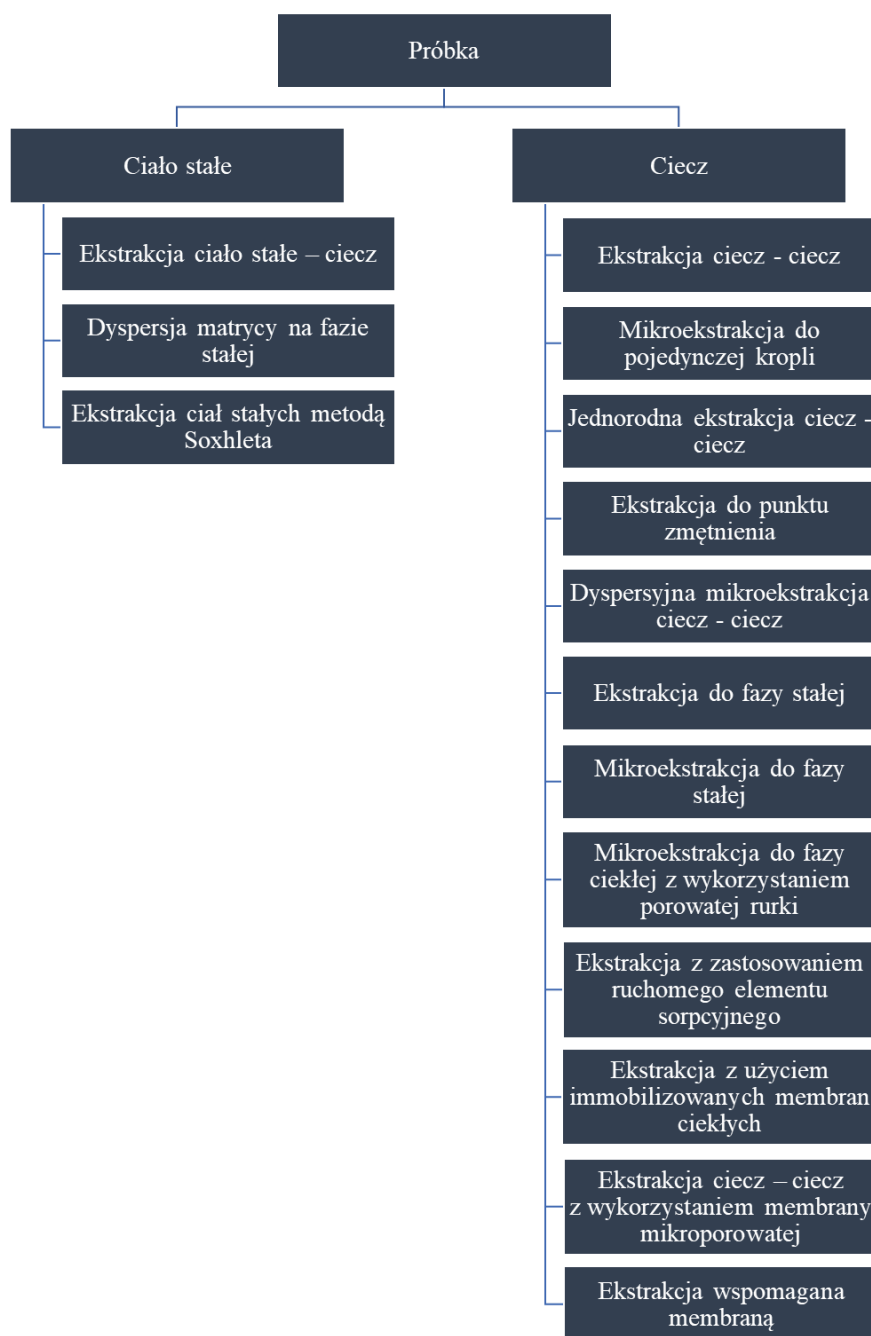


Rys. 27. Schemat przedstawiający układ ekstrakcji ciecz-ciecz.

W naczyniu (rozdzielacz) znajdują się dwie warstwy cieczy, jedną z nich stanowi zwykle faza wodna, a drugą rozpuszczalnik organiczny. W przedstawionym przykładzie rozpuszczalnik organiczny znajduje się nad wodą (tj. ma mniejszą gęstość), ale możliwa jest również sytuacja odwrotna. Substancja A, która początkowo jest rozpuszczona tylko w jednej z dwóch cieczy, ostatecznie rozdziela się między dwie fazy. Gdy ten podział osiągnie stan równowagi, substancja rozpuszczona ma stężenie $[A]_{\text{aq}}$ w warstwie wodnej, a w warstwie organicznej stężenie $[A]_{\text{org}}$. Wstawiając te stężenia do poniższego równania otrzymuje się współczynnik podziału k substancji rozpuszczonej w poszczególnych fazach ekstrakcyjnych:

$$k_A = \frac{[A]_{\text{org}}}{[A]_{\text{aq}}} \quad (8)$$

Współczynnik ten definiuje się jako stosunek całkowitego stężenia substancji w fazie organicznej do całkowitego stężenia tej samej substancji w fazie wodnej (niezależnie od tego, czy faza organiczna posiada mniejszą czy większą gęstość od fazy wodnej). Jeśli obecna jest druga substancja B oraz jej współczynnik podziału k_B różni się od k_A , to substancje A i B można oddzielić od siebie poprzez (jedno lub wielostopniową) ekstrakcję rozpuszczalnikiem [175]. Powyższa zasada tyczy się każdej odmiany ekstrakcji, przy czym mogą się różnić jedynie układem faz, np. ekstrakcja ciecz – ciało stałe, ciecz – gaz, ciało stałe – ciecz, itp. Poniżej przedstawiono diagram, na którym pokazano jak zostały podzielone poszczególne techniki ekstrakcji w zależności od stanu skupienia próbki (**rysunek 28**) – na schemacie nie przedstawiono ekstrakcji dla próbek gazowych.



Rys. 28. Schemat technik ekstrakcji w zależności od stanu skupienia próbki [176].

Wszystkie te techniki ekstrakcji oraz ich sposób wykonania jest dobrze opisany w literaturze naukowej [177-182].

Ponieważ jedna z tych technik, tj. mikroekstrakcja do pojedynczej kropli (SDME), była wykorzystana w badaniach eksperymentalnych w ramach rozprawy doktorskiej, w kolejnym podrozdziale opisano ją w sposób bardziej szczegółowy.

4.2. Mikroekstrakcja do pojedynczej kropli

Aby sprostać oczekiwaniom zasad zielonej chemii poprzez wyeliminowanie wad, którymi charakteryzuje się tradycyjna LLE, postanowiono przeprowadzić modyfikację sposobu

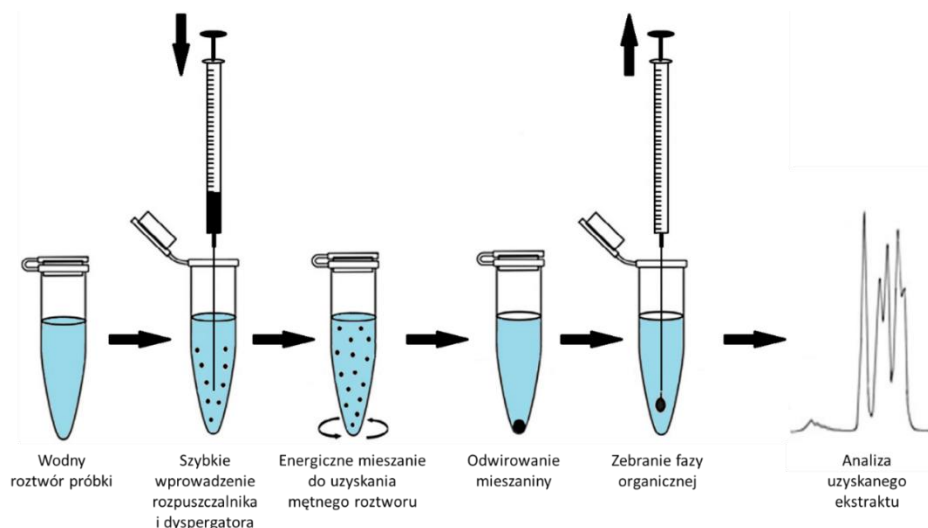
realizacji LLE, co zaowocowało opracowaniem wielu alternatywnych technik, które następnie z powodzeniem zastosowano w procedurach przygotowania próbek do analizy. Rezultatem tych badań jest powstanie nowatorskich technik ekstrakcji w skali „mikro”, które wyróżniają się skróceniem etapu przygotowania próbki do analizy, poprawą czułości metod analitycznych oraz tym, że są one ekologicznymi technikami zgodnymi z 12 zasadami zielonej chemii [183]. Jedną z tych technik jest mikroekstrakcja do fazy ciekłej (LPME). Jest ona techniką ekstrakcji rozpuszczalnikiem, która została opracowana w oparciu o zmniejszenie zużycia ekstrahenta z poziomu mililitrów czy setek mikrolitrów, do objętości mniejszych niż 100 μ l lub nawet do kilku nanolitrów. Jednocześnie objętość próbki wymaganej do przeprowadzenia ekstrakcji zazwyczaj mieści się w zakresie od 0,5 do 5 mL [184-188]. Dzięki temu uzyskuje się wysoki stopień załężenia analitów ze względu na bardzo wysoki stosunek objętości próbki do objętości fazy rozpuszczalnika [186]. Technika ta posiada wiele znaczących zalet, którymi są szybkość wykonania, wysoka wydajność procesu, ograniczenie zużycia toksycznych rozpuszczalników organicznych, a co za tym idzie niski koszt przeprowadzenia ekstrakcji [189, 190]. LPME doskonale sprawdza się w przygotowaniu próbek do analiz wykorzystujących techniki separacyjne takie jak: HPLC, GC, czy CE [191].

W oparciu o główne założenia LPME, opracowane zostały jej trzy podstawowe odmiany:

1. mikroekstrakcja do pojedynczej kropli (SDME),
2. dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz – ciecz (DLLME),
3. mikroekstrakcja do fazy ciekłej z wykorzystaniem porowatej rurki (HF-LPME).

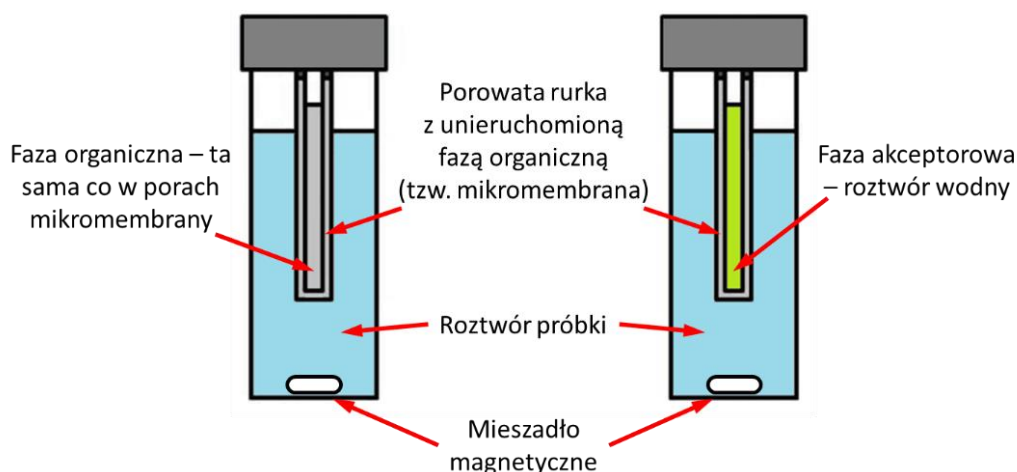
Technika mikroekstrakcji DLLME została pierwszy raz wykorzystana w 2006 r. przez Mohamada Raza oraz współpracowników [192] do analizy próbek wody na zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA). Podstawą DLLME jest zastosowanie trójskładnikowego układu rozpuszczalników, tj. fazy wodnej, rozpuszczalnika nie mieszającego się z wodą oraz polarnego rozpuszczalnika mieszającego się z wodą, zwanego rozpuszczalnikiem dyspersyjnym. Jej wykonanie polega na szybkim dodaniu niewielkiej objętości niepolarnego rozpuszczalnika i rozpuszczalnika dyspersyjnego (w postaci mieszaniny) do wodnego roztworu zawierającego anality [193, 194]. Następnie otrzymany układ miesza się w dowolny sposób, tj. ręcznie, poprzez wirowanie, mieszanie na mieszadle magnetycznym, wytrząsanie w górę i w dół. Po zakończeniu mieszania powstaje mętny roztwór składający się z drobnych kropelek rozpuszczalnika ekstrakcyjnego w pełni rozproszonego w fazie wodnej. W ten sposób otrzymuje się wysoki stosunek pola powierzchni fazy rozpuszczalnika do pola powierzchni fazy wodnej i w efekcie wysoką wydajność procesu ekstrakcji w krótkim czasie [194-197]. Rozproszenie fazy organicznej zawierającej anality usuwa się przez odwirowanie. Następnie

odwirowaną warstwę fazy organicznej zbiera się za pomocą mikropipety lub mikrostrzykawki i przeprowadza analizę uzyskanego ekstraktu [193-201]. Poglądowy schemat wykonania DLLME przedstawiono na **rysunku 29**.



Rys. 29. Schemat realizacji techniki DLLME [202].

W 1999 r. Pedersen-Bjergaard oraz Rasmussen wprowadzili kolejną alternatywną odmianę LPME opartą na wykorzystaniu tanich, pojedynczych i jednorazowych membran z porowatych rurek, zwykle wykonanych z polipropylenu [202]. Technika ta polega na tym, że faza wodna próbki nie styka się bezpośrednio z fazą akceptorową, ponieważ faza akceptorowa znajduje się w świetle włókna, które stanowi pusta w środku porowata rurka [203, 204]. Przed ekstrakcją porowatą rurkę zanurza się na kilka sekund w rozpuszczalniku organicznym, w celu unieruchomienia tego rozpuszczalnika w porach rurki. Możliwe jest również pobranie niewielkiej objętości rozpuszczalnika do światła włókna [203]. Rozpuszczalnik organiczny tworzy cienką warstwę (mikromembranę) w ścianie rurki, a jego nadmiar na zewnątrz włókna usuwany jest za pomocą ultradźwięków [205]. Następnie włókno zanurza się w próbce, którą stanowi roztwór wodny. Dodatkowo, w celu zwiększenia szybkości i wydajności ekstrakcji można zastosować mieszanie [205]. Rozpuszczalniki organiczne stosowane w HF-LPME powinny być niemieszalne z wodą, wykazywać silne powinowactwo do materiału porowatego włókna, zapewniać odpowiednią selektywność ekstrakcji i charakteryzować się niską lotnością, aby podczas ekstrakcji pozostawały w porach [205, 206]. Dzięki zastosowaniu materiału porowatego, mikromembrana włókna wykazuje bardzo wysoki stosunek powierzchni do objętości, co zapewnia wysoką wydajność procesu ekstrakcji. HF-LPME może być realizowana zarówno w układzie dwufazowym, jak i trójfazowym [203, 205-207], co schematycznie przedstawiono na **rysunku 30**.

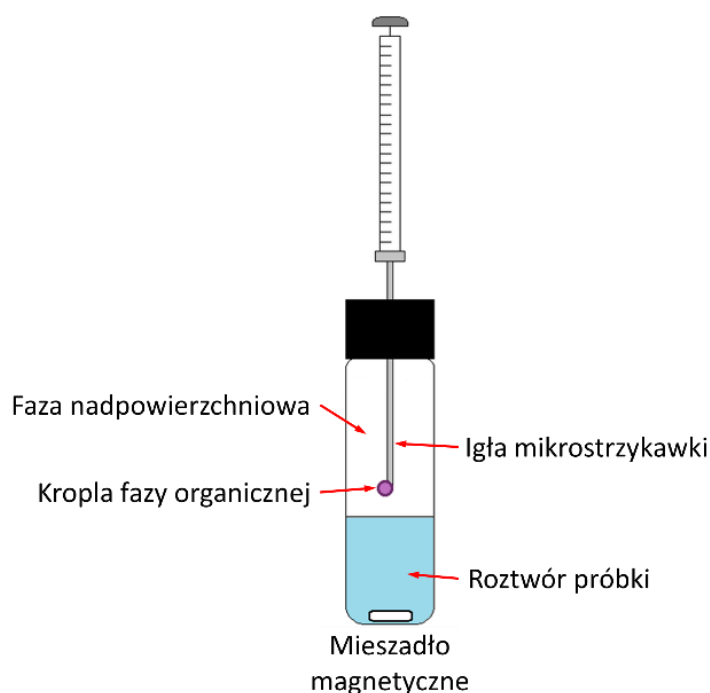


Rys. 30. Schemat realizacji HF-LPME w układzie dwu- oraz trójfazowym [203, 205].

W trybie dwufazowym anality są ekstrahowane z próbki wodnej do rozpuszczalnika organicznego unieruchomionego w porach oraz wnętrzu włókna [208, 209]. Z kolei w trójfazowym układzie, analit jest ekstrahowany z próbki wodnej jako fazy donorowej, przez mikromembranę, którą stanowi rozpuszczalnik organiczny unieruchomiony w porach włókna i ostatecznie do wnętrza tego włókna wypełnionego fazą wodną (faza akceptorowa). Zastosowalność tego trybu HF-LPME jest ograniczone do analitów, które w zależności od wartości pH będą występowały w formie zjonizowanej lub obojętnej [206, 209].

Pierwszą odmianą LPME opisaną w literaturze jest technika mikroekstrakcji do pojedynczej kropli. Została ona wprowadzona przez dwa różne zespoły badawcze, które opublikowały swoje wyniki eksperymentów w tym samym roku, tj. w 1996 r. W skład pierwszego zespołu wchodził Liu oraz Dasgupta [210], natomiast w skład drugiego wchodził Jeannot i Cantwell [211]. Technika SDME jest jedną z najczęściej stosowanych technik mikroekstrakcyjnych, która w najprostszym wydaniu polega na ekstrakcji analitów z fazy wodnej próbki do małej kropli fazy organicznej wiszącej na końcu igły mikrostrzykawki [208]. Po ekstrakcji wzbogaconą kroplę z powrotem wprowadza się do mikrostrzykawki do dalszych czynności analitycznych. Dzięki wysokiemu stosunkowi objętości próbki do objętości fazy organicznej uzyskuje się wysokie współczynniki wzbogacenia, co jest charakterystyczne dla SDME. Ekstrakty uzyskane za pomocą techniki SDME są bogate w anality i wolne od związków matrycy próbki. Zastosowanie tej techniki znacząco zmniejsza zużycie rozpuszczalników organicznych potrzebnych do wykonania procesu ekstrakcji w porównaniu z tradycyjną procedurą LLE [213]. W praktyce istnieją trzy główne podejścia wykonywania SDME, a mianowicie: mikroekstrakcja do kropli zanurzonej bezpośrednio w próbce (DI-SDME), mikroekstrakcja do kropli z fazy nadpowierzchniowej (HS-SDME) i mikroekstrakcja do kropli z próbki w ciągłym przepływie (CF-SDME) [212, 214]. Technika HS-SDME z fazy nadpowierzchniowej została pierwszy raz

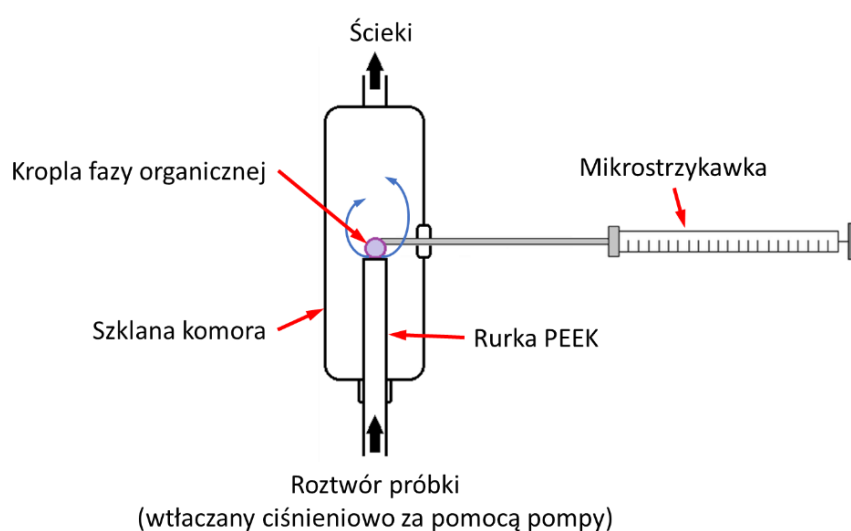
opisana w 2001 r. przez zespół Theis'a i współpracowników, którzy wykorzystali ten rodzaj LPME do oznaczania lotnych rozpuszczalników organicznych takich jak benzen, toluen, etylobenzen, *o*-ksylen [215]. Zasada wykonania HS-SDME polega na tym, że do szczelnie zamkniętego naczynia wprowadza się igłę mikrostrzykawki, której koniec nie jest zanurzony w próbce, lecz znajduje się nad powierzchnią cieczy próbki. Następnie generowana jest kropla rozpuszczalnika organicznego, po czym następuje ekstrakcja lotnych związków próbki do wiszącej kropli. W celu zwiększenia wydajności procesu ekstrakcji możliwe jest mieszanie roztworu próbki. Układ ekstrakcyjny może być dodatkowo termostatowany w celu zwiększenia lotności analitów. Po zakończeniu procesu ekstrakcji wzbogacona kropla z powrotem jest wprowadzana do mikrostrzykawki i poddawana dalszym czynnościom analitycznym. W procedurze HS-SDME anality rozkładają się między trzy fazy: fazę ciekłej próbki, fazę nadpowierzchniową oraz fazę kropli organicznej. Czynnikiem wyznaczającym szybkość ekstrakcji jest transfer masy, co oznacza, że duża szybkość mieszania roztworu próbki pozytywnie wpływa na zwiększenie wydajności ekstrakcji [216-219]. Schemat wykonania HS-SDME przedstawiony jest na **rysunku 31**.



Rys. 31. Schemat ekstrakcji techniką HS-SDME [215].

W 2000 r. dwaj naukowcy Liu oraz Lee opisali w literaturze naukowej całkowicie nową procedurę SDME, czyli CF-SDME [220]. W odniesieniu do statycznej oraz dynamicznej odmiany, CF-SDME jest wyłącznie dynamicznym rodzajem ekstrakcji do fazy ciekłej, która polega na tym, że rozpuszczalnik ekstrakcyjny w postaci mikrokropli (o objętości od 1 do 5 μL)

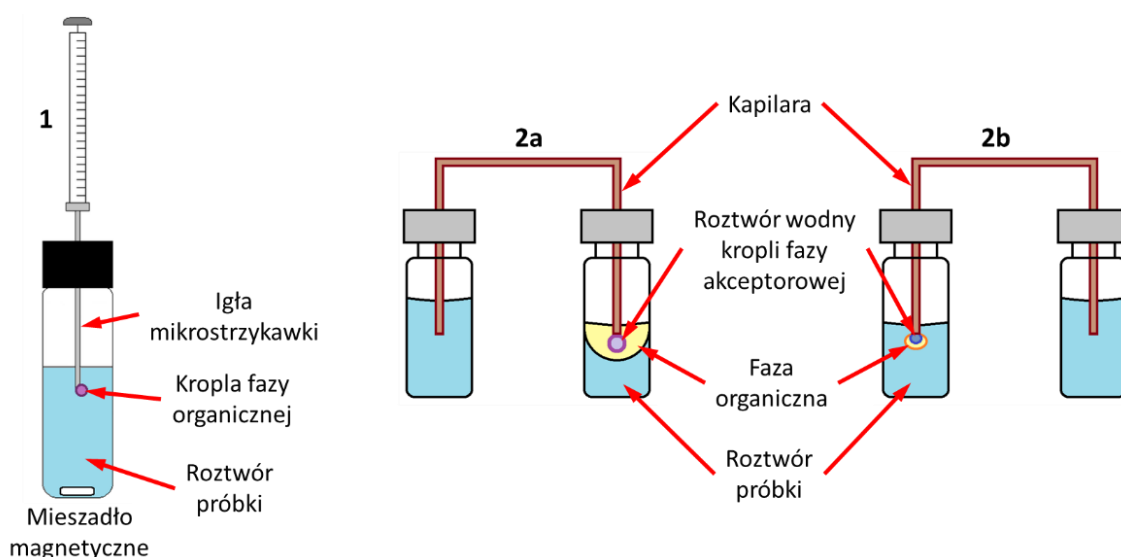
wprowadzany jest do szklanej komory przy użyciu konwencjonalnej mikrostrzykawki, a wytworzona organiczna kropla utrzymywana jest na wylotowym końcu rurki wykonanej z polioeteroetereketonu (PEEK) [220]. Wodny roztwór próbki (3 ml lub mniej) wprowadzany jest wlotowym końcem rurki PEEK do wnętrza komory za pomocą systemu HPLC i przepływa w sposób ciągły z prędkością 0,05 ml/min lub wyższą. Obmywanie kropli roztworem napływającej próbki powoduje, że zachodzi ciągła ekstrakcja analitów z napływającej świeżej próbki wodnej do kropli fazy organicznej. Po zakończeniu ekstrakcji, wzbogaconą kroplę z powrotem wprowadza się do mikrostrzykawki i wyjmuje z wnętrza komory ekstrakcyjnej [220, 221]. Na **rysunku 32** przedstawiono w sposób schematyczny wykonanie CF-SDME.



Rys. 32. Schemat realizacji CF-SDME [213].

Ostatnią techniką LPME jest mikroekstrakcja do kropli zanurzonej bezpośrednio w roztworze ekstrahowanym, czyli DI-SDME. Została ona opracowana i opisana w literaturze dokładnie w połowie lat pięćdziesiątych XX w. [222]. Rok później kolejny zespół wykorzystał DI-SDME do ekstrakcji 4-metyloacetofenonu z wodnego roztworu próbki, a następnie przeprowadzono analizę otrzymanego ekstraktu za pomocą chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo – jonizacyjnym [211]. Wykonanie ekstrakcji techniką DI-SDME należy do prostych i jednych z najtańszych, ponieważ polega na zanurzeniu końca igły mikrostrzykawki w wodnym roztworze próbki. Następnie wytwarza się kroplę fazy organicznej, w zakresie objętości od 0,3 do 3 μL . Próbka reprezentuje fazę donorową, z której ekstrahowane są anality, zaś kropla stanowi fazę akceptorową. Po wytworzeniu kropli układ pozostawia się na czas ekstrakcji. Możliwe jest również delikatne mieszanie próbki w celu zwiększenia szybkości transferu masy analitów, czyli zwiększenia szybkości oraz wydajności ekstrakcji. Po zakończeniu procesu ekstrahowania analitów do kropli, kroplę wprowadza się do mikrostrzykawki i poddaje kolejnym

czynnościom analitycznym [223]. Jednakże wykonanie DI-SDME możliwe jest również w układzie trójfazowym (LLL-SDME). Ten rodzaj SDME został opracowany w 1999 r. przez Ma i Cantwell'a [224]. LLL-SDME jest bardziej odpowiednia dla analitów jonizowalnych. W tym trybie do rozdzielenia dwóch faz wodnych, fazy donorowej próbki i fazy akceptorowej kropli, stosuje się fazę organiczną. Wartość pH roztworu próbki i mikrokropli można regulować tak, aby uzyskać obojętną formę analitu, którą można wyekstrahować rozpuszczalnikiem organicznym, a następnie zjonizować. Innymi słowy analit jest ekstrahowany z fazy donorowej do fazy organicznej, a następnie reekstrahowany z fazy organicznej do kropli fazy akceptorowej, w której uzyskując ładunek zostaje zatrzymany, a ekstrakcja odwrotna z kropli do próbki jest uniemożliwiona [225]. Trójfazową LLL-SDME można realizować na dwa sposoby. W pierwszym z nich na roztwór próbki nakłada się ciekłą warstwę rozpuszczalnika organicznego, w którym zanurza się igłę. Drugi sposób jest stosowany do zatężania analitów z próbki przy wykorzystaniu do tego celu aparatu do CE. Polega on na tym, że do wlotowego końca kapilary wprowadzana jest pewna objętość fazy akceptorowej, po czym do kapilary zostaje wtłoczona dużo mniejsza objętość rozpuszczalnika organicznego. Następnie po podstawieniu pod wlotowy koniec kapilary fiolki z roztworem próbki, kapilara zostaje w niej zanurzona i następuje wygenerowanie kropli, która składa się od zewnątrz z cienkiej warstwy fazy organicznej, a we wnętrzu znajduje się roztwór fazy akceptorowej [226, 227]. Wszystkie tryby realizacji DI-SDME przedstawione są na **rysunku 33**.



Rys. 33. Schemat realizacji DI-SDME: (1) – DI-SDME w układzie dwufazowym, (2a) – DI-SDME w układzie trójfazowym, gdzie faza organiczna oddzielająca próbkę od kropli jest nałożona na powierzchnię fazy donorowej, (2b) – DI-SDME w układzie trójfazowym, gdzie faza organiczna oddzielająca próbkę od fazy akceptorowej stanowi ciekłą warstwę wokół kropli [222, 227].

CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA

Cel pracy

Jednym z najbardziej popularnych detektorów wykorzystywanych w aparatach do elektroforezy kapilarnej jest detektor spektrofotometryczny. Przez wzgląd na jedną z głównych wad CE (mając na uwadze stosowanie detekcji UV-Vis), którą jest niska czułość stężeniowa, stosuje się różne rozwiązania pozwalające obniżyć granicę oznaczalności, w tym techniki zateżenia analitu. Zateżenie analitu może być realizowane zarówno w układzie pomiarowym CE, jak i poza jej układem. Do technik zateżenia analitu należą spiętrzanie w kapilarze separacyjnej w CE oraz ekstrakcja. Ekstrakcja, która znajduje szerokie zastosowanie w chemii analitycznej jest jedną z podstawowych i najbardziej popularnych technik przygotowania próbki do analizy. Jest łatwa w realizacji, pozwala na oczyszczenie próbki poprzez oddzielenie analitów od matrycy oraz umożliwia zateżenie analitu.

Celem pracy było opracowanie dokładnych, czułych, ekonomicznych i ekologicznych procedur analitycznych oznaczania tiolaktonu homocysteiny w moczu człowieka, wykorzystujących aparaturę do elektroforezy kapilarnej oraz mikroekstrakcję ciecz-ciecz podczas etapu przygotowania próbki. W procedurze przygotowania próbki wykorzystano ekstrakcję do pojedynczej kropli, która została realizowana bezpośrednio w układzie oraz poza układem pomiarowym CE. Zastosowano także jedną z popularnych technik zateżenia analitu bezpośrednio w kapilarze, tj. spiętrzanie na drodze wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola.

Realizacja wspomnianego celu prowadziła poprzez szereg etapów, z których najważniejsze to:

- opracowanie procedury przygotowania próbki do przeprowadzenia mikroekstrakcji do pojedynczej kropli w układzie trójfazowym,
- dobór odpowiednich warunków ekstrakcji tiolaktonu homocysteiny z moczu,
- opracowanie warunków mikroekstrakcji do pojedynczej kropli realizowanej automatycznie w układzie CE (on-line) oraz ręcznie poza układem CE (off-line),
- optymalizacja warunków zateżenia analitu poprzez wprowadzanie próbki ze wzmocnieniem pola w procedurze z mikroekstrakcją do pojedynczej kropli w trybie off-line,
- dostosowanie warunków separacji elektroforetycznej tiolaktonu homocysteiny w moczu,
- wykorzystanie opracowanych metod do oznaczania tiolaktonu homocysteiny w próbce rzeczywistej o wysokim stopniu skomplikowania matrycy, tj. w moczu człowieka.

Odczynniki, roztwory i aparatura

1) Odczynniki:

- 2-propanol (izopropanol), $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$, $M = 60,1 \text{ g/mol}$, 99,5%, Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy)
- Chloroform, CHCl_3 , $M = 119,39 \text{ g/mol}$, 98,5%, CHEMPUR (Piekary Śląskie, Polska)
- Chlorowodorek *D,L*- tiolaktonu homocysteiny, $\text{C}_4\text{H}_7\text{NOS} \times \text{HCl}$, $M = 153,63 \text{ g/mol}$, 99,0%, Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy)
- Dichlorometan, CH_2Cl_2 , $M = 84,93 \text{ g/mol}$, 99,8%, J.T. Baker (Deventer, Holandia)
- Etanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, $M = 46,07 \text{ g/mol}$, 99,9%, CHEMPUR (Piekary Śląskie, Polska)
- Octan etylu, $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, $M = 88,11 \text{ g/mol}$, 99,8%, POCH (Gliwice, Polska)
- Kwas borowy, H_3BO_3 , $M = 61,83 \text{ g/mol}$, J.T. Baker (Deventer, Holandia)
- Kwas cytrynowy jednowodny, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$, $M = 210,14 \text{ g/mol}$, 99,0%, Acros Organics (Geel, Belgia)
- Kwas fosforowy(V), H_3PO_4 , $M = 98,9 \text{ g/mol}$, 85%, J.T. Baker (Deventer, Holandia)
- Kwas mrówkowy, HCOOH , $M = 46,03 \text{ g/mol}$, 99%, Fluka AG, (Buchs, Szwajcaria)
- Kwas octowy, CH_3COOH , $M = 60,05 \text{ g/mol}$, 99,5%, POCH (Gliwice, Polska)
- Kwas solny, HCl , $M = 34,46 \text{ g/mol}$, 35-38%, POCH (Gliwice, Polska)
- Metanol, CH_3OH , $M = 32,04 \text{ g/mol}$, czystość do HPLC, J.T. Baker (Deventer, Holandia)
- Oktadecylotrimetoksylan, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$, $M = 374,67 \text{ g/mol}$, 90%, Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy)
- Toluen, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$, $M = 92,14 \text{ g/mol}$, 99,5%, CHEMPUR (Piekary Śląskie, Polska)
- Wodorofosforan(V) disodu dwunastowodny, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$, $M = 358,14 \text{ g/mol}$, 99,5%, POCH (Gliwice, Polska)
- Wodorotlenek sodu, NaOH , $M = 39,997 \text{ g/mol}$, 98,8%, POCH (Gliwice, Polska)

2) Roztwory:

- Roztwór tiolaktonu homocysteiny o stężeniu 0,1 mol/L przygotowano odważając do próbówki Eppendorfa o pojemności 1,5 mL 0,015363 g odczynnika i dodając 1 mL wody dejonizowanej.
- Roztwór kwasu solnego o stężeniu 0,1 mol/L przygotowano odmierzając 16,67 μL stężonego kwasu (35-38%) do próbówki Eppendorfa i uzupełniając wodą dejonizowaną do objętości 2 mL.

- Roztwory kwasu solnego o stężeniach 0,0005 oraz 0,002 mol/L przygotowano odmierając odpowiednio 10 μL i 40 μL 0,1 mol/L kwasu solnego do probówek Eppendorfa i uzupełniając wodą dejonizowaną do objętości 2 mL.
- Roztwór kwasu fosforowego(V) o stężeniu 0,2 mol/L przygotowano odmierając 687 μL 85% kwasu fosforowego(V) do kolby miarowej o pojemności 50 mL i uzupełniając wodą dejonizowaną do kreski.
- Roztwór kwasu fosforowego(V) o stężeniu 0,1 mol/L przygotowano odmierając 87 μL 85% kwasu fosforowego(V) do kolby miarowej o pojemności 100 mL i uzupełniając wodą dejonizowaną do kreski.
- Roztwory kwasu fosforowego(V) o stężeniu 0,01; 0,05; 0,075; 0,1; 0,125; 0,15; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mol/L przygotowano odmierając odpowiednio 17; 86; 129; 172; 215; 258; 859; 1718; 2577; 3435 μL 85% kwasu fosforowego(V) do 10 kolb miarowych o pojemności 25 mL i uzupełniając wodą dejonizowaną do kreski.
- Roztwory kwasu fosforowego(V) o stężeniach 0,0005; 0,001; 0,002; 0,0025; 0,003; 0,0035; 0,004; 0,0045; 0,005 mol/L przygotowano wprowadzając do probówek Eppendorfa odpowiednio 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μL 0,1 mol/L roztworu kwasu fosforowego(V) i uzupełniając wodą dejonizowaną do objętości 2 mL.
- Roztwór wodorofosforanu(V) disodu o stężeniu 0,2 mol/L przygotowano poprzez odważenie 7,1648 g Na_2HPO_4 do kolby miarowej o pojemności 50 mL i uzupełnienie wodą dejonizowaną do kreski.
- Roztwór wodorofosforanu(V) disodu o stężeniu 0,1 mol/L przygotowano poprzez odważenie 7,1648 g Na_2HPO_4 do kolby miarowej o pojemności 100 mL i uzupełnienie wodą dejonizowaną do kreski.
- Roztwór wodorofosforanu(V) disodu o stężeniu 0,06 mol/L przygotowano rozpuszczając 2,1488 g Na_2HPO_4 w kolbie miarowej o pojemności 100 mL i uzupełniając wodą dejonizowaną do kreski.
- Roztwory wodorofosforanu(V) disodu o stężeniach 0,01; 0,05; 0,07; 0,075; 0,08; 0,09; 0,125; 0,15 mol/L przygotowano rozpuszczając odpowiednio 0,179; 0,895; 1,254; 1,343; 1,433; 1,612; 2,238; 2,686 g Na_2HPO_4 w kolbach miarowych o pojemności 50 mL i uzupełniając wodą dejonizowaną do kreski.
- Bufory fosforanowe o stężeniu 0,2 mol/L i $\text{pH} = 6,4; 7,2; 7,4; 7,6; 7,8; 8,0; 8,2$ przygotowano miareczkując metodą potencjometryczną roztwór 0,2 mol/L Na_2HPO_4 roztworem 0,2 mol/L H_3PO_4 w celu doprowadzenia dożądanego pH .

- Roztwory elektrolitu podstawowego (roztwór $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$) do analiz elektroforetycznych o stężeniu 0,1 mol/L i pH = 4,75; 5,00; 5,25; 5,50; 5,75; 6,00 przygotowano poprzez potencjometryczne miareczkowanie roztworu 0,1 mol/L Na_2HPO_4 roztworem 0,1 mol/L H_3PO_4 w celu doprowadzenia dożądanego pH.
- Roztwory elektrolitu podstawowego (roztwór $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$) do analiz elektroforetycznych o stężeniu 0,06 mol/L i pH = 4,75 sporządzono poprzez miareczkowanie metodą potencjometryczną roztworu 0,06 mol/L Na_2HPO_4 roztworem 1,5 mol/L H_3PO_4 w celu doprowadzenia dożądanego pH.
- Roztwór kwasu octowego o stężeniu 0,1 mol/L przygotowano poprzez odmierzenie 5,7 μL 99,5% kwasu octowego do 1,5 mL próbówki Eppendorfa i uzupełniając do objętości 1 mL wodą dejonizowaną.
- Roztwory kwasu octowego o stężeniach 0,0005 i 0,002 mol/L przygotowano poprzez odpipetowanie odpowiednio 10 i 40 μL 0,1 mol/L CH_3COOH do probówek Eppendorfa i uzupełnienie wodą dejonizowaną do objętości 2 mL.
- Roztwór kwasu mrówkowego o stężeniu 0,1 mol/L przygotowano pipetując 3,8 μL 99,0% HCOOH do próbówki Eppendorfa o pojemności 1,5 mL i uzupełniając wodą dejonizowaną do objętości 1 mL.
- Roztwory kwasu mrówkowego o stężeniach 0,0005 i 0,002 mol/L sporządzono odmierzając odpowiednio 10 i 40 μL 0,1 mol/L kwasu mrówkowego do probówek Eppendorfa i uzupełniając wodą dejonizowaną do objętości 2 mL.
- Roztwór kwasu borowego o stężeniu 0,1 mol/L przygotowano poprzez odważenie 0,0124 g kwasu borowego w próbówce Eppendorfa i rozpuszczenie w 1 mL wody dejonizowanej.
- Roztwory kwasu borowego o stężeniach 0,0001, 0,0002, 0,0003, 0,0004, 0,0005, 0,0006, 0,002 mol/L przygotowano odmierzając do probówek Eppendorfa odpowiednio 2, 4, 6, 8, 10, 12, 40 μL 0,1 mol/L kwasu borowego i uzupełniając wodą dejonizowaną do objętości 2 mL.
- Roztwór 5% oktadecylotrimetoksysilanu (ODTS) przygotowano na podstawie procedury opisanej w literaturze [227] odmierzając do próbówki Eppendorfa o pojemności 1,5 mL 50 μL ODTS, następnie dodając 1 μL stężonego kwasu octowego i uzupełniając bezwodnym etanolem do pojemności 1 mL. Przed użyciem roztwór pozostawiono na 24 godziny w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej.

- Roztwór wodorotlenku sodu o stężeniu 1 mol/L przygotowano poprzez odważenie 2 g NaOH do kolby miarowej o pojemności 50 mL i uzupełnienie wodą dejonizowaną do kreski.
- Roztwór wodorotlenku sodu o stężeniu 0,1 mol/L przygotowano poprzez odmierzenie 100 μ L roztworu 1 mol/L NaOH do szklanej fiolki do CE i uzupełnienie wodą dejonizowaną do objętości 1 mL.

Przed użyciem wszystkie roztwory stosowane do analizy przefiltrowano przez filtr strzykawkowy, w którym średnica porów wynosiła 0,2 μ m.

3) Aparatura:

- Aparat do elektroforezy kapilarnej Agilent Technologies 7100 (Waldbronn, Niemcy), którego poszczególne podzespoły były sterowane za pomocą komputera z oprogramowaniem Agilent Technologies ChemStation Rev. B.04.02. SP1.
- Aparat do wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej firmy Hewlett Packard, HP^{3D}CE (Waldbronn, Niemcy), którego poszczególne podzespoły były sterowane za pomocą komputera z oprogramowaniem Hewlett Packard ChemStation, Rev. A.04.02.

Obydwa aparaty do elektroforezy kapilarnej składały się z następujących podzespołów:

- termostатовana kasetta z umieszczoną w niej kapilarą krzemionkową,
- termostатовany automatyczny podajnik próbek – system do termostатовania oraz automatycznego dozowania roztworów próbek do kapilary (metodą hydrodynamiczną lub elektrokinetyczną), a także kondycjonowania kapilar,
- detektor spektrofotometryczny UV-Vis wyposażony w matrycę diodową,
- system do automatycznej wymiany elektrolitu podstawowego,
- źródło wysokiego napięcia (0 - 30 kV), wytwarzające pole elektryczne w kapilarze w zakresie 0 - 500 V/cm.
- Kapilary separacyjne
 - kapilary krzemionkowe niepowlekanie o różnej długości i średnicy wewnętrznej 50 μ m i 75 μ m Polymicro Technologies (Phoenix, USA).
- Spektrofotometr UV-Vis Hewlett Packard HP 8453 (Waldbronn, Niemcy)
- Waga laboratoryjna OHAUS, PX224M/1 (Greifensee, Szwajcaria).
- Dejonizator wody MILLIPORE, MILLI-Q-RG (Watford, Irlandia).
- Suchy blok grzejący (termostat) Grant, QBD2 (Cambridge, Wielka Brytania).
- Wirówka Mikro 220R, Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Niemcy).

- pH-metr METTLER TOLEDO, FiveEasy F20 (Geifensee, Szwajcaria).
- Mieszadło magnetyczne VARIOMAG, MONO DIRECT, Thermo Scientific (Langensfeld, Niemcy).
- Mieszadło magnetyczne SHOTT, TM 125 (Mainz, Niemcy).
- Mikropipety automatyczne o pojemnościach 10, 20, 200, 1000 μL GILSON (Villiers-le-Bel, Francja).

4) Kondycjonowanie kapilar

Nowe kapilary przeznaczone do analiz elektroforetycznych przygotowywano samodzielnie poprzez ucięcie ich do żądanej długości i sporządzenie okienka detekcyjnego. Przed pierwszym użyciem każdą nową kapilarę poddawano kondycjonowaniu zgodnie z następującą procedurą:

1. 20 min 1 mol/L NaOH,
2. 20 min 0,1 mol/L NaOH,
3. 2 min H_2O ,
4. 30 min elektrolit podstawowym do analiz.

Kolejnego dnia pracy na tej samej kapilarze przemywano ją natomiast według poniższej sekwencji:

1. 20 min 0,1 mol/L NaOH,
2. 2 min H_2O ,
3. 30 min elektrolit podstawowy do analiz.

Na koniec każdego dnia pracy eksperymentalnej kapilarę przemywano wodą dejonizowaną przez 15 min, jej końce zanurzano w fiolkach zawierających wodę dejonizowaną, pozostawiając do kolejnego użycia.

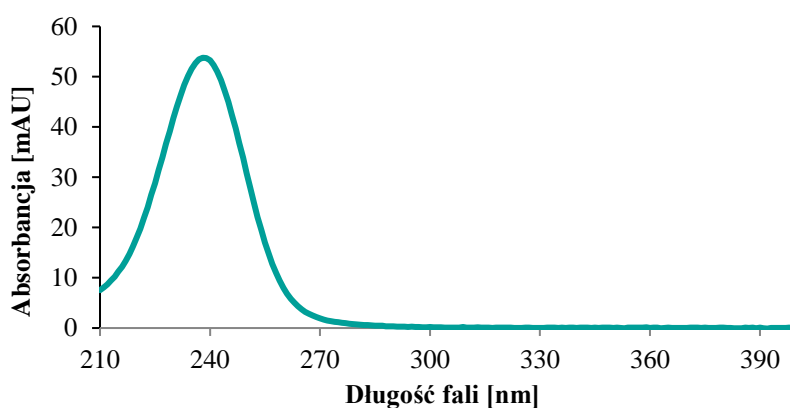
Z uwagi na fakt, że do kapilary wprowadzana była bardzo mała objętość próbki oraz dla jednej z metod przeprowadzano procedurę mikroekstrakcji w układzie pomiarowym CE, wszystkie etapy wprowadzania odczynników i roztworu próbki do kapilary odbywały się automatycznie, w zależności od potrzeby sposobem hydrodynamicznym lub elektrokinetycznym. Wszelkie parametry, działanie i obsługa poszczególnych podzespołów aparatury do CE, były ustawiane i kontrolowane z wykorzystaniem komputera zintegrowanego ze sprzętem oraz oprogramowania dostarczonego przez producenta.

Opracowanie elektroforetycznych procedur oznaczania tiolaktonu homocysteiny w moczu człowieka

Podczas optymalizacji warunków separacji elektroforetycznej, ekstrakcji SDME dla obydwu trybów oraz zatężania analitu wewnątrz kapilary, pomiary dla każdego parametru powtarzano trzykrotnie ($n = 3$), wyznaczano wartość średnią, odchylenie standardowe oraz współczynnik zmienności (wyrażony jako względne odchylenie standardowe w procentach).

1. Wyznaczenie analitycznej długości fali

Przed przystąpieniem do właściwych eksperymentów mających na celu opracowanie procedur oznaczania tiolaktonu homocysteiny (HTL) w ludzkim moczu w pierwszej kolejności przeprowadzono dobranie odpowiedniej analitycznej długości fali detekcji. Polegało to na zarejestrowaniu widma absorpcji HTL wykorzystując do tego celu spektrofotometr UV-Vis. Zgodnie z zaprezentowanym widmem na **rysunku 34**, HTL wykazywał pasmo absorpcji przy długości fali 240 nm.



Rys. 34. Widmo absorpcji UV-Vis HTL.

2. Parametry walidacyjne podczas opracowywania procedur analitycznych

W celu walidacji opisanych niżej metod wyznaczono następujące parametry:

- granicę wykrywalności (LOD) oraz granicę oznaczalności (LOQ),
- zakres liniowości,
- wewnątrz- oraz międzydniową precyzję i dokładność.

Każdy z tych parametrów powinien spełniać odpowiednie kryteria przyjęte dla metod oznaczania próbek biologicznych [228]:

1. Kryterium akceptacji podczas wyznaczania wartości LOQ to: precyzja uzyskanych wyników pomiarów podczas wyznaczenia LOQ nie powinna przekraczać 20%.
2. Podczas wyznaczania zakresu liniowości metody kryterium akceptacji wskazuje, aby dokładność, wyrażona odzyskiem, punktów krzywej kalibracyjnej mieściła się w zakresie

85 - 115%, przy czym dokładność punktu reprezentującego najniższe stężenie krzywej kalibracyjnej powinno mieścić się w zakresie 80 - 120%.

3. Z kolei do wyznaczenia precyzji i dokładności metody należy wybrać trzy stężenia reprezentujące cały zakres krzywej kalibracyjnej, gdzie pierwsze stężenie powinno być zbliżone do początku jej zakresu, drugie reprezentowało środek zakresu krzywej, zaś trzecie było zbliżone do jej końca. Kryteria akceptacji tych parametrów są następujące:

- I. precyzja nie powinna przekraczać 15%, przy czym precyzja dla najniższego z trzech stężeń nie powinna być większa niż 20%,
- II. dokładność powinna mieścić się w zakresie 85 - 115%, przy czym dla najniższego z trzech stężeń zakres dokładności wynosi 80 - 120%.

3. Opracowanie metody oznaczania tiolaktonu homocysteiny za pomocą kapilarnej elektroforezy strefowej oraz mikroekstrakcji do pojedynczej kropli realizowanej w układzie pomiarowym elektroforezy kapilarnej

3.1. Dobór warunków elektroforetycznego rozdzielania.

Jednym z najważniejszych etapów opracowywania nowych procedur analitycznych wykorzystujących techniki separacyjne jest ustalenie optymalnych warunków rozdzielania, aby zapewnić jak najlepszą separację składników próbki w stosunkowo krótkim czasie oraz uzyskać wysoką dokładność, precyzję i możliwie jak najwyższą czułość. Opracowanie metody oznaczania HTL w moczu człowieka za pomocą strefowej elektroforezy kapilarnej (CZE) oraz mikroekstrakcji do pojedynczej kropli (SDME), rozpoczęto od doboru odpowiednich parametrów elektroforetycznych:

1. pH BGE,
2. stężenia BGE,
3. wartości przykładanego napięcia,
4. temperatury kapilary.

Podczas oceny jakości uzyskanych zależności optymalizowanych parametrów elektroforetycznych przyjęto następujące kryteria: otrzymanie jak najwyższych wartości wysokości oraz pola powierzchni sygnałów analitycznych pochodzących od HTL przy jednoczesnym osiągnięciu jak najwyższej precyzji analiz elektroforetycznych. Dobór warunków rozdzielania prowadzono stosując następujące wstępne parametry pomiarowe:

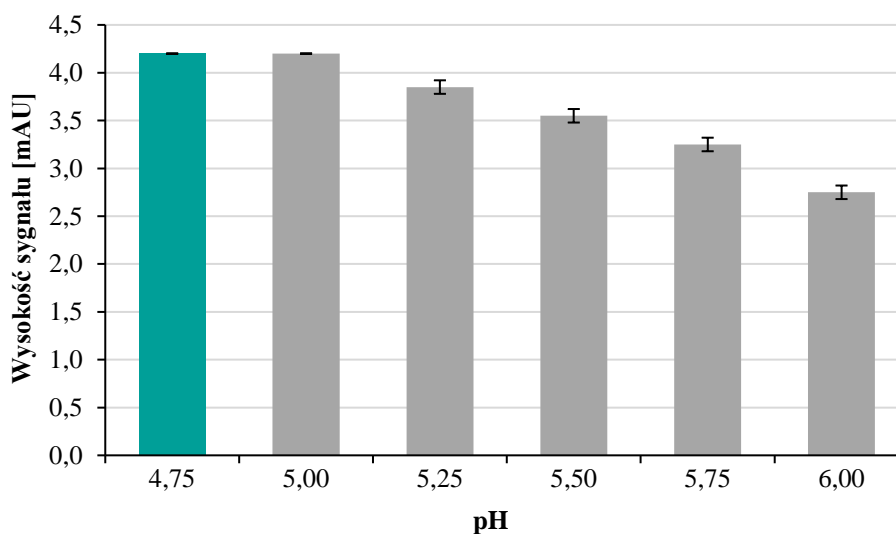
- kapilara: długość całkowita: 64 cm (długość efektywna 55,5 cm), średnica wewnętrzna: 75 μ m,
- temperatura kapilary: 21 °C,

- napięcie 24 kV,
- analityczna długość fali 240 nm
- hydrodynamiczne wprowadzenie próbki do kapilary: 50 mbar przez 20 s (co odpowiada objętości wprowadzonej próbki równej 121 nL).

Optymalizacja parametrów CZE została wykonana przed opracowaniem procedury SDME realizowanej czy to w układzie pomiarowym czy poza układem CE. Podczas eksperymentów mających na celu opracowanie odpowiednich warunków separacyjnych jako próbkę stosowano wodny roztwór standardu HTL o stężeniu 100 nmol/mL.

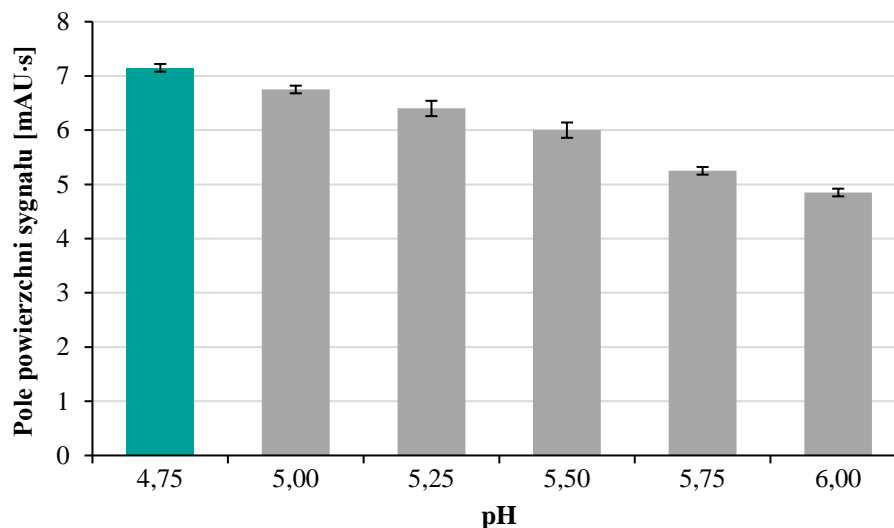
Wartość pH BGE

Pierwszym etapem doboru warunków rozdzielania elektroforetycznego było zbadanie wpływu pH roztworu elektrolitu do analizy na wysokość i pole powierzchni sygnału HTL. Z powodu tego, że wartość pK_a dla HTL wynosi 6,67 [1] oraz dlatego, że stosowano technikę CZE, która służy do rozdzielania cząstek obdarzonych ładunkiem elektrycznym, to zakres badanego pH był niższy. W elektrolicie o pH niższym od pK_a , cząsteczka HTL zyskuje ładunek dodatni i możliwa jest jej separacja. W związku z tym przygotowano serię 0,1 mol/L roztworów elektrolitu podstawowego o pH z zakresu 4,75 - 6,00. Na podstawie uzyskanych wyników analiz elektroforetycznych roztworów standardowych HTL, zależności wysokości i pola powierzchni sygnału HTL od pH elektrolitu podstawowego przedstawiono na **rysunkach 34 i 35**. Sprawdzono również wpływ pH roztworu elektrolitu do analizy poniżej 4,75, jednakże ponieważ uzyskiwano zbyt długie czasy migracji (im mniejsze pH tym mniejszy EOF) oraz gorsze parametry sygnałów, tj. wysokość i pole powierzchni piku, dlatego tych wyników nie uwzględniono na **rysunkach 35 i 36**.



Rys. 35. Zależność wysokości sygnału HTL od pH roztworu elektrolitu podstawowego.

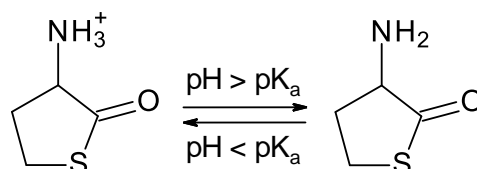
Na powyższym rysunku można zaobserwować, że wraz ze wzrostem wartości pH, maleje wysokość sygnału HTL. Wysokość pików przyjmuje wartość maksymalną zarówno przy pH 4,75 jak i 5,00.



Rys. 36. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od pH roztworu elektrolitu podstawowego.

Podobny przebieg zależności jak na **rysunku 35** można zauważyć na wykresie powyżej (**rysunek 36**). Wraz ze wzrostem pH zmniejsza się pole powierzchni sygnału HTL. Największą wartość pola powierzchni uzyskano stosując 0,1 mol/L BGE o pH = 4,75.

Spadek czy to wysokości pików, czy pola powierzchni sygnału HTL w BGE o pH powyżej 4,75 jest prawdopodobnie spowodowane tym, że wartość pH elektrolitu zbliża się do wartości pK_a dla HTL. Powoduje to spadek ładunku dodatniego zlokalizowanego na grupie aminowej w cząsteczce HTL, zgodnie z poniższym schematem przedstawionym na **rysunku 37**. W konsekwencji ruchliwość analitu maleje, a na skutek elektrodyspersji dochodzi do częściowej dyfuzji strefy.

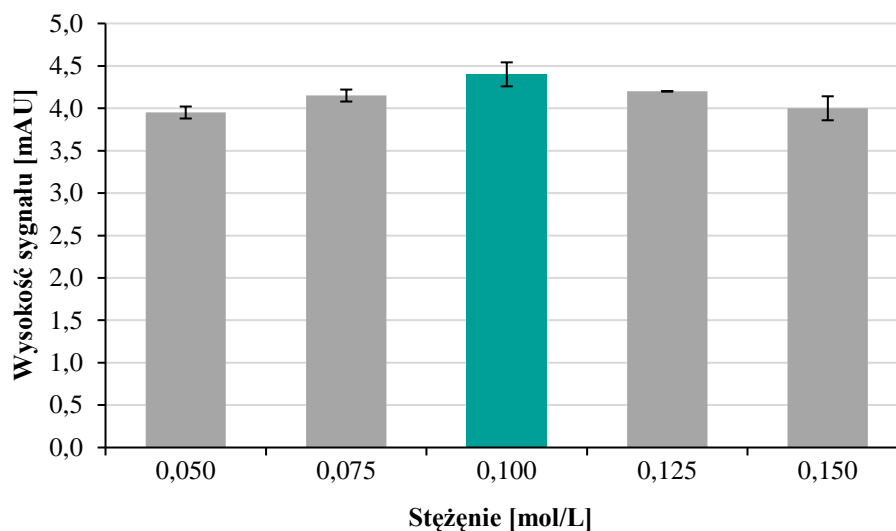


Rys. 37. Wpływ pH środowiska na ładunek cząsteczki HTL.

Stężenie BGE

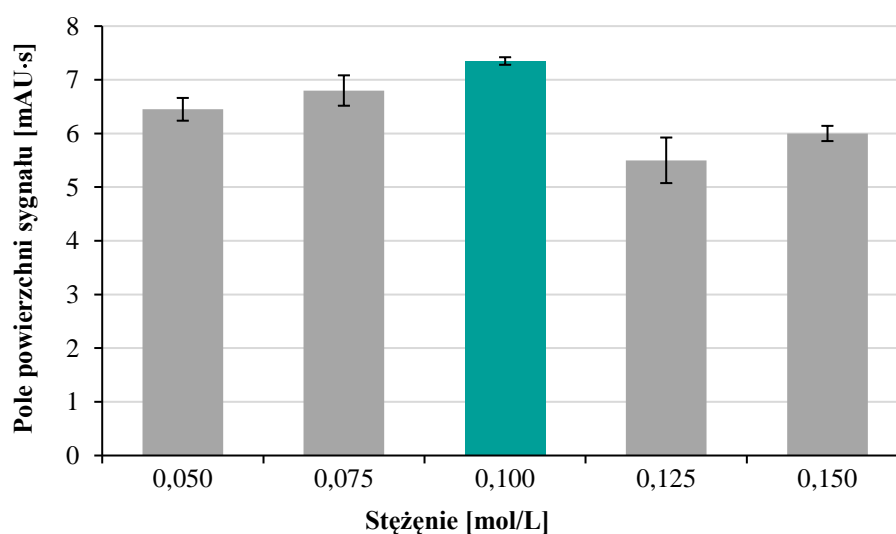
W kolejnym etapie doboru optymalnych warunków rozdzielania elektroforetycznego badany był wpływ stężenia elektrolitu podstawowego na wysokość i pole powierzchni sygnału

HTL. W tym celu przygotowano serię roztworów elektrolitu podstawowego (roztwór $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$) o $\text{pH} = 4,75$ i stężeniach w zakresie od 0,05 do 0,15 mol/L i przeprowadzono analizy elektroforetyczne próbek standardowych HTL. Z uzyskanych wyników sporządzono zależności wysokości i pola powierzchni pików HTL od stężenia roztworu elektrolitu wziętego do analizy (rysunki 38 i 39).



Rys. 38. Zależność wysokości sygnału HTL od stężenia roztworu elektrolitu podstawowego.

Na powyższym rysunku można zauważyć, że wraz ze wzrostem stężenia BGE nieznacznie rośnie wysokość sygnału HTL do wartości maksymalnej dla stężenia 0,1 mol/L. Dalszy wzrost stężenia BGE powoduje nieznaczny spadek wysokości pików.



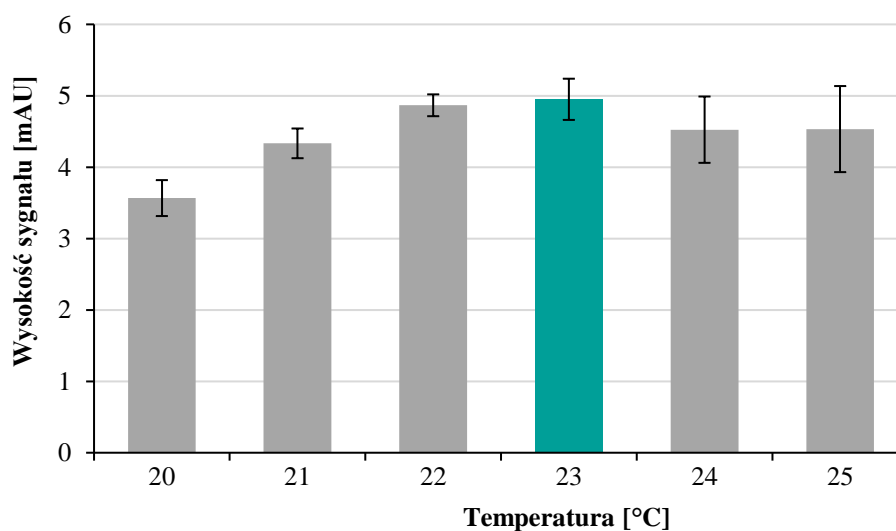
Rys. 39. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od stężenia roztworu elektrolitu podstawowego.

Na **rysunku 39** przebieg zależności pola powierzchni sygnału od stężenia elektrolitu podstawowego jest podobny jak na **rysunku 38**. Największe pole powierzchni pików otrzymano dla BGE o stężeniu 0,1 mol/L, przy czym dla wartości stężenia wynoszącego 0,125 mol/L nastąpił duży spadek pola powierzchni sygnału.

Biorąc pod uwagę powyższe do dalszych badań wybrano BGE o wartości stężenia równej 0,1 mol/L.

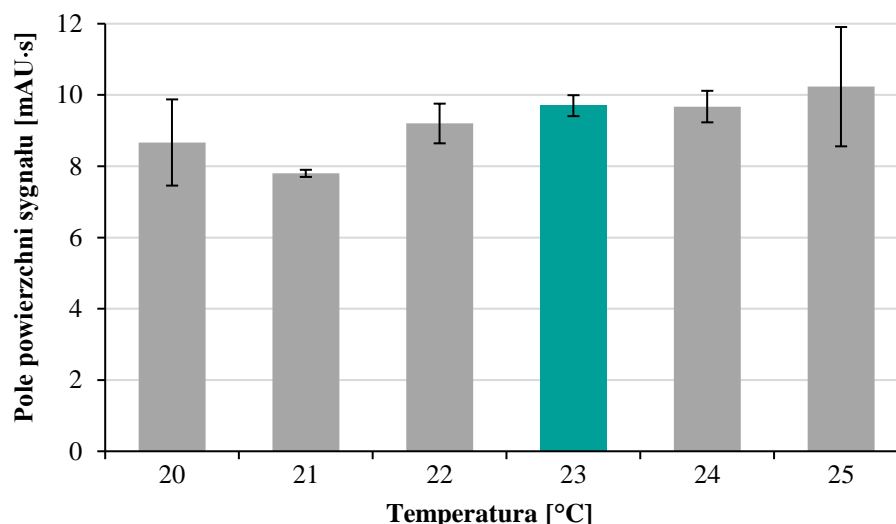
Temperatura kapilary

Ostatnim etapem optymalizacji warunków rozdzielania elektroforetycznego, było zbadanie wpływu temperatury kapilary na wysokość i pole powierzchni sygnału HTL. Wykres zależności wysokości/pola powierzchni sygnału od temperatury kapilary przedstawiono w zakresie od 20 do 25 °C (zmieniając temperaturę co 1 °C), gdyż dla temperatur niższych niż 20 °C czas migracji HTL był coraz dłuższy, co przekłada się na niepożądane wydłużenie czasu analizy (im niższa temperatura tym większa lepkość roztworu i mniejszy przepływ EOF). Z kolei gdy kapilarę termostatowano w temperaturach przekraczających 25 °C uzyskiwano coraz bardziej niepowtarzalne wyniki analiz. Na podstawie uzyskanych danych wykreślono zależności wysokości i pola powierzchni sygnału HTL od temperatury kapilary, co przedstawiono na **rysunkach 40 i 41**.



Rys. 40. Zależność wysokości sygnału HTL od temperatury kapilary.

Na wykresie zależności wysokości sygnału HTL od temperatury, zauważyć można, że wraz ze wzrostem temperatury wysokość pików początkowo rośnie do wartości maksymalnej dla 23 °C, zaś dalszy wzrost badanego parametru powoduje niewielki spadek wysokości pików.



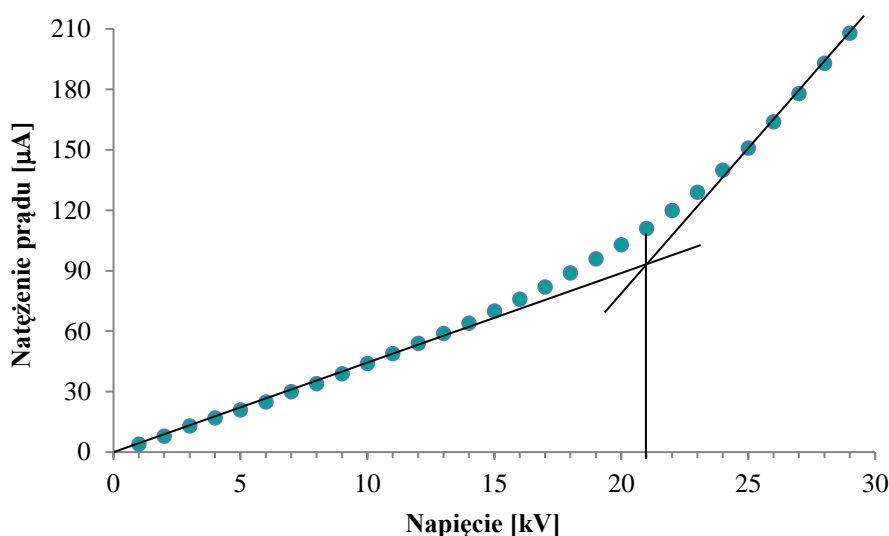
Rys. 41. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od temperatury kapilary.

Na wykresie zależności pola powierzchni sygnału HTL od temperatury, można z kolei zaobserwować początkowy lekki spadek wartości pola powierzchni wraz ze wzrostem temperatury. Jednakże dla temperatur wyższych niż 21 °C następowało zwiększanie się pola powierzchni. Dla temperatur powyżej 23 °C nie obserwuje się znaczących zmian pola powierzchni pików, natomiast powtarzalność wyników analiz pogarsza się, zwłaszcza w temperaturze 25 °C. Przebieg powyższych zależności (**rysunki 40 i 41**) można wytłumaczyć tym, że wzrost temperatury powoduje zmniejszenie lepkości roztworu elektrolitu do analizy, a w rezultacie poszerzenie strefy analitu, co skutkuje spadkiem wysokości, ale wzrostem pola powierzchni [229]. Ponadto w temperaturach powyżej 23 °C zaobserwowano komigrację nieznanego pików z pikami analitu, co uniemożliwiło dokładne odczytanie wysokości i powierzchni pików. Dlatego biorąc pod uwagę przedstawione wyżej zależności jako optymalną temperaturę kapilary wybrano wartość równą 23 °C.

Wartość przyłożonego napięcia

Obecnie wyznacznikami potencjału danej metody analitycznej jest możliwość poddania analizie jak największej ilości próbek w jak najkrótszym przedziale czasu przy jak najniższym nakładzie finansowym. W związku z tym dąży się do uzyskania jak najkrótszych analiz, ponieważ czas i koszt analizy to parametry, które są niezwykle znaczące w chemii analitycznej. Wiadomym jest, że jedną z zalet CE jest krótki czas analizy w porównaniu do technik HPLC czy GC [230]. Parametrem, który ma znaczący wpływ na czas analizy jest wartość przyłożonego napięcia (U), tzn. im wyższa wartość napięcia tym krótszy czas analizy oraz wyższa sprawność układu i lepsza separacja. Jednakże przy zbyt dużym napięciu wydzielana jest duża ilość ciepła (ciepło Joule'a). W celu wyboru maksymalnego napięcia przyłożonego podczas rozdzielania

elektroforetycznego, które nie będzie powodowało nadmiernego wydzielania ciepła, przeprowadzono badanie zależności natężenia prądu (I) od przyłożonego napięcia. W pierwszym kroku przykładano napięcie rosnące w zakresie od 1 do 30 kV odczytując odpowiadające im wartości natężenia prądu płynącego w układzie. Kolejnym krokiem było wykreślenie na podstawie uzyskanych danych z eksperymentu zależności $I = f(U)$. Następnie metodą graficzną wyznaczono wartość maksymalnego napięcia, tak jak to zostało przedstawione na poniższym wykresie (**rysunek 42**).



Rys. 42. Zależność natężenia prądu od przyłożonego napięcia. Wyznaczenie maksymalnego napięcia (U).

Na podstawie powyższego wykresu można zauważyć, że w danych warunkach pomiarowych maksymalne napięcie, które można zastosować do analiz elektroforetycznych wynosi około 21 kV.

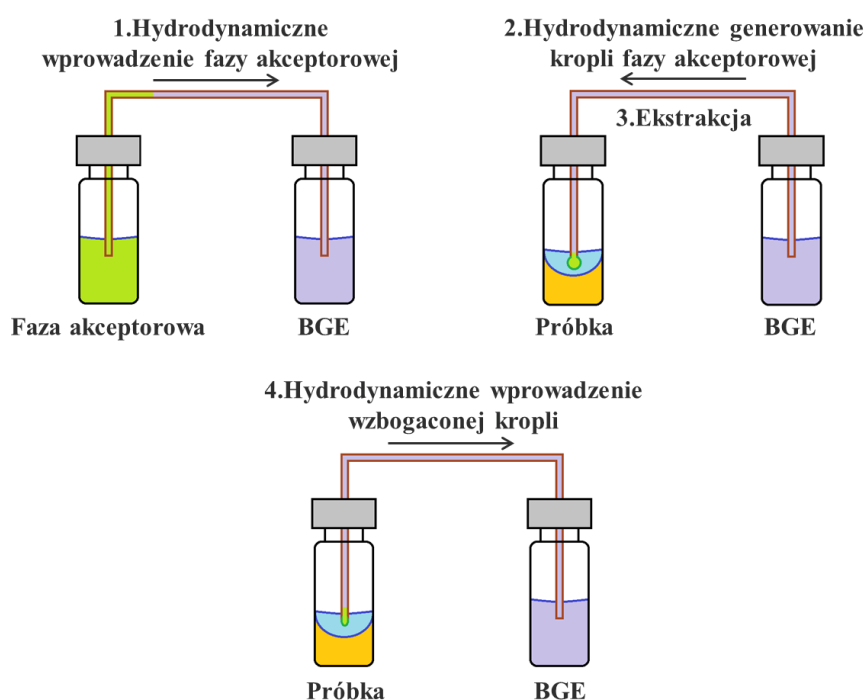
3.2. Dobór warunków ekstrakcji do pojedynczej kropli

Mikroekstrakcja do pojedynczej kropli (SDME) w niniejszej metodzie była realizowana w układzie trójfazowym, z ang. *liquid-liquid-liquid single drop microextraction*, oraz została zautomatyzowana w układzie pomiarowym elektroforezy kapilarnej (CE). Oznaczanie tiolaktonu homocysteiny (HTL) przeprowadzono w próbkach moczu pozornie zdrowych wolontariuszy różnej płci. Wszystkie próbki zostały przygotowane poprzez zmieszanie jej z buforem o odpowiednim pH i stężeniu. Bufor pełni ważną rolę podczas procesu ekstrakcji, ponieważ dobrze dostosowane stężenie obejmuje funkcję utrzymywania niezmiennego pH próbki. Z kolei odpowiednio dobrana wartość pH próbki wpływa na zwiększenie wydajności ekstrakcji, ponieważ w warunkach prowadzenia ekstrakcji cząsteczka analitu nie powinna posiadać

ładunku, gdyż w takim przypadku analit chętniej będzie dyfundował z fazy wodnej do fazy organicznej. Procedura ekstrakcji SDME składała się z następujących etapów:

1. Nałożenie warstwy fazy organicznej na powierzchnię próbki
2. Wstawienie przygotowanej próbki moczu z nałożoną warstwą organiczną do karuzeli automatycznego podajnika próbek w aparacie do CE
3. Pobranie do wlotowego końca kapilary roztworu fazy akceptorowej
4. Podstawienie próbki moczu pod wlotowy koniec kapilary
5. Wygenerowanie kropli fazy akceptorowej w warstwie organicznej
6. Pozostawienie układu na czas ekstrakcji do kropli
7. Po zakończeniu ekstrakcji pobranie do kapilary wzbogaconego roztworu kropli fazy akceptorowej.

Po wprowadzeniu do kapilary kropli ekstraktu, następuje podstawienie pod wlotowy koniec kapilary fiolki z roztworem elektrolitu podstawowego w celu przeprowadzenia analizy elektroforetycznej. Powyższe punkty przedstawiono schematycznie na **rysunku 43** poniżej.



Rys. 43. Schemat procedury SDME realizowanej w układzie pomiarowym CE.

Kolejnym etapem opracowania metody oznaczania HTL w moczu człowieka za pomocą CZE z wykorzystaniem SDME realizowanej w układzie pomiarowym CE, był dobór odpowiednich warunków ekstrakcji, który miał decydujące znaczenie dla wydajności wydzielenia analitu z próbki, stopnia zateżnienia analitu, a także jakości oraz powtarzalności procesu ekstrakcji. Zbadano następujące parametry:

- pH próbki,
- sposób przygotowania próbki do ekstrakcji,
- rodzaj rozpuszczalnika organicznego,
- rodzaj fazy akceptorowej oraz jej stężenie,
- czas ekstrakcji z fazy donorowej (próbki) do fazy organicznej,
- czas ekstrakcji z fazy organicznej do fazy akceptorowej (kropli).

Przy ocenie jakości otrzymanego sygnału HTL, przyjęto następujące kryteria: symetria, wysokość i pole powierzchni otrzymanego sygnału analitycznych oraz precyzja i dokładność metody.

W początkowej fazie eksperymentów związanych z opracowaniem procedury SDME w trybie on-line okazało się, że podczas analiz elektroforetycznych z wykorzystaniem zoptymalizowanych wcześniej warunków dochodziło do niecałkowitego rozdzielania się składników kropli wprowadzonej do kapilary. W związku z tym przeprowadzono ponowny dobór warunków separacyjnych CE, w wyniku którego zmianie uległy wartość zastosowanego napięcia i temperatura kapilary. Napięcie przykładane w momencie rozpoczęcia analizy elektroforetycznej wynosiło 24 kV, zaś temperaturę obniżono z 23 °C do 21 °C. Pozostałe parametry, tj. stężenie i pH BGE, nie uległy zmianie.

Dobór pH próbki

Podczas przygotowania próbki do ekstrakcji, odpowiedni dobór pH pełni bardzo ważną rolę. Wiadomym jest, że do tego procesu używane są w większości przypadków niepolarne rozpuszczalniki organiczne niemieszające się z wodą (która zazwyczaj stanowi rozpuszczalnik próbki). Dlatego ważnym jest, aby cząsteczka ekstrahowanego analitu nie posiadała ładunku, aby umożliwić łatwiejszy transport cząsteczek analitu z próbki do fazy organicznej, a w efekcie uzyskać jak najwyższe wydajności ekstrakcji [231]. W związku z powyższym, znajomość ujemnego logarytmu dziesiątego ze stałej dysocjacji kwasowej – pK_a dla analitu/ów wydaje się kluczowa. Z kolei w przypadku analitów, które nie posiadają ładunku bez względu na pH, etap przygotowania próbki jest krótszy i prostszy, gdyż nie wymaga dobrania odpowiedniego pH środowiska. Cząsteczka HTL, której wartość pK_a wynosi 6,67 [1], posiada w swojej strukturze grupę aminową. Z tego powodu w zasadowym pH nie będzie obdarzona ładunkiem dodatnim. Z kolei obniżenie pH środowiska poniżej pK_a skutkuje pojawieniem się ładunku dodatniego w wyniku przyłączenia protonu do grupy aminowej, co obrazuje **rysunek 37**. Mocz posiada własne charakterystyczne pH, mieszczące się w zakresie od 4,5 do 7,8 [232]. Z tego powodu dobrano optymalne stężenie oraz pH buforu fosforanowego, który wykorzystywano do

przygotowania próbki moczu do procedury ekstrakcji, ponieważ stężenie buforu powinno być odpowiednie i wystarczająco duże, aby nadmiernie nie rozcieńczać próbki moczu oraz utrzymać pH na stałym poziomie powyżej pK_a dla HTL.

Przed przystąpieniem do pomiaru pH, próbkę moczu odwirowano przy $13700 \times g$. Następnie pobrano 200 μL supernatantu, dodano 400 μL buforu fosforanowego i dokładnie wymieszano. Stężenia oraz pH buforu fosforanowego wziętego do przygotowania próbki moczu były następujące:

- 0,01 mol/L, pH = 8,0
- 0,01 mol/L, pH = 11,4
- 0,01 mol/L, pH = 11,5
- 0,01 mol/L, pH = 12,0
- 0,02 mol/L, pH = 8,0
- 0,05 mol/L, pH = 8,0
- 0,2 mol/L, pH = 8,0
- 0,2 mol/L, pH = 8,2.

Pomiary pH próbek moczu wziętych od 3 różnych wolontariuszy wykonano za pomocą pH-metru w celu sprawdzenia czy wartości pH przygotowanych próbek w wyżej wymieniony sposób będą do siebie zbliżone, bez względu na fizjologiczne właściwości osobnicze wolontariuszy. Po wykonaniu pomiarów pH próbek moczu, do których dodano bufor fosforanowy o stężeniu 0,01 mol/L oraz pH 8,0; 11,5; 12, okazało się, że końcowy odczyn próbki był niższy niż pK_a dla HTL. W dalszej kolejności zmierzono pH mieszaniny moczu oraz buforu fosforanowego o pH = 8,0 i stężeniu 0,02; 0,05; 0,2 mol/L w stosunku objętościowym 1:2. Na podstawie uzyskanych pomiarów zauważono, że wraz ze wzrostem stężenia buforu rośnie końcowe pH próbki. Dopiero zastosowanie buforu o stężeniu 0,2 mol/L pozwoliło na uzyskanie końcowego pH nieznacznie wyższego niż pK_a dla HTL ($> 7,0$). Następnie użyto buforu fosforanowego o stężeniu 0,2 mol/L i pH = 8,2. Dzięki zastosowaniu buforu, którego pH było większe o 0,2 jednostki, również otrzymano zbliżone wartości pH dla różnych próbek moczu, jednak końcowy odczyn wyraźnie przekraczał pK_a dla HTL ($pH > 7,5$). Ostatecznie do przygotowania próbki moczu do procedury SDME wybrano bufor fosforanowy o stężeniu 0,2 mol/L i pH = 8,2.

Przygotowanie próbki do procedury ekstrakcji

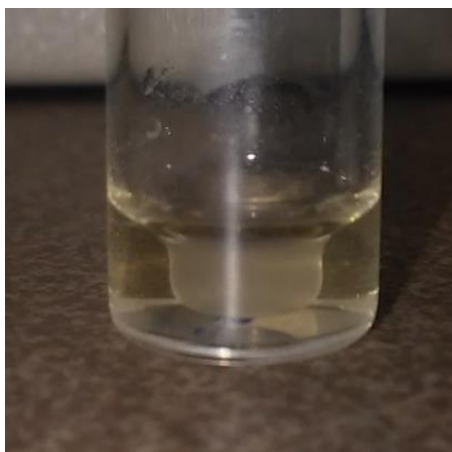
Właściwe przygotowanie próbki do procesu ekstrakcji stanowi kluczowy element, gdyż umożliwia ono poprawne jej wykonanie oraz ekstrahowanie analitu z możliwie jak najwyższą

wydajnością. W prezentowanej metodzie przygotowanie próbki polegało na dodaniu do próbki moczu 0,2 mol/L roztworu buforu fosforanowego o pH = 8,2, w takim stosunku objętościowym, aby możliwe było nałożenie warstwy organicznej oraz aby nadmiernie nie rozcieńczać próbkę, co w konsekwencji pozwoliło na uzyskanie niskich wartości granic wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ). Warstwę organiczną stanowiło 100 μ L mieszaniny chloroform:metanol (2:1, v/v). Ogólny schemat przygotowania próbki do ekstrakcji przedstawia **rysunek 44**.



Rys. 44. Schemat przygotowania próbki moczu do procedury SDME.

Mając na uwadze to, że gęstość chloroformu jest znacznie wyższa od gęstości wody (oraz jej roztworów) [233], wiadomym jest, że dodanie chloroformu do wody spowoduje jego opadnięcie na dno naczynka. Jednak w wyniku istnienia dwóch sił: siły wyporu i napięcia powierzchniowego możliwe jest nałożenie wąskiej warstwy chloroformu na roztwór wodny w taki sposób, aby utrzymywała się na powierzchni tego roztworu [234]. Przeprowadzenie eksperymentu polegało na dodaniu do moczu takich objętości buforu, aby stosunek mocz:bufor (v/v) wynosił: 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, następnie nałożeniu rozpuszczalnika organicznego na powierzchnię próbki i obserwacji zachowania się warstwy organicznej. Eksperyment powtórzono dla trzech niezależnych próbek moczu otrzymanych od różnych wolontariuszy. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów zaobserwowano, że im większe rozcieńczanie moczu przez bufor, tym faza organiczna na powierzchni próbki była stabilniejsza, tzn. czas po którym warstwa chloroformowa opadała na dno był coraz dłuższy, oraz łatwiej było nałożyć warstwę organiczną na powierzchnię próbki. Z drugiej strony zastosowanie większej objętości buforu powodowało jednak coraz większe rozcieńczenie próbki moczu. W związku z powyższym postanowiono zredukować objętość nakładanej warstwy organicznej na powierzchnię próbki ze 100 μ L do 60 μ L. Mniejsze objętości warstwy organicznej były nie wystarczające do wytworzenia w nich kropli akceptora. Redukcja objętości pozwoliła na łatwiejsze nakładanie warstwy mieszaniny chloroformu i metanolu na powierzchnię próbki, warstwa organiczna wykazywała jeszcze większą stabilność, jednak nadal opadała ona na dno naczynka po kilkudziesięciu sekundach, czego skutek pokazano na **rysunku 45**.



Rys. 45. Próbkę moczu z warstwą organiczną, która opadła na dno fiolki.

Z powodu niepowodzenia powyżej opisanych eksperymentów postanowiono zmodyfikować procedurę przygotowania próbki. Zrezygnowano z nakładania na powierzchnię próbki mieszanki chloroformu i metanolu na rzecz dodania 20 μL metanolu bezpośrednio do próbki, zaraz przed nałożeniem na jej powierzchnię warstwy chloroformu. W trakcie kolejnego eksperymentu zauważono, że dla próbki mieszaniny moczu i buforu w stosunku 1:1 (v/v) nie zaobserwowano zjawiska opadania warstwy organicznej na dno fiolki, co pokazano na **rysunku 46**.



Rys. 46. Próbkę moczu z nałożoną warstwą organiczną.

Na podstawie opisanych powyżej obserwacji w dalszych badaniach przygotowywano próbkę moczu w następujący sposób:

1. Dodano 200 μL moczu do próbówki Eppendorfa o objętości 1,5 mL,
2. Dodano 200 μL 0,2 mol/L buforu fosforanowego o pH = 8,2,
3. Przeniesiono 275 μL mieszaniny mocz:bufor (1:1, v/v) do szklanej fiolki,
4. Dodano 20 μL metanolu do mieszaniny,

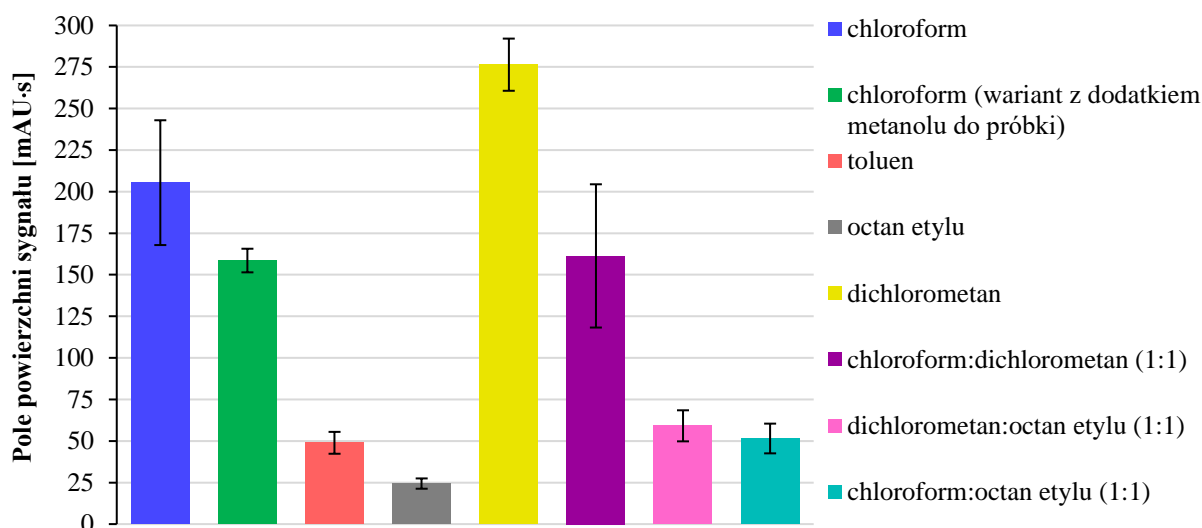
5. Nałożono warstwę fazy organicznej na powierzchnię próbki moczu przygotowanej zgodnie z punktami 1 - 4.

Dobór rozpuszczalnika organicznego

Rozpuszczalnik organiczny stosowany do ekstrakcji powinien posiadać odpowiednie właściwości. Po pierwsze nie powinien mieszać się z roztworami wodnymi, po drugie wykazywać dobrą selektywność w stosunku do analitu [235] a także zapewnić zadowalającą odtwarzalność oraz wydajność procesu ekstrakcji [236]. W tym celu zbadano wpływ następujących rozpuszczalników na wydajność ekstrakcji: chloroform, dichlorometan, octan etylu, toluen oraz ich mieszaniny. Zbadano również wpływ dodatku metanolu bezpośrednio do próbki na wydajność ekstrakcji, podczas stosowania badanych rozpuszczalników organicznych nakładanych na próbkę. Próbkę moczu do analizy przygotowano zgodnie z opisem w **podrozdziale 3.2 – Przygotowanie próbki do procedury ekstrakcji**. Następnie dla przygotowanej próbki przeprowadzono procedurę SDME w układzie pomiarowym CE, zaś po jej zakończeniu kroplę fazy akceptorowej poddano analizie elektroforetycznej. Wstępna procedura mikroekstrakcji była następująca:

1. Hydrodynamiczne wprowadzenie do wlotowego końca kapilary, pod ciśnieniem 50 mbar przez 20 s (co odpowiada objętości równej ~121 nL), roztworu fazy akceptorowej, którą stanowił 0,0075 mol/L roztwór kwasu solnego,
2. Podstawienie pod wlotowy koniec kapilary fiolki zawierającej próbkę z nałożoną warstwą organiczną,
3. Zanurzenie kapilary w warstwie organicznej,
4. Hydrodynamiczne wygenerowanie kropli fazy akceptorowej stosując ciśnienie -50 mbar przez 20 s,
5. Pozostawienie układu na czas ekstrakcji – 5 min,
6. Po zakończeniu ekstrakcji hydrodynamiczne wprowadzenie wzbogaconego roztworu kropli do kapilary (8 mbar przez 8 s – co odpowiada objętości równej ~8 nL),

W przypadku chloroformu, dodatek metanolu do próbki spowodował, że pola powierzchni pików były nieco niższe niż dla wariantu bez dodatku metanolu, jednak powtarzalność otrzymanych wyników była zdecydowanie lepsza. Z kolei dla innych rozpuszczalników dodatek metanolu do próbki również powodował uzyskiwanie niższych sygnałów, ale dodatkowo skutkowało tym, że powtarzalność wyników analiz były pogorszone w porównaniu do braku zastosowania dodatku metanolu.



Rys. 47. Wpływ rodzaju rozpuszczalnika lub mieszaniny rozpuszczalników na wydajność ekstrakcji.

Na podstawie powyższego wykresu (**rysunek 47**) można zauważyć, że najwyższe pole powierzchni sygnału pochodzącego od wyekstrahowanego HTL otrzymano stosując dichlorometan jako rozpuszczalnik organiczny. Mniejsze pole powierzchni sygnału uzyskano dla warstwy chloroformowej. Po analizie próbki, do której dodano metanol przed nałożeniem warstwy chloroformowej, pole powierzchni było podobne jak dla mieszaniny chloroform:dichlorometan (1:1), jednakże powtarzalność wyników analiz była zdecydowanie lepsza. Mimo iż najlepsze parametry sygnału HTL otrzymano dla dichlorometanu, to szybkość parowania tego rozpuszczalnika była bardzo duża, co nie pozwalało na wydłużenie czasu ekstrakcji ponad 5 min, ponieważ warstwa robiła się na tyle wąska, że kropla fazy akceptorowej się w niej nie mieściła. Dla chloroformu pola powierzchni były mniejsze niż dla dichlorometanu, jednak szybkość parowania tego rozpuszczalnika była na tyle mała, iż pozwalała na zbadanie wpływu czasu ekstrakcji na jej wydajność. Powtarzalność wyników analiz w tym przypadku, wyrażona jako względne odchylenie standardowe (RSD) w procentach była jednak niezadowalająca (RSD > 15%). Na podstawie powyższych obserwacji i wyciągniętych wniosków zdecydowano o wyborze wariantu, w którym najpierw dodano metanol bezpośrednio do próbki, a potem nałożono warstwę chloroformową. W tym przypadku pola powierzchni sygnału były względnie wysokie oraz powtarzalność wyników była dobra (RSD ok. 4,5%).

Dobór objętości próbki (głębokość zanurzenia kropli w warstwie fazy organicznej)

Celem tego eksperymentu było uzyskanie jak najlepszej wydajności ekstrakcji poprzez zbadanie głębokości zanurzenia kropli w warstwie chloroformowej. Z powodu ograniczenia aparaturowej możliwości regulacji zanurzenia kapilary w fiolce, eksperyment wykonano

poprzez przygotowanie próbek o wzrastających objętościach od 100 do 300 μL , przy stałej objętości fazy organicznej wynoszącej 40 μL . Przy czym do każdej z tych próbek przed nałożeniem fazy organicznej dodawano stałą objętość metanolu wynoszącą 20 μL – czyli zgodnie z procedurą ekstrakcji opisaną w **podrozdziale 3.2 – Dobór rozpuszczalnika organicznego**. W **tabeli 2** przedstawiono natomiast uzyskane wyniki analiz.

Tabela 2. Wpływ objętości próbki w fiolce na wydajność ekstrakcji.

Objętość mieszaniny mocz:bufor (1:1, v/v) [μL]	Objętość metanolu dodanego do próbki [μL]	Objętość fazy organicznej (chloroformowej) [μL]	Średnia wysokość sygnału \pm SD [mAU]	RSD [%]	Średnie pole powierzchni próbki \pm SD [mAU·s]	RSD [%]
100	20	40	Brak sygnału			
150	20	40	Brak sygnału			
200	20	40	Brak sygnału			
250	20	40	76,4 \pm 8,9	11,7	228,0 \pm 43,6	19,1
275	20	40	83,7 \pm 2,4	2,9	278,7 \pm 2,5	0,9
300	20	40	76,9 \pm 5,2	6,8	247,7 \pm 26,0	10,5

n=3

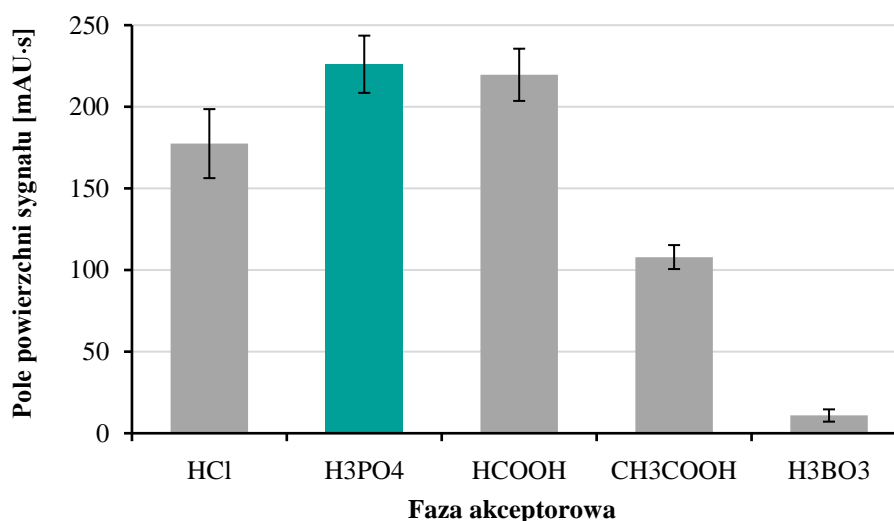
Zgodnie z danymi w **tabeli 2** dla pierwszych trzech objętości fazy donorowej próbki (100 - 200 μL) nie uzyskano sygnału analitycznego, co oznaczało, że kropla fazy akceptorowej nie była zanurzona w warstwie chloroformowej. Natomiast, dla próbek o objętościach 250 μL oraz 300 μL sygnały HTL były mniejsze niż dla próbki o objętości 275 μL . Można to wytłumaczyć w ten sposób, że albo kropla była zbyt płytko zanurzona i ledwie sięgała warstwy organicznej, albo zbyt głęboko przez co kropla mogła stykać się z granicą międzyfazową próbka – rozpuszczalnik organiczny. Co więcej, najlepsze parametry sygnałów oraz wartości precyzji uzyskano również dla objętości próbki wynoszącej 275 μL . Taka objętość próbki w fiolce została dlatego wybrana jako optymalna do kolejnych eksperymentów.

Dobór rodzaju fazy akceptorowej oraz jej stężenia.

Faza akceptorowa w trójfazowej mikroekstrakcji pełni dwie ważne role. Pierwsza dotyczy samego procesu SDME, a dokładniej dyfuzji ekstrahowanego analitu do kropli fazy akceptorowej, kiedy to pH fazy akceptorowej odgrywa kluczową rolę. W klasycznej ekstrakcji cieczy-ciecz pH próbki jest dobrane w taki sposób, aby cząsteczki analitu nie posiadały ładunku, co

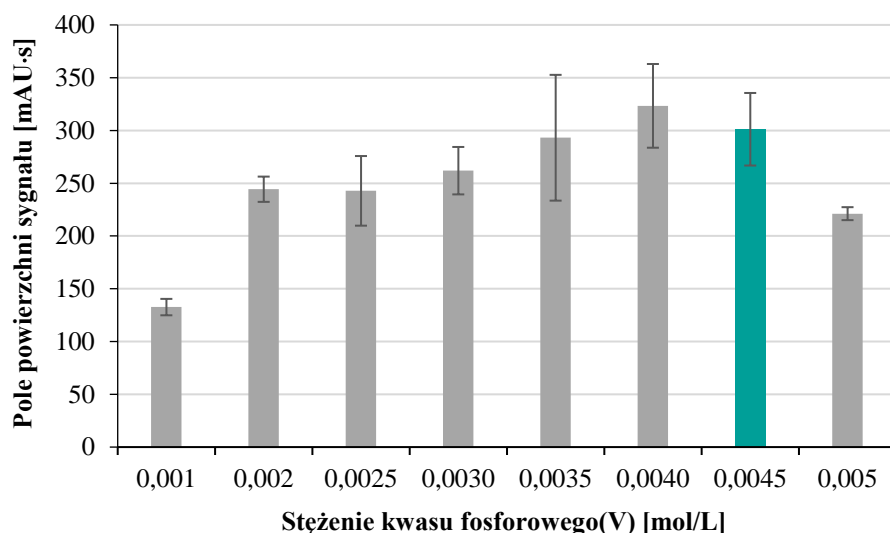
ułatwia i zwiększa wydajność ekstrakcji z próbki do fazy organicznej [235]. Natomiast pH roztworu kropli fazy akceptorowej powinno być tak dobrane, aby reekstrahowana do niej cząsteczka analitu zyskała ładunek. Nie zachodzi wtedy powrotny transport analitu z kropli fazy akceptorowej do fazy organicznej, co skutkuje wzrostem wydajności ekstrakcji [235]. Drugim ważnym powodem odpowiedniego wyboru fazy akceptorowej do SDME realizowanej w układzie pomiarowym CE, jest zastosowanie strefowej elektroforezy kapilarnej (CZE) do rozdzielania składników próbki. Dla tej techniki koniecznym jest, aby cząsteczka analitu występowała w formie jonu, tj. kationu lub anionu [227, 237].

W pierwszym etapie eksperymentu sprawdzono wpływ rodzaju fazy akceptorowej na wydajność ekstrakcji. W tym celu jako fazę akceptorową zastosowano 0,002 mol/L roztwory następujących kwasów: solnego, octowego, mrówkowego, fosforowego(V) i borowego. Procedura SDME była zgodna z opisem w **podrozdziale 3.2 – Dobór rozpuszczalnika organicznego**. Wyniki analiz przedstawiono w formie wykresu zależności pola powierzchni piku od rodzaju kwasu jako fazy akceptorowej (**rysunek 48**).



Rys. 48. Wpływ rodzaju kwasu na wydajność ekstrakcji.

Na **rysunku 48** można zauważyć, że największe pole powierzchni sygnału otrzymano dla roztworu kwasu fosforowego(V). Roztwór tego kwasu wybrano do dalszego etapu badań, czyli optymalizacji stężenia kwasu, w celu dalszego zwiększenia wydajności ekstrakcji. W związku z powyższym, optymalizację stężenia H_3PO_4 przeprowadzono stosując zakres stężeń od 0,001 do 0,005 mol/L. Otrzymaną zależność pola powierzchni sygnału od stężenia kwasu fosforowego(V) przedstawiono w postaci wykresu na **rysunku 49**.

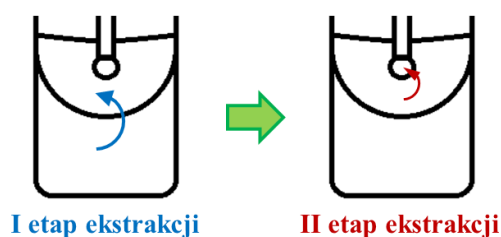


Rys. 49. Wpływ stężenia kwasu fosforowego(V) na wydajność ekstrakcji.

Na przedstawionej zależności łatwo jest zauważyć, że największe pole powierzchni piku uzyskano dla stężenia H_3PO_4 wynoszącego 0,004 mol/L. Jednakże powtarzalność analiz dla kwasu o tym stężeniu nie była zadowalająca. Ostatecznie wybrano stężenie kwasu równe 0,0045 mol/L, gdyż pole powierzchni sygnału było względnie duże, a precyzja dużo lepsza.

Dobór czasu ekstrakcji z próbki do fazy organicznej

Wiedząc, że SDME polega na ekstrakcji analitu z próbki jako fazy donorowej, przez fazę organiczną, do kropli fazy akceptorowej, wyróżnić można dwa etapy ekstrakcji. Pierwszym etapem jest ekstrakcja analitu z próbki do fazy organicznej, zaś drugim etapem jest reekstrakcja z fazy organicznej do kropli fazy akceptorowej, co schematycznie przedstawiono na **rysunku 50**.



Rys. 50. Schemat przedstawiający dwuetapową ekstrakcję SDME.

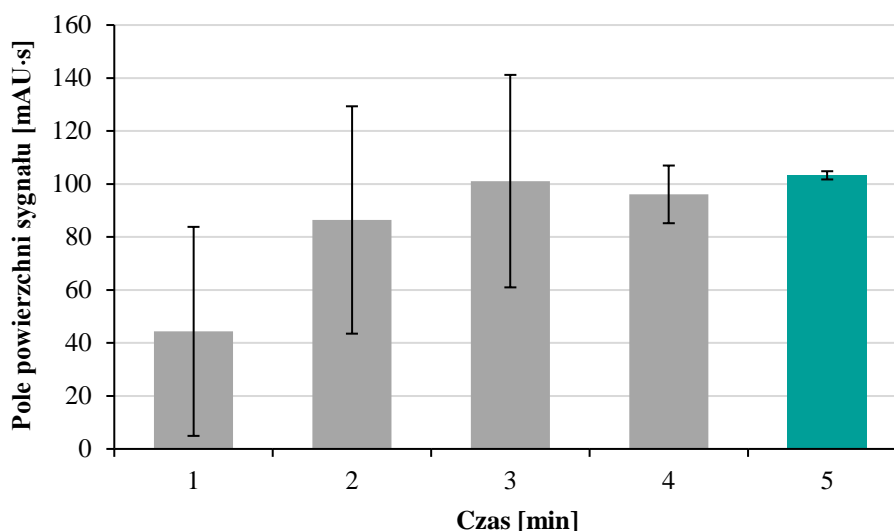
W tym podrozdziale opisano badanie wpływu czasu ekstrakcji z próbki do fazy akceptorowej, a dokładnie wpływu czasu jaki upłynął pomiędzy przygotowaniem próbki moczu a wygenerowaniem kropli na wydajność SDME. Procedura ekstrakcji była następująca:

1. Hydrodynamiczne wprowadzenie do wlotowego końca kapilary, pod ciśnieniem 50 mbar przez 20 s, roztworu fazy akceptorowej, którą stanowił 0,0045 mol/L roztwór kwasu fosforowego(V),

2. Podstawienie fiołki z nałożoną warstwą organiczną pod wlotowy koniec kapilary,
3. Zanurzenie kapilary w warstwie organicznej,
4. Hydrodynamiczne wygenerowanie kropli fazy akceptorowej stosując ciśnienie wsteczne 50 mbar przez 20 s,
5. Pozostawienie układu na czas ekstrakcji – 5 min,
6. Po zakończeniu ekstrakcji hydrodynamiczne wprowadzenie wzbogaconego roztworu kropli do kapilary (8 mbar przez 8 s).

Po zakończeniu ekstrakcji i wprowadzeniu do kapilary kropli ekstraktu, pod wlotowy koniec kapilary podstawiono fiołkę z roztworem elektrolitu podstawowego i przeprowadzono analizę elektroforetyczną.

Wystarczająco długi czas pierwszego etapu ekstrakcji pozwala na ustalenie stanu równowagi pomiędzy fazą donorową próbki (mocz) a fazą organiczną (warstwa chloroformowa), co w efekcie poprawia powtarzalność procesu ekstrakcji z próbki do kropli fazy akceptorowej. Czas pierwszego etapu SDME badano w zakresie od 1 do 5 min, stosując jednoczesne odstępy. Wyniki analiz przedstawiono na poniższym wykresie (**rysunek 51**).



Rys. 51. Wpływ czasu pomiędzy przygotowaniem próbki a wytworzeniem kropli na pole powierzchni sygnału HTL.

Na podstawie wyników eksperymentu wyciągnięto następujące wnioski, otóż czas od nałożenia warstwy chloroformowej na powierzchnię próbki do wygenerowania kropli fazy akceptorowej dłuższy niż 3 min pozwala na ustalenie się równowagi I etapu ekstrakcji. Jak można zauważyć na **rysunku 51**, powtarzalność procesu ekstrakcji polepsza się sukcesywnie wraz z wydłużaniem tego czasu i jest najlepsza dla 5 min. Wydłużenie czasu I etapu ekstrakcji ponad 5 min ani nie powodowało wzrostu pola powierzchni ani zwiększenia powtarzalności procesu ekstrakcji.

W związku z tym próbka moczu powinna być przygotowana co najmniej 5 min przed wygenerowaniem kropli, aby otrzymać zadowalającą wydajność ekstrakcji oraz odpowiednią precyzję oznaczeń.

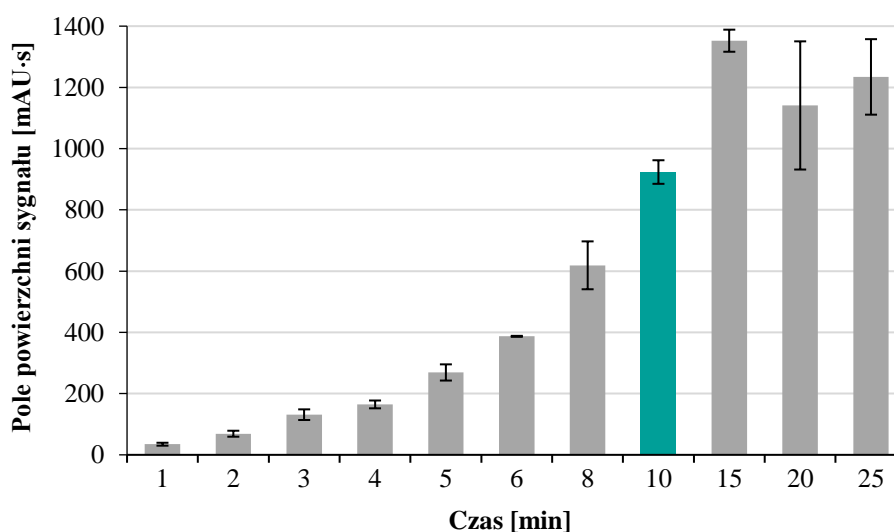
Dobór czasu ekstrakcji fazy organicznej do kropli

Jak już wspomniano w **podrozdziale 3.2 – Dobór czasu ekstrakcji z próbki do fazy organicznej** ekstrakcja analitu z warstwy chloroformowej do kropli, w tym wypadku roztwór 0,0045 mol/L H_3PO_4 , jest drugim etapem ekstrakcji. W trakcie eksperymentu zbadano wpływ czasu ekstrakcji analitu z fazy organicznej do kropli w zakresie od 1 do 25 min na wydajność ekstrakcji. Procedura ekstrakcji była następująca:

1. Hydrodynamiczne wprowadzenie do wlotowego końca kapilary, pod ciśnieniem 50 mbar przez 20 s, roztworu fazy akceptorowej, którą stanowił 0,0045 mol/L roztwór kwasu fosforowego(V),
2. Podstawienie fiołki z nałożoną warstwą organiczną pod wlotowy koniec kapilary,
3. Zanurzenie kapilary w warstwie organicznej,
4. Hydrodynamiczne wygenerowanie kropli fazy akceptorowej stosując ciśnienie wsteczne 50 mbar przez 20 s (po 5 minutach od przygotowania próbki),
5. Pozostawienie układu na badany czas ekstrakcji – 1 - 25 min,
6. Po zakończeniu ekstrakcji hydrodynamiczne wprowadzenie wzbogaconego roztworu kropli do kapilary (8 mbar przez 8 s),

Po zakończonej ekstrakcji nastąpiło podstawienie pod wlotowy koniec kapilary fiołki z roztworem elektrolitu w celu przeprowadzenia analizy elektroforetycznej.

Wyniki przeprowadzonego eksperymentu przedstawiono w formie wykresu na **rysunku 52**.



Rys. 52. Zależność wydajności ekstrakcji do kropli fazy akceptorowej od czasu.

Zgodnie z oczekiwaniem, wraz ze wzrostem czasu II etapu SDME rośnie wydajność procesu ekstrakcji. Zauważyć można również, że wydajność ekstrakcji dłuższa niż 15 min nie zmienia się, co może świadczyć o tym, że po 15 minutach ustala się stan równowagi pomiędzy fazą donorową próbki, fazą organiczną i kroplą fazy akceptorowej. Jednakże podczas prowadzenia eksperymentu zauważono, że w trakcie ekstrakcji trwającej 15 min, wytworzona kropla samostannie „chowała się” do kapilary. W celu wyeliminowania tego zjawiska postanowiono zastosować ciśnienie wsteczne poprzez cykliczne przykładanie niskiego ciśnienia w krótkim czasie do wylotowego końca kapilary. Ponadto wlotowy koniec kapilary był czyszczony izopropanolem codziennie przed rozpoczęciem eksperymentów. Niestety zabiegi te nie wpłynęły pozytywnie na stabilizowanie kropli fazy akceptorowej. Zastosowanie ciśnienia wstecznego skutkowało wręcz pogorszeniem parametrów sygnałów, tj. znacznym zmniejszeniem wysokości oraz pola powierzchni uzyskiwanych pików oraz spadkiem powtarzalności wyników. W związku z powyższym postanowiono zrezygnować z ciśnieniowego stabilizowania kropli na rzecz wysunięcia wlotowego końca kapilary względem wylotu kapilary, tak aby efekt chowania się kropli był zminimalizowany. Dzięki takiemu zabiegowi udało się zahamować efekt chowania kropli w trakcie ekstrakcji trwającej 10 min. Zgodnie z powyższym do dalszych badań wybrano czas II etapu ekstrakcji wynoszący 10 min.

3.3. Wyznaczenie stopnia zateżenia analitu – współczynnik wzmocnienia czułości metody

Jedną z najpopularniejszych metod wyznaczania wydajności zateżenia analitu jest wyznaczenie tzw. współczynnika wzmocnienia czułości (SEF) metody. Metoda ta polega na wyznaczeniu wzmocnienia czułości poprzez porównanie wysokości lub pola powierzchni sygnału analitu, otrzymanego po analizie metodą zawierającą etap zateżenia analitu z parametrami sygnału otrzymanymi po analizie metodą, która tego etapu nie zawiera. W prezentowanej pracy, do obliczenia SEF wykorzystano wartość pola powierzchni sygnału otrzymanego po analizie moczu doszczepionego znaną ilością standardu HTL, zgodnie z poniższym równaniem:

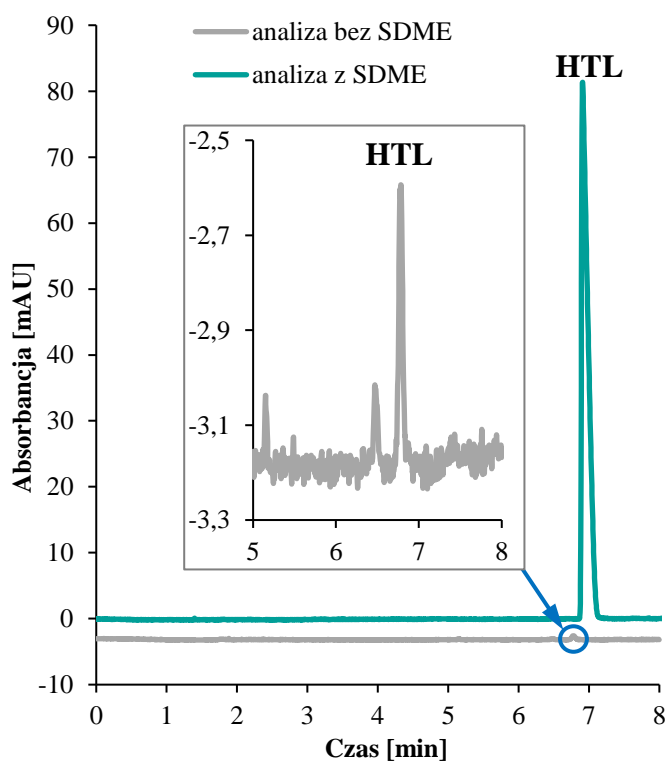
$$SEF_A = \frac{A_{SDME}}{A} \cdot \frac{C}{C_{SDME}} \quad (9)$$

gdzie: A_{SDME} – pole powierzchni pików otrzymanego po analizie moczu metodą wykorzystującą procedurę SDME, A – pole powierzchni pików otrzymanego po analizie moczu metodą bez SDME, C_{SDME} – stężenie analitu w próbce poddanej analizie z etapem SDME, C – stężenie analitu w próbce poddanej analizie bez etapu SDME.

W celu wyznaczenia SEF prezentowanej metody SDME-CZE, przygotowano dwie próbki moczu zgodnie z procedurą opisaną w **podrozdziale 3.2 – Przygotowanie próbki do procedury ekstrakcji**, następnie jedną poddano analizie techniką kapilarnej elektroforezy strefowej (CZE) z zastosowaniem SDME jako metody zatężania, zaś drugą próbkę poddano analizie za pomocą CZE bez SDME, przy czym:

- w obu metodach próbkę moczu doszczepiono znaną ilością standardu HTL, tak aby jego stężenie wynosiło 50 $\mu\text{mol/L}$ moczu;
- próbkę moczu, którą analizowano bez użycia SDME, przygotowano poprzez rozcieńczenie jej wodą dejonizowaną w stosunku objętościowym 1:1 (v/v). Ten zabieg miał na celu dostosowanie przewodnictwa próbki do przewodnictwa BGE, dzięki czemu uzyskano bardziej symetryczny sygnał HTL.

W celu wyznaczenia SEF_A analizie poddano próbki moczu przygotowane w trzech powtórzeniach zgodnie z powyższą procedurą. Wartość SEF_A obliczona z równania (9) wyniosła około 340. Poniżej przedstawiono reprezentatywne elektroforegramy uzyskane po analizie moczu metodą z wykorzystaniem SDME oraz po analizie moczu zgodnie z procedurą bez zatężania (**rysunek 53**).



Rys. 53. Reprezentatywne elektroforegramy uzyskane po analizie próbki moczu zawierającej HTL o stężeniu 50 $\mu\text{mol/L}$ metodą wykorzystującą SDME (zielona linia) oraz metodą bez stosowania SDME (szara linia).

3.4. Walidacja opracowanej metody

Walidację opisanej metody wykonano zgodnie z kryteriami przyjętymi dla próbek biologicznych [228], stosując zoptymalizowane parametry elektroforetyczne oraz warunki ekstrakcji SDME. Podczas walidacji metody wyznaczono: granicę wykrywalności (LOD) oraz granicę oznaczalności (LOQ), zakres liniowości, wewnątrz- oraz międzylaboratoryjną precyzję i dokładność. Ponadto przeprowadzono porównanie opracowanej metody z innymi, opisanymi w literaturze naukowej, procedurami oznaczania HTL w moczu [55, 90, 92, 93, 98, 100-102].

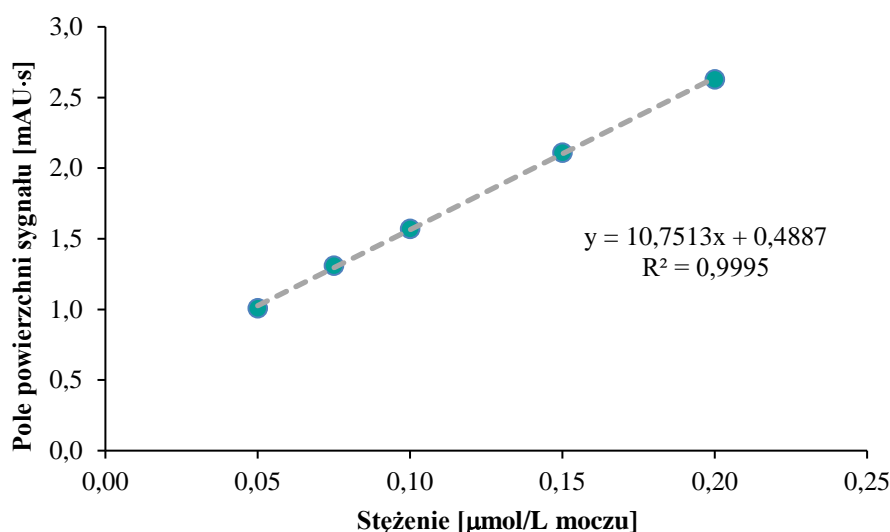
Wyznaczenie wartości LOD i LOQ przeprowadzono poprzez przygotowanie i analizę serii próbek o malejącym stężeniu HTL i porównanie otrzymanego stosunku wysokości sygnału analitycznego do szumu linii podstawowej S/N, gdzie S oznacza wysokość sygnału, a N wysokość szumu linii podstawowej [238]. Wobec tego przyjęto, że dla LOD wysokość sygnału HTL była 3 razy większa od wysokości szumu linii podstawowej, natomiast dla LOQ wysokość sygnału w stosunku do szumu linii podstawowej była 6 razy większa. Eksperymentalnie wyznaczone LOD i LOQ dla HTL w moczu wyniosły odpowiednio 0,025 $\mu\text{mol/L}$ i 0,05 $\mu\text{mol/L}$. Porównując otrzymaną LOQ, z uzyskanymi w innych opisanych w literaturze metodach, jest ona podobna jak w procedurze wykorzystującej GC-MS [93] do oznaczania HTL w moczu, czyli 0,05 $\mu\text{mol/L}$. Otrzymana LOQ była natomiast niższa od tej w procedurze oznaczania HTL w moczu za pomocą MEKC-FASI [102], gdzie wynosiła 0,09 $\mu\text{mol/L}$. Wartość LOQ dla prezentowanej metody była z kolei wyższa niż dla procedur HPLC-FLD [98] oraz GC-MS [92], za pomocą których HTL oznaczano w moczu (odpowiednio 0,02 $\mu\text{mol/L}$ i 0,01 $\mu\text{mol/L}$). Jedną z przyczyn dla których LOQ prezentowanej metody jest wyższe niż dla procedur GC [92] i HPLC [98], jest zastosowanie w tych procedurach znacznie czulszych detektorów, tj. MS i FLD. Kolejną przyczyną jest również możliwość wprowadzania do układu pomiarowego CE znacznie mniejszych objętości próbki (rzędu nanolitów), niż do układów chromatograficznych (od kilku do kilkudziesięciu mikrolitrów).

W kolejnym kroku wykonano kalibrację metody SDME-CZE. W tym celu sporządzono pięciopunktową krzywą kalibracyjną, którą wykonano przygotowując w trzech powtórzeniach próbki moczu doszczepione HTL w następujących stężeniach: 0,05; 0,075; 0,1; 0,15; 0,2 $\mu\text{mol/L}$. Otrzymane wyniki zestawiono w postaci **tabeli 3** oraz wykresu na **rysunku 54**. W obliczeniach wykorzystano pola powierzchni sygnałów HTL.

Tabela 3. Wyniki kalibracji metody SDME-CZE do oznaczania HTL w moczu człowieka.

Dodano [$\mu\text{mol/L}$]	Znaleziono \pm SD [$\mu\text{mol/L}$]	RSD [%]	Odzysk [%]
0,050	0,048 \pm 0,005	10,4	96,4
0,075	0,076 \pm 0,011	14,5	101,9
0,100	0,101 \pm 0,010	9,9	100,5
0,150	0,151 \pm 0,021	13,9	100,6
0,200	0,199 \pm 0,018	9,0	99,5

n=3

**Rys. 54. Krzywa kalibracyjna dla HTL w moczu.**

Otrzymana krzywa kalibracyjna wykazała charakter liniowy w badanym zakresie stężeń. Celem wyznaczenia równania prostej kalibracyjnej wykorzystano funkcję Reglinp w arkuszu kalkulacyjnym MS Excel. Otrzymano następujące równanie: $y = (10,7513 \pm 0,1363) x + (0,4887 \pm 0,0173)$, dla którego współczynnik korelacji (pierwiastek kwadratowy współczynnika R^2) wyniósł 0,9997. Otrzymanie liniowej zależności pola powierzchni sygnału analitycznego od wzrastających stężeń HTL, świadczy o możliwości zastosowania opracowanej metody do ilościowego oznaczania badanego związku. Precyzja, wyrażona jako względne odchylenie standardowe, dla punktów na krzywej kalibracyjnej mieściła się w zakresie 9,0 - 14,5%, podczas gdy dokładność, wyrażona odzyskiem, była w zakresie od 96,4 do 101,9%.

W dalszej kolejności przeprowadzono następny etap walidacji opracowanej metody, mający na celu wyznaczenie wewnątrz- oraz międzydniowej precyzji i dokładności. W związku z tym wybrano trzy stężenia HTL reprezentujące cały zakres sporządzonej wcześniej krzywej

kalibracyjnej, gdzie pierwsze stężenie było zbliżone do LOQ, drugie reprezentowało środek zakresu krzywej, zaś trzecie było zbliżone do jej końca. W tym celu przygotowano w trzech powtórzeniach próbki moczu, wzbogacając je roztworem standardu HTL w taki sposób, aby końcowe stężenia analitu w moczu wynosiły odpowiednio 0,06; 0,12; 0,19 $\mu\text{mol/L}$, po czym przeprowadzono ekstrakcję SDME, a następnie analizę za pomocą techniki CZE. Dane uzyskane podczas eksperymentu przedstawiono w **tabeli 4**.

Tabela 4. Dane walidacyjne dla metody SDME-CZE.

Dodano [$\mu\text{mol/L}$]	Wewnątrzdniowa			Międzydniowa		
	Znaleziono \pm SD [$\mu\text{mol/L}$]	Precyzja [%]	Dokładność [%]	Znaleziono \pm SD [$\mu\text{mol/L}$]	Precyzja [%]	Dokładność [%]
0,060	0,066 \pm 0,009	13,6	110,0	0,069 \pm 0,010	14,5	115,0
0,120	0,115 \pm 0,010	8,7	95,8	0,111 \pm 0,010	9,0	92,5
0,190	0,199 \pm 0,008	4,0	104,7	0,202 \pm 0,009	4,5	106,3

n=3

Zgodnie z powyższą tabelką precyzja wewnątrzdniowa prezentowanej metody była mniejsza niż 14%, a dokładność mieściła się w zakresie od 95,8% do 110,0%. Dla precyzji międzydniowej wartości były mniejsze niż 14,5%, a dokładność mieściła się w przedziale od 92,5 do 115,0%. Wartości tych parametrów są zgodne z kryteriami stawianymi metodom opracowanym do analizy próbek biologicznych [228].

Prezentowana analityczna procedura oznaczania HTL za pomocą SDME-CZE, charakteryzuje się prostym przygotowaniem próbki, zautomatyzowanym procesem ekstrakcji oraz znacznie zredukowanym zużyciem odczynników chemicznych, w tym toksycznych rozpuszczalników organicznych. W **tabeli 5** porównano ją z innymi opisanymi w literaturze metodami oznaczania HTL w moczu oraz wykorzystującymi technikę CE.

Tabela 5. Porównanie opracowanej metody SDME-CZE z innymi opisanymi w literaturze metodami oznaczania HTL.

Technika analityczna	Metoda przygotowania próbki do analizy	Całkowity czas analizy [min]	LOD [$\mu\text{mol/L}$]	LOQ [$\mu\text{mol/L}$]	Zakres liniowości [$\mu\text{mol/L}$]	Matryca próbki	Rodzaj detekcji
CZE	SDME (on-line)	21	0,025	0,05	0,05 - 0,20	mocz	UV-Vis
FIA [90]	20-krotne rozcieńczenie próbki + separacja Hcy od HTL za pomocą modyfikowanych nanocząstek złota	40	0,6	2	2 - 30	mocz	FLD
GC [92]	LLE + derywatywacja	26	0,005	0,01	0,01 - 0,2	mocz	MS
GC [93]	LLE + derywatywacja	25	Nie podano	0,05	0,05 - 1	mocz	MS
HPLC [55]	SPE + derywatywacja	Podano tylko czas trwania analizy chromatograficznej – 8 min	Nie podano	Nie podano	0,0001 - 0,5	mocz	FLD
HPLC [98]	SPE + derywatywacja	Podano tylko czas trwania analizy chromatograficznej – 2,2 min	Nie podano	0,02	0,02 - 3	mocz	FLD
HP LC [100]	LLE + derywatywacja	53	Nie podano	Nie podano	0,2 - 2	mocz myszy	FLD
CZE [101]	-	7	1	Nie podano	20 - 2000	mieszana reakcyjna	UV-Vis
MEKC-FASI-CE [102]	LLE	42	Nie podano	0,09	0,1 - 1	mocz	UV-Vis

3.5. Oznaczanie tiolaktonu homocysteiny w moczu człowieka

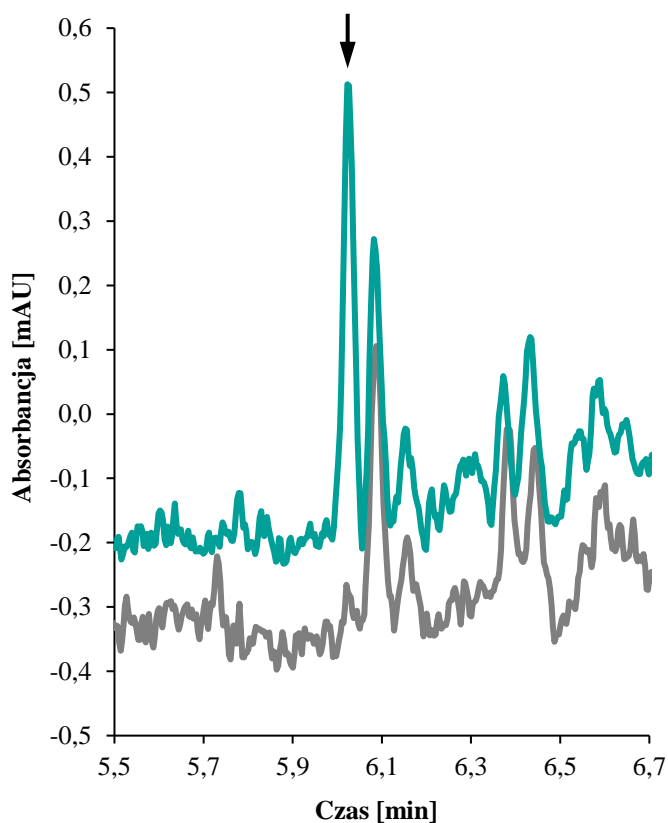
Ostatnim etapem badań było oznaczanie tiolaktonu homocysteiny w moczu człowieka za pomocą opracowanej i zwalidowanej metody kapilarnej elektroforezy strefowej z wykorzystaniem trójfazowej mikroekstrakcji do pojedynczej kropli realizowanej w układzie pomiarowym elektroforezy kapilarnej. Próbkę moczu zostały pobrane od sześciu pozornie zdrowych wolontariuszy w wieku od 26 do 55 lat oraz od jednego pacjenta z hiperhomocysteinemią. Przed analizą próbki moczu były przechowywane w zamrażarce niskotemperaturowej w temp. $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po rozmrożeniu i doprowadzeniu do temperatury pokojowej próbki moczu zostały odwirowane przy $13700 \times g$ przez 5 minut, a następnie przygotowane zgodnie z procedurą opisaną w **podrozdziale 3.2 – Przygotowanie próbki do procedury ekstrakcji**. Analizy moczu na zawartość HTL przeprowadzono w trzech powtórzeniach, przy czym próbki moczu zdrowych ochotników zostały wzbogacone znaną ilością standardu HTL, aby jego końcowe stężenie wynosiło $0,05\text{ }\mu\text{mol/L}$ moczu ($\sim\text{LOQ}$). Wszystkie dane uzyskane po elektroforetycznej analizie próbek moczu zebrano w **tabeli 6**.

Tabela 6. Stężenie HTL w moczu człowieka.

Numer próbki	Dodano [$\mu\text{mol/L}$ moczu]	Znaleziono \pm SD [$\mu\text{mol/L}$ moczu]	RSD [%]
1	–	$0,028 \pm 0,004$	14,3
2	0,05	$0,059 \pm 0,005$	8,5
3	0,05	$0,070 \pm 0,008$	11,4
4	0,05	$0,055 \pm 0,004$	7,3
5	0,05	$0,056 \pm 0,003$	5,4
6	0,05	$0,042 \pm 0,005$	11,9
7	0,05	$0,052 \pm 0,006$	11,5

n=3

Zgodnie z powyższymi danymi średnia zawartość HTL w wzbogaconych próbkach moczu zdrowych ochotników wynosi $0,056\text{ }\mu\text{mol/L}$, zaś wartość RSD wyrażonego w procentach mieści się w granicach od 5,4% do 14,3%. Stężenie HTL wykryte w moczu pacjenta jest równe $0,028\text{ mol/L}$ i jest na poziomie LOD opracowanej metody. Na **rysunku 55** przedstawiono reprezentatywne elektroforegramy próbki moczu pozornie zdrowego wolontariusza oraz tej samej próbki moczu doszczepionej znaną ilością standardu HTL.



Rys. 55. Reprezentatywne elektroforegramy uzyskane podczas analizy próbki moczu (szara linia) oraz próbki moczu wzbogaconej standardem HTL, tak aby jego końcowa zawartość w płynie ustrojowym wynosiła 0,05 $\mu\text{mol/L}$ moczu (zielona linia).

Zoptymalizowane warunki analizy moczu na zawartość tiolaktonu homocysteiny:

W toku opracowywania prezentowanej w **rozdziale 3** analitycznej procedury oznaczania HTL, zoptymalizowano zarówno parametry rozdzielania CZE oraz warunki SDME w trybie on-line. Dla separacji techniką CZE dobrano następujące parametry:

- kapilara: długość całkowita 64 cm (efektywna długość: 55,5 cm);
- BGE: roztwór $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ o $\text{pH} = 4,75$ i stężeniu 0,1 mol/L;
- napięcie: 24 kV;
- temperatura kapilary: 21 °C;

Z kolei dla procedury ekstrakcji SDME realizowanej w układzie pomiarowym CE dobrano poniższe warunki:

- przygotowanie próbki: wymieszanie moczu z buforem fosforanowym o stężeniu 0,2 mol/L i $\text{pH} = 8,2$ w stosunku 1:1, następnie dodanie do mieszaniny 20 μL metanolu;
- rozpuszczalnik organiczny oraz jego objętość: chloroform o objętości 40 μL ;

- rodzaj fazy akceptorowej oraz jej stężenie: kwas ortofosforowy(V) o stężeniu 0,0045 mol/L;
- czas ekstrakcji z próbki do fazy organicznej (I etap): 5 min;
- czas ekstrakcji z fazy organicznej do kropli fazy akceptorowej (II etap): 10 min.

4. Opracowanie procedury mikroekstrakcji do pojedynczej kropli realizowanej poza układem elektroforezy kapilarnej

4.1. Warunki elektroforetycznego rozdzielania

Podczas przeprowadzania wstępnych analiz elektroforetycznych roztworu kropli fazy akceptorowej po przeprowadzeniu procedury SDME realizowanej poza układem pomiarowym CE (tryb off-line) okazało się, że warunki elektroforetyczne opisane w **rozdziale 3** (tryb on-line) nie wymagały modyfikacji, gdyż sygnał analityczny HTL ulegał całkowitej separacji od innych składników ekstrahowanych do kropli. W związku z powyższym podczas opracowania procedury SDME w trybie off-line stosowano następujące parametry elektroforetyczne:

- długość kapilary: 64 cm (efektywna długość 55,5 cm),
- średnica kapilary: 75 μm ,
- stężenie BGE: 0,1 mol/L roztwór elektrolitu podstawowego (roztwór $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$),
- pH BGE: 4,75,
- przykładane napięcie: 21 kV,
- temperatura kapilary: 23 $^\circ\text{C}$,
- hydrodynamiczne wprowadzenie próbki do kapilary: 50 mbar przez 20 s (co odpowiada objętości wprowadzonej próbki wynoszącej ~ 121 nL).

4.2. Dobór warunków mikroekstrakcji do pojedynczej kropli.

Dobór warunków mikroekstrakcji do pojedynczej kropli realizowanej w trybie off-line rozpoczęto od wyboru techniki wykonania ekstrakcji. Klasyczną SDME wykonuje się w układzie złożonym z dwóch faz, gdzie jedną fazę stanowi zazwyczaj wodny roztwór próbki, tzw. faza donorowa, a drugą, czyli fazę akceptorową, nie mieszający się z wodą rozpuszczalnik organiczny w postaci kropli. Kropla fazy akceptorowej zanurzona jest bezpośrednio w próbce. Dwufazową ekstrakcję SDME wykonano w ten sposób, że fazę donorową stanowił roztwór standardu HTL o stężeniu 10 nmol/mL w buforze fosforanowym o pH = 8,0, zaś fazą akceptorową był chloroform. Do wytworzenia kropli fazy akceptorowej zastosowano mikrostrzykawkę o pojemności 25 μL . Po kilkukrotnym przemyciu i napełnieniu strzykawki chloroformem, zanurzono jej koniec w roztworze próbki i wytworzono kroplę o objętości 1 μL . Układ pozostawiono na czas ekstrakcji, podczas której próbka była mieszana za pomocą mieszadła

magnetycznego. Po 10 minutach prowadzenia ekstrakcji zatrzymano mieszanie, kroplę chloroformową pobrano z powrotem do igły strzykawki, a następnie przeniesiono do fiolki stożkowej i odparowano do sucha w temperaturze w 50 °C. Pozostałość rozpuszczono w 10 µL 0,1 mol/L H₃PO₄ i poddano analizie elektroforetycznej. Na uzyskanym elektroforegramie nie zaobserwowano jednak sygnału pochodzącego od HTL.

W związku z powyższym postanowiono tym razem wykonać SDME w układzie trójfazowym, gdzie fazę donorową stanowił roztwór standardu HTL o stężeniu 10 nmol/mL w buforze fosforanowym o pH = 8,0, fazą organiczną była cienka warstwa chloroformu nałożona na powierzchnię fazy donorowej, natomiast fazę akceptorową stanowił 0,1 mol/L roztwór kwasu fosforowego(V). Podsumowując, sposób realizacji trójfazowej SDME był bardzo podobny jak w przypadku SDME realizowanej w układzie pomiarowym CE, poza tym że kroplę (1 µL) wytwarzano za pomocą mikrostrzykawki. Ekstrakcję do kropli prowadzono przez 10 minut jednocześnie mieszając roztwór próbki za pomocą mieszadła magnetycznego. Po zakończeniu ekstrakcji zatrzymano mieszanie, a wzbogacony roztwór kropli pobrano do igły strzykawki i przeniesiono do fiolki stożkowej, odparowano do sucha w temperaturze 50 °C, a pozostałość rozpuszczono w 10 µL 0,001 mol/L H₃PO₄. Tak przygotowaną próbkę poddano analizie z wykorzystaniem CZE. Na uzyskanym elektroforegramie otrzymano wysoki sygnał pochodzący od analitu.

W związku z powyższym postanowiono opracować metodę mikroekstrakcji HTL z moczu w układzie trójfazowym, realizowanej z wykorzystaniem mikrostrzykawki, czyli SDME w trybie off-line. W trakcie rozwijania procedury sprawdzono następujące parametry:

- pH próbki,
- stężenie kwasu fosforowego(V) stosowanego jako fazę akceptorową,
- rodzaj fazy organicznej i jej objętość,
- czas I etapu ekstrakcji – czyli czas ekstrakcji z roztworu próbki do fazy organicznej nałożonej na powierzchnię próbki,
- czas II etapu ekstrakcji – czyli czas ekstrakcji z fazy organicznej do kropli.

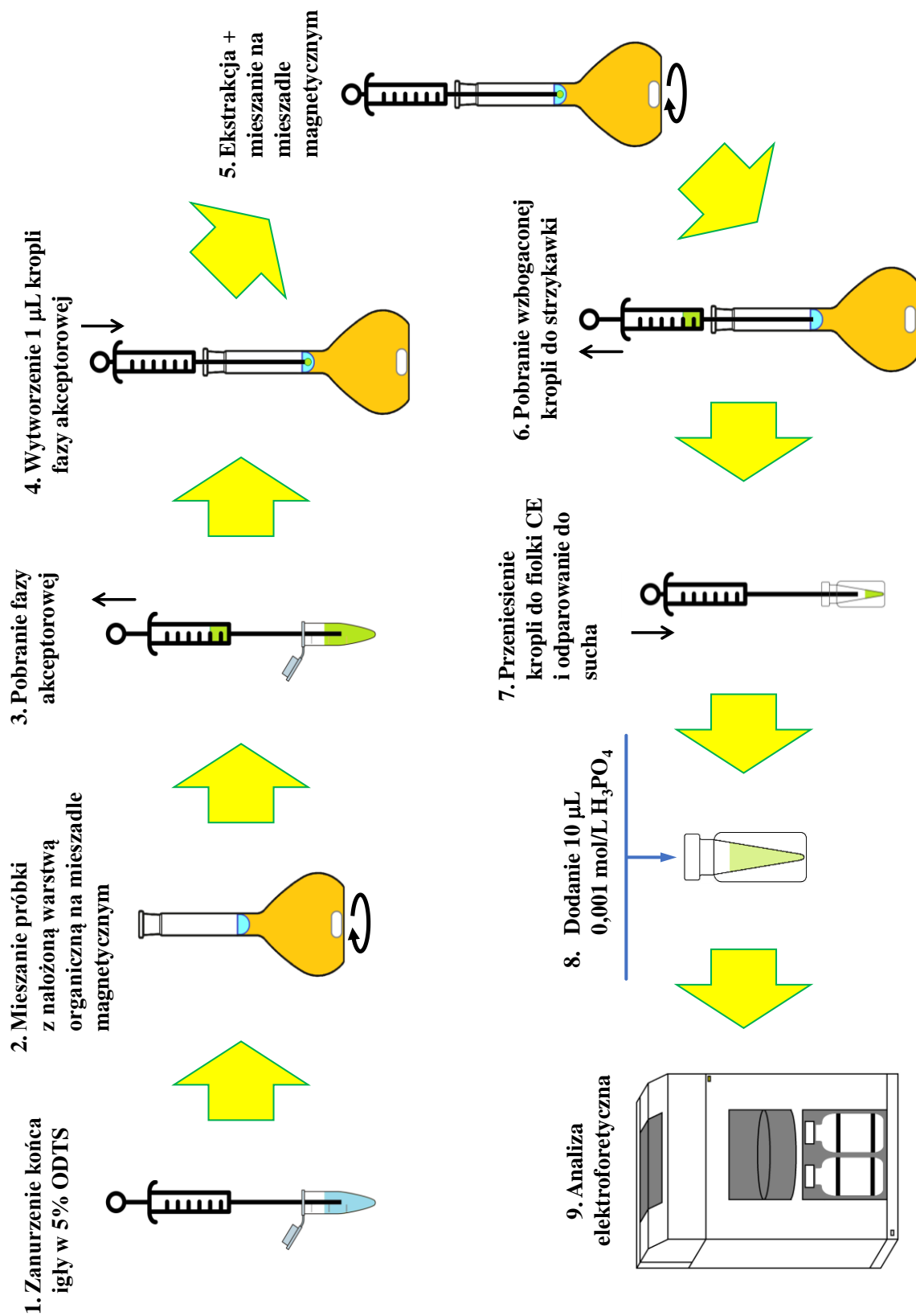
Procedura SDME składała się z następujących etapów:

1. Przygotowanie próbki moczu poprzez zmieszanie jej z buforem o odpowiednim pH i stężeniu,
2. Nałożenie warstwy fazy organicznej na powierzchnię próbki,
3. Co najmniej pięciokrotne przemycie mikrostrzykawki metanolem,
4. Zanurzenie końca igły mikrostrzykawki w 5% roztworze ODTs na około 3 sekundy,

5. Po około 2 minutach, co najmniej pięciokrotne przemycie mikrostrzykawki roztworem fazy akceptorowej, a następnie pobranie ok. 1 μL tego roztworu,
6. Zanurzenie końca igły mikrostrzykawki w fazie organicznej,
7. Wygenerowanie kropli fazy akceptorowej o objętości 1 μL ,
8. Pozostawienie układu na czas ekstrakcji HTL do kropli,
9. Po zakończeniu ekstrakcji pobranie wzbogaconego roztworu kropli fazy akceptorowej do mikrostrzykawki,

Następnie przeniesiono roztwór kropli do fiolki stożkowej o pojemności 0,3 mL i jej zawartość odparowano do sucha. Pozostałość rozpuszczono w 10 μL 0,001 mol/L roztworu H_3PO_4 , a fiolkę z próbką wstawiono do aparatu CE w celu przeprowadzenia analizy elektroforetycznej zgodnie z mechanizmem CZE.

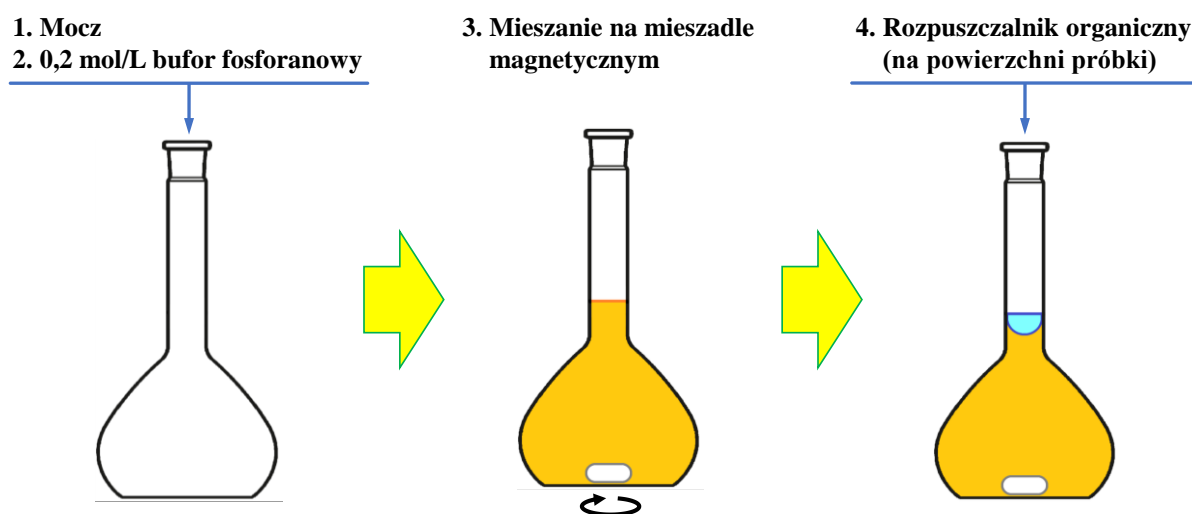
Powyższe punkty przedstawiono schematycznie na **rysunku 56** poniżej. W punkcie 1 procedury SDME (**rysunku 56**), zostało podane, że koniec igły mikrostrzykawki był zanurzony w 5% roztworze ODTS. Jest to roztwór o silnych właściwościach hydrofobowych. Zanurzenie igły w 5% ODTS na kilka sekund i pozostawienie do wyschnięcia powodowało wytworzenie warstwy hydrofobowej, która usprawniała wytwarzanie kropli fazy akceptorowej oraz zwiększała jej stabilność podczas ekstrakcji.



Rys. 56. Schemat procedury SDME realizowanej za pomocą mikrostrzykawki.

Przygotowanie próbki do procedury ekstrakcji.

Przygotowanie próbki do procedury SDME w trybie off-line jest podobne do procedury SDME realizowanej w układzie pomiarowym CE, jednakże różni się pewnymi elementami. Jednym z nich jest naczynie, w którym wykonywana była procedura SDME. W tym celu była wykorzystywana kolba miarowa o pojemności 5 mL. Kolejnym elementem różniącym SDME off-line i on-line było rozcieńczenie próbki moczu za pomocą buforu fosforanowego. Ten ostatni element był bardzo ważny, ponieważ próbka moczu powinna być w taki sposób rozcieńczona, aby możliwe było nałożenie warstwy organicznej na powierzchnię próbki bez efektu opadania tej warstwy na dno naczynia, za pomocą którego prowadzono ekstrakcję, oraz aby nadmiernie nie rozcieńczać próbki, by móc uzyskać końcowe niskie stężenia LOD oraz LOQ, tak jak to zostało opisane w **podrozdziale 3.2 – Przygotowanie próbki do procedury ekstrakcji**. Dlatego sprawdzono wpływ rozcieńczenia próbki moczu za pomocą buforu fosforanowego, na wystąpienie efektu opadania warstwy organicznej na dno naczynia. W tym celu zbadano następujące stosunki objętościowe mocz:bufor (v/v): 1:1 oraz 1:2. Ogólny schemat przygotowania próbki do ekstrakcji przedstawia **rysunek 57**.



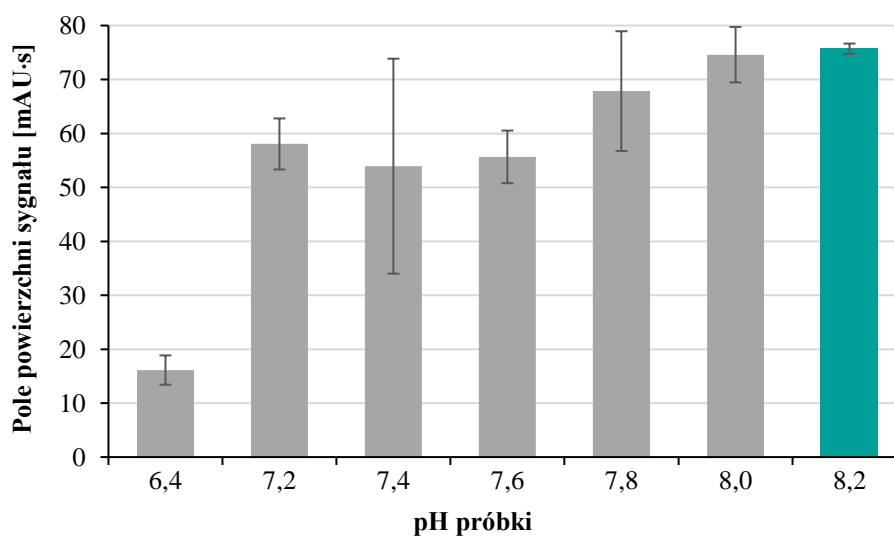
Rys. 57. Schemat przygotowania próbki moczu do procedury SDME.

Na podstawie badań dotyczących przygotowania próbki moczu do SDME realizowanej w układzie pomiarowym CE (**podrozdział 3.2 – Dobór pH próbki** oraz **3.2 – Przygotowanie próbki do procedury ekstrakcji**), opracowano poniższą procedurę. Do badań użyto bufor fosforanowy o stężeniu 0,2 mol/L i pH = 8,0, zaś próbkę moczu przygotowano w następujący sposób: kolby miarowej o pojemności 5 mL dodano mocz, a następnie uzupełniono do kreski za pomocą buforu przeznaczonego do przygotowania próbki, przy czym mocz i bufor dodano do kolbki

w takich objętościach, aby ich końcowy stosunek wynosił 1:1 lub 1:2 (v/v). W następnej kolejności przez kilka sekund zawartość kolbki wymieszano ręcznie w taki sposób, aby nie doszło do spienienia próbki, po czym włożono mieszadło magnetyczne do kolby i nałożono fazę organiczną na powierzchnię próbki. Na podstawie obserwacji próbek przygotowanych w stosunku mocz:bufor równym 1:1 oraz 1:2 stwierdzono, że dla stosunku mocz:bufor wynoszącym 1:1 warstwa organiczna opadała na dno, z kolei dla stosunku objętościowego 1:2 warstwa organiczna utrzymywała się na powierzchni próbki. W związku z powyższym do dalszych badań mocz rozcieńczano buforem fosforanowym w takim sposób, aby ich końcowy stosunek objętościowy wynosił zawsze 1:2.

Dobór pH próbki

Kolejnym etapem optymalizacji warunków ekstrakcji było zbadanie wpływu pH próbki na wydajność SDME, poprzez wykonanie analizy elektroforetycznej wyekstrahowanych składników próbki do kropli. Zgodnie z rozważaniami w **podrozdziale 3.2 – Dobór pH próbki**, pH próbki powinno być takie, aby cząsteczka ekstrahowanego analitu nie posiadała ładunku, dzięki czemu wydajność ekstrakcji do fazy organicznej jest wysoka. Na podstawie znajomości pK_a cząsteczki HTL, którego wartość wynosi 6,67 [1], pH próbki powinno być wyższe od wartości pK_a dla HTL. Wobec tego przygotowano serię roztworów buforu fosforanowego o stężeniu 0,2 mol/L w zakresie pH od 6,4 do 8,2. Następnie próbkę moczu przygotowano zgodnie z końcowym opisem w **podrozdziale 3.2 – Przygotowanie próbki do procedury ekstrakcji**, wzbogacając ją dodatkowo znaną ilością HTL. Na podstawie uzyskanych wyników sporządzono wykres zależności pola powierzchni sygnału badanego analitu od pH 0,2 mol/L buforu fosforanowego stosowanego do przygotowania próbki (**rysunek 58**).



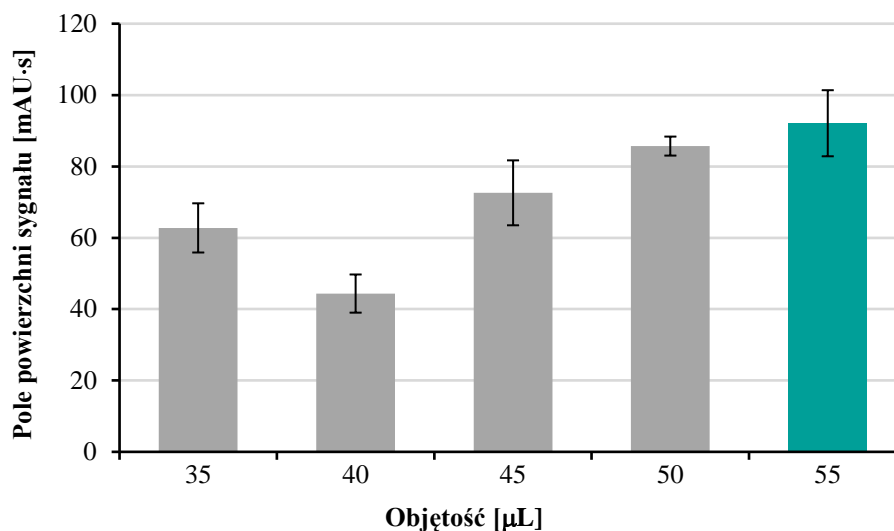
Rys. 58. Wpływ pH 0,2 mol/L buforu fosforanowego na wydajność ekstrakcji.

Zgodnie z powyższym rysunkiem można zaobserwować, że im wyższe pH buforu tym większy sygnał HTL. pH buforu wyższe niż 6,67 powoduje znaczny wzrost wydajności ekstrakcji, co jest zgodne z wcześniejszymi rozważaniami. Największe pole powierzchni pików HTL uzyskano stosując bufor fosforanowy o pH 8,0 i 8,2. Jednak zastosowanie buforu fosforanowego o stężeniu 0,2 mol/L i pH = 8,2 (taki jak do przygotowania próbki do procedury SDME w trybie on-line) skutkowało otrzymaniem podobnych sygnałów jak w przypadku buforu o pH = 8,0. Uzyskano jednak bardziej powtarzalne wyniki analiz, czyli lepszą precyzję, dlatego w dalszych eksperymentach, jako bufor do przygotowania próbki do procedury SDME w trybie off-line, był stosowany 0,2 mol/L bufor fosforanowy o pH 8,2.

Dobór rozpuszczalnika organicznego oraz jego objętości

Następnym etapem opracowania procedury ekstrakcji był wybór odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego nakładanego na powierzchnię próbki. Na podstawie wyników badań opisanych w **podrozdziale 3.2 – Dobór rozpuszczalnika organicznego**, największe pole powierzchni sygnału HTL uzyskano dla dichlorometanu, chloroformu oraz dla chloroformu nakładanego na powierzchnię próbki zawierającej dodatek metanolu. W tym badaniu wypróbowano wszystkie te rozpuszczalniki jako fazy organiczne i wyciągnięto poniższe wnioski. Dzięki zastosowaniu dichlorometanu jako fazy organicznej, otrzymano najwyższy sygnał HTL, jednakże przez to, że dichlorometan jest bardzo lotny, warstwa organiczna unosząca się na powierzchni próbki szybko zwężała się i istniało ryzyko, że w pewnym momencie ekstrakcji warstwa ta będzie na tyle wąska, że kropla nie będzie się w niej mieścić, więc ekstrakcja zostanie zakłócona, lub spowoduje pęknięcie kropli i zakończy ekstrakcję niepowodzeniem. Z kolei użycie chloroformu jako warstwy organicznej i zastosowanie metanolu jako dodatku do próbki, skutkowało otrzymaniem sygnałów niższych niż dla dichlorometanu. Nie zaobserwowano również lepszej powtarzalności sygnałów. W związku z powyższym jako fazę organiczną zastosowano chloroform. Jego lotność jest mniejsza niż dichlorometanu, a otrzymane sygnały HTL były wyższe niż dla chloroformu (z dodatkiem metanolu do próbki), natomiast powtarzalność analiz była porównywalna.

W kolejnym kroku sprawdzono wpływ objętości warstwy chloroformowej na wydajność ekstrakcji. W tym celu przygotowano serię próbek moczu, na których powierzchnię nakładano rosnące objętości chloroformu w zakresie od 35 do 55 μL i przeprowadzono kolejne etapy ekstrakcji zgodnie z procedurą opisaną w **podrozdziale 4.2 – Przygotowanie próbki do procedury ekstrakcji**. Następnie przeprowadzono analizę elektroforetyczną wzbogaconego roztworu kropli. Z uzyskanych wyników analiz sporządzono zależność pola powierzchni sygnału HTL od objętości warstwy chloroformowej, co przedstawiono na **rysunku 59**.



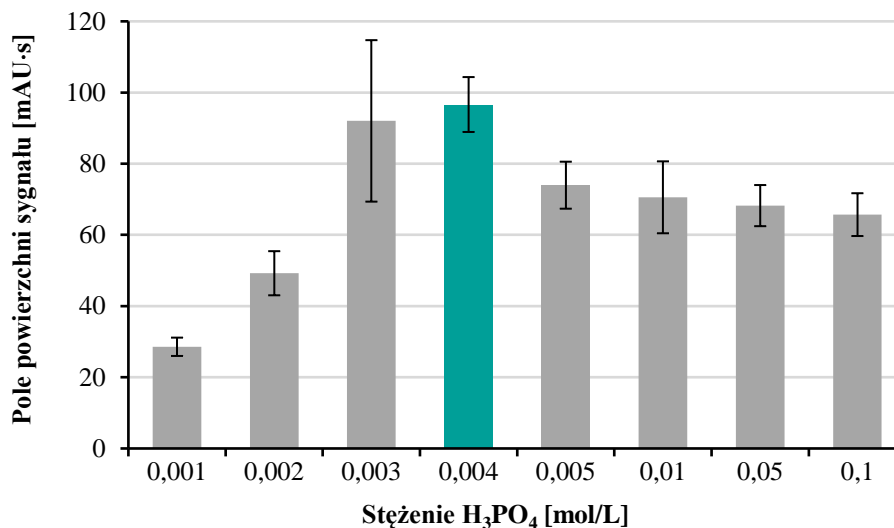
Rys. 59. Wpływ objętości fazy organicznej na wydajność ekstrakcji.

Na powyższym wykresie można zaobserwować, że wraz ze wzrostem objętości chloroformu nakładanego na powierzchnię próbki moczu rośnie pole powierzchni sygnału HTL. Wartość minimalną pole powierzchni osiąga, gdy nakładana objętość chloroformu wynosi 40 μL, zaś maksymalną gdy objętość warstwy chloroformowej jest równa 55 μL. Gdy stosowane były większe objętości obserwowano opadanie fazy organicznej na dno, z kolei nie możliwym było zbadanie objętości mniejszych niż 35 μL, ponieważ warstwa organiczna była zbyt cienka i kropla fazy akceptorowej się w niej nie mieściła. Ponadto, im mniejsza objętość chloroformu tym czas jego całkowitego odparowania z powierzchni próbki jest krótszy. Dlatego do dalszych badań została wybrana objętość chloroformu wynosząca 55 μL.

Dobór rodzaju fazy akceptorowej oraz jej stężenia

Wyekstrahowane do fazy akceptorowej cząsteczki analitu uzyskują ładunek. Wynika to z odpowiednio dobranego pH fazy akceptorowej, dzięki czemu cząsteczki są w niej uwięzione i nie ulegają reekstracji do fazy organicznej. Funkcję fazy akceptorowej oraz jej wpływ na wydajność ekstrakcji opisano dokładnie w **podrozdziale 3.2. – Dobór rodzaju fazy akceptorowej oraz jej stężenia**. Na podstawie uzyskanych wyników eksperymentów przedstawionych w wyżej wymienionym podrozdziale podjęto decyzję o wybraniu roztworu kwasu fosforowego(V) jako fazy akceptorowej. Jednakże ze względu na to, że sposób wykonania SDME w trybie off-line jest inny, postanowiono ponownie sprawdzić wpływ stężenia H_3PO_4 na wydajność ekstrakcji. W tym celu przygotowano szereg roztworów tego kwasu w zakresie od 0,001 do 0,1 mol/L i za pomocą mikrostrzykawki formowano kroplę fazy akceptorowej, którą stanowiły roztwory kwasu fosforowego(V) o poszczególnych stężeniach z badanego zakresu. Na

podstawie uzyskanych wyników analiz elektroforetycznych sporządzono wykres zależności pola powierzchni sygnału HTL od stężenia kwasu użytego jako faza akceptorowa, co przedstawiono na **rysunku 60**.

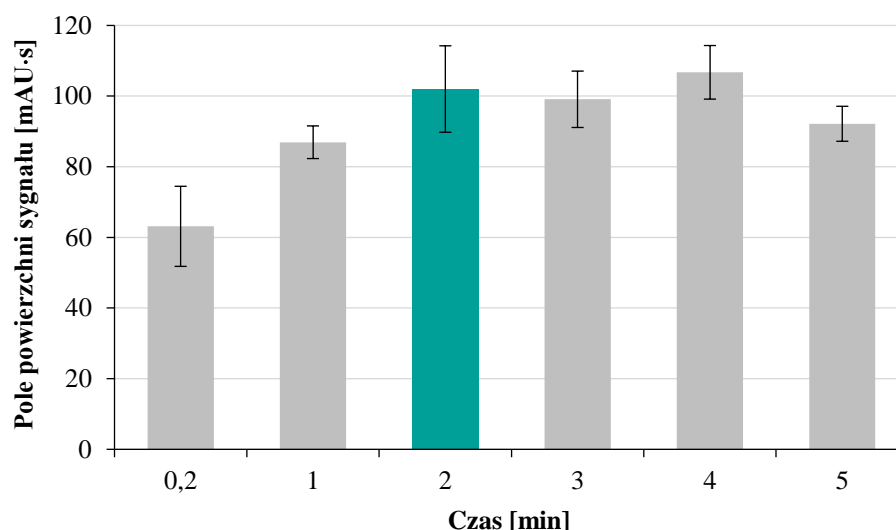


Rys. 60. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od stężenia kwasu fosforowego(V).

Powyższy rysunek jasno pokazuje, że wraz ze wzrostem stężenia kwasu rośnie wydajność ekstrakcji do wartości maksymalnej dla stężenia H₃PO₄ równego 0,004 mol/L. Dalszy wzrost stężenia tego kwasu powoduje powolny spadek wydajności ekstrakcji. W związku z powyższym roztwór kwasu fosforowego (V) o stężeniu 0,004 mol/L został wybrany jako faza akceptorowa podczas ekstrakcji SDME w trybie off-line.

Dobór czasu ekstrakcji z próbki do fazy organicznej

Ekstrakcja analitu z fazy donorowej do fazy organicznej (**rysunek 50**), czyli z próbki do warstwy rozpuszczalnika organicznego, jest pierwszym z dwóch etapów ekstrakcji w trójfazowej SDME. Etap ten jest kluczowy ze względu na fakt, że dzięki ustaleniu się równowagi pomiędzy tymi fazami wydajność ekstrakcji do kropli wzrasta, a także powtarzalność procesu ekstrakcji jest lepsza. W związku z powyższym zbadano wpływ czasu I etapu ekstrakcji na jej wydajność, przy zachowaniu stałego czasu II etapu ekstrakcji. Czas ekstrakcji zbadano w zakresie od 0,2 do 5 minut, przy czym dla czasu 0,2 min etap zanurzenia końca igły mikrostrzykawki oraz wytworzenia kropli wykonano natychmiast po nałożeniu warstwy chloroformowej. Na podstawie uzyskanych wyników sporządzono wykres zależności pola powierzchni sygnału HTL od czasu I etapu ekstrakcji (**rysunek 61**).

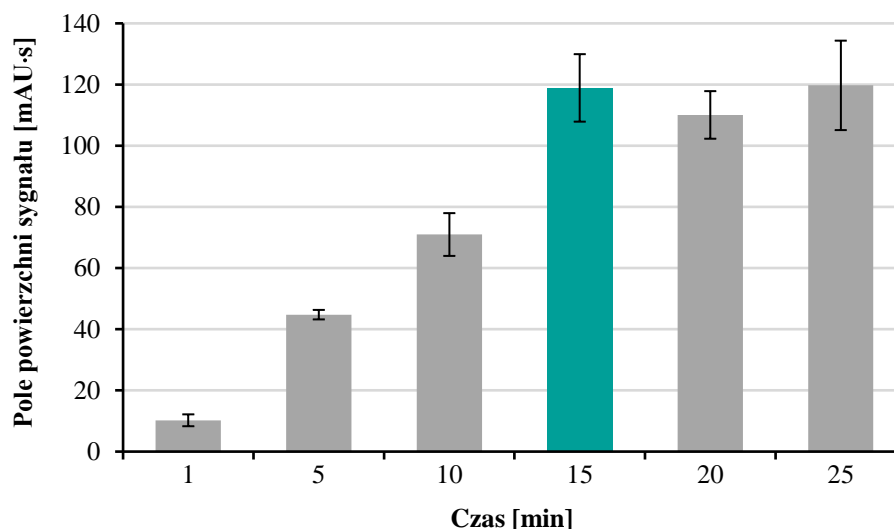


Rys. 61. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od czasu I etapu ekstrakcji.

Powyższa zależność wskazuje, że wraz z wydłużaniem czasu I etapu ekstrakcji do 2 minut rośnie wartość pola powierzchni sygnału HTL, po czym dla czasów dłuższych ustala się równowaga. Można również zauważyć, że powyżej 4 minut pole powierzchni zmniejsza się nieznacznie, co jest spowodowane odparowaniem warstwy chloroformowej i zmniejszeniem jej objętości, co jak opisano w **podrozdziale 4.2. – Dobór rozpuszczalnika organicznego oraz jego objętości** ma wpływ na wydajność ekstrakcji do kropli. Zatem czas potrzebny do ustalenia się równowagi pomiędzy fazą donorową próbki a warstwą chloroformową, przy zachowaniu odpowiedniej wydajności ekstrakcji, powinien wynosić 2 minuty.

Dobór czasu ekstrakcji z fazy organicznej do kropli

Kolejnym etapem opracowania metody oznaczania HTL za pomocą CZE z wykorzystaniem SDME w trybie off-line, było zbadanie wpływu czasu II etapu ekstrakcji na jej wydajność. Podczas II etapu ekstrakcji cząsteczki HTL są ekstrahowane z fazy organicznej do kropli fazy akceptorowej, czyli z warstwy chloroformowej nałożonej na powierzchnię próbki moczu do roztworu kwasu fosforowego (V) o stężeniu 0,004 mol/L. W związku z tym zbadano czas II etapu ekstrakcji w zakresie od 1 do 25 minut. Z uzyskanych wyników analiz elektroforetycznych sporządzono wykres zależności pola powierzchni sygnału HTL od czasu II etapu ekstrakcji, który przedstawiono na **rysunku 62**. Na poniższym rysunku można zauważyć, że wraz z wydłużeniem czasu II etapu ekstrakcji rośnie jej wydajność aż do wartości maksymalnej osiągananej przy 15 minutach. Dalsze wydłużanie czasu tego etapu nie powoduje przyrostu pola powierzchni sygnału, co świadczy o ustaleniu się stanu równowagi II etapu ekstrakcji. Dlatego czas II etapu ekstrakcji równy 15 minut był stosowany w następnych etapach badań.



Rys. 62. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od czasu II etapu ekstrakcji.

4.3. Walidacja opracowanej metody

Następnym krokiem opracowania metody było przeprowadzenie walidacji zgodnie z kryteriami dla próbek biologicznych [228]. Podczas eksperymentów stosowano dobrane wcześniej parametry elektroforetyczne oraz warunki ekstrakcji SDME. Wyznaczono takie parametry walidacyjne jak: wartości granic LOD oraz LOQ, zakres liniowości, wewnątrz- oraz międzydniową precyzję i dokładność. Porównano również przedstawioną metodę z innymi, opisanymi w literaturze naukowej procedurami oznaczania HTL [55, 90, 92, 93, 98, 100-102].

Wartości LOD i LOQ zostały wyznaczone eksperymentalnie wykorzystując metodę pomiaru stosunku sygnału do szumu S/N (gdzie S oznacza wartość wysokości sygnału, a N wysokość szumu linii podstawowej), zgodnie z opisem w **podrozdziale 3.4** [238].

Wartości LOD i LOQ wynosiły odpowiednio 0,5 $\mu\text{mol/L}$ i 1 $\mu\text{mol/L}$, czyli były zbyt wysokie niż spodziewane stężenia HTL w moczu zdrowego człowieka. W związku z tym postanowiono zmodyfikować etap przygotowania wzbogaconego roztworu kropli po ekstrakcji do analizy elektroforetycznej. Po zakończonej ekstrakcji kroplę przeniesiono do fiolki stożkowej, przy czym nie odparowywano jej do sucha, lecz dodano 1 μL wody dejonizowanej, następnie roztwór wymieszano i włożono do automatycznego podajnika próbek w celu przeprowadzenia analizy techniką CZE. Pominięto etap odparowania roztworu kropli, przez co skrócono całkowity czas analizy o 20 minut, a także uniknięto nadmiernego rozcieńczenia roztworu kropli, gdyż końcową objętość roztworu próbki zredukowano z 10 μL do 2 μL . Dzięki temu uzyskano znacznie niższe wartości LOD i LOQ dla HTL w moczu, które wyniosły odpowiednio 0,12 $\mu\text{mol/L}$ i 0,22 $\mu\text{mol/L}$. Porównując otrzymaną wartość LOQ z innymi opisanymi

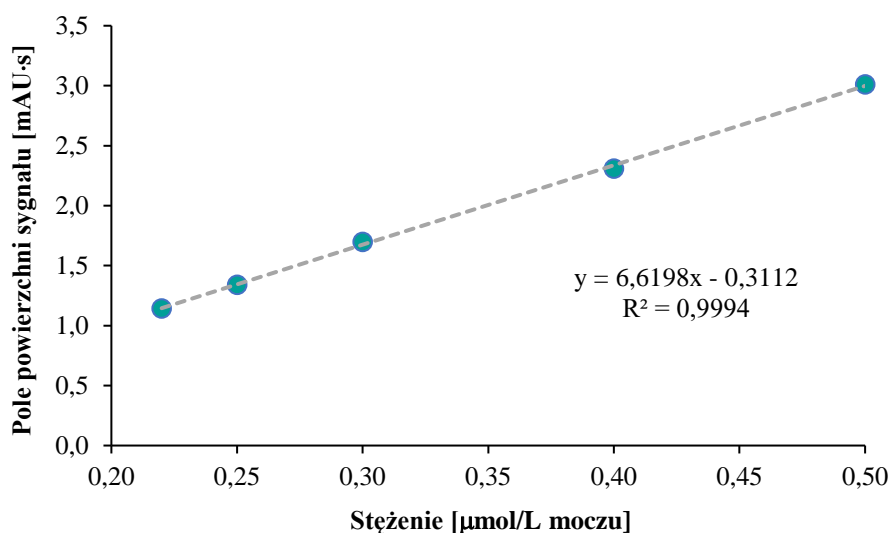
w literaturze procedurami, jest ona niższa niż dla metody oznaczania HTL w moczu za pomocą FIA [90]. Natomiast była ona wyższa niż w procedurach wykorzystujących GC-MS [92, 93], HPLC-FLD [98] oraz FASI-MEKC [102] do oznaczania HTL w moczu, dla których wartość LOQ wynosiła odpowiednio 0,01 $\mu\text{mol/L}$, 0,05 $\mu\text{mol/L}$, 0,02 $\mu\text{mol/L}$ oraz 0,09 $\mu\text{mol/L}$.

W ramach walidacji metody przeprowadzono jej kalibrację, wyznaczając pięciopunktową zależność pola powierzchni sygnału od wzrastającego stężenia HTL w moczu. W tym celu sporządzono w trzech powtórzeniach roztwory standardowe HTL o następujących stężeniach: 0,22; 0,25; 0,30; 0,40; 0,50 $\mu\text{mol/L}$. W **tabeli 7** oraz na **rysunku 63** zestawiono otrzymane wyniki analiz elektroforetycznych.

Tabela 7. Wyniki kalibracji metody SDME-CZE do oznaczania HTL w moczu człowieka.

Dodano [$\mu\text{mol/L}$]	Znaleziono \pm SD [mAU·s]	RSD [%]	Odzysk [%]
0,22	0,22 \pm 0,02	9,1	99,8
0,25	0,25 \pm 0,01	4,0	99,8
0,30	0,30 \pm 0,03	10,0	101,1
0,40	0,40 \pm 0,04	10,0	99,0
0,50	0,50 \pm 0,01	2,0	100,4

n=3



Rys. 63. Krzywa kalibracyjna HTL w moczu wykonana na podstawie pól powierzchni sygnałów pochodzących od HTL.

Jak można zauważyć na **rysunku 63** krzywa kalibracyjna wykazała charakter liniowy w badanym zakresie stężeń, a wyliczony dla niej współczynnik korelacji liniowej (pierwiastek kwadratowy współczynnika R^2) wyniósł 0,9997. Równanie prostej wyznaczone z wykorzystaniem funkcji Reglinp w arkuszu kalkulacyjnym MS Excel było następujące: $y = (6,6198 \pm 0,0951) \cdot x - (0,3112 \pm 0,0332)$. Zależność liniowa pola powierzchni sygnału analitycznego HTL względem wzrastających stężeń, stwarza możliwość zastosowania prezentowanej metody do oznaczania analitu w moczu. Precyzja wyrażona przez względne odchylenie standardowe dla punktów krzywej kalibracyjnej w moczu mieściło się w zakresie od 2,0 do 10,0%, natomiast wartości dokładności wyrażone jako odzysk, były w zakresie od 99,8 do 101,1%.

Następnym krokiem przeprowadzonej walidacji opracowanej metody było wyznaczenie wewnątrz- oraz międzydniowej precyzji oraz dokładności. W tym celu wybrano trzy stężenia HTL, które reprezentowały cały zakres sporządzonej krzywej kalibracyjnej. Pierwsze stężenie było zbliżone do wartości LOQ, drugie zaś reprezentowało środek zakresu krzywej, a trzecie było bliskie jej końca. Próbkę moczu przygotowano w trzech powtórzeniach, wzbogacając je roztworem standardowym HTL w taki sposób, aby końcowe stężenie analitu wynosiło odpowiednio 0,24; 0,35; 0,47 $\mu\text{mol/L}$ moczu. Dla tak przygotowanych próbek przeprowadzono ekstrakcję SDME, a następnie analizę za pomocą techniki CZE. Uzyskane w tym eksperymencie dane przedstawiono w **tabeli 8**.

Tabela 8. Dane walidacyjne dla metody SDME-CZE.

Dodano [$\mu\text{mol/L}$]	Wewnątrzdniowa			Międzydniowa		
	Znaleziono \pm SD [$\mu\text{mol/L}$]	Precyzja [%]	Dokładność [%]	Znaleziono \pm SD [$\mu\text{mol/L}$]	Precyzja [%]	Dokładność [%]
0,24	0,24 \pm 0,02	8,3	100,0	0,23 \pm 0,02	8,7	95,8
0,35	0,32 \pm 0,02	6,3	91,4	0,32 \pm 0,02	6,3	91,4
0,47	0,46 \pm 0,03	6,5	97,9	0,45 \pm 0,03	6,7	95,7

n=3

Zgodnie z powyższą tabelką precyzja wewnątrzdniowa dla prezentowanej metody okazała się mniejsza niż 8,3%, a dokładność mieściła się w zakresie 91,4 - 100,0%. Z kolei wartości precyzji międzydniowej były mniejsze niż 8,7%, a zakres dokładności mieścił się od 91,4 - 95,8%.

Na podstawie wartości tych parametrów można stwierdzić, iż są one zadowalające i zgodne z kryteriami analizy próbek biologicznych [228].

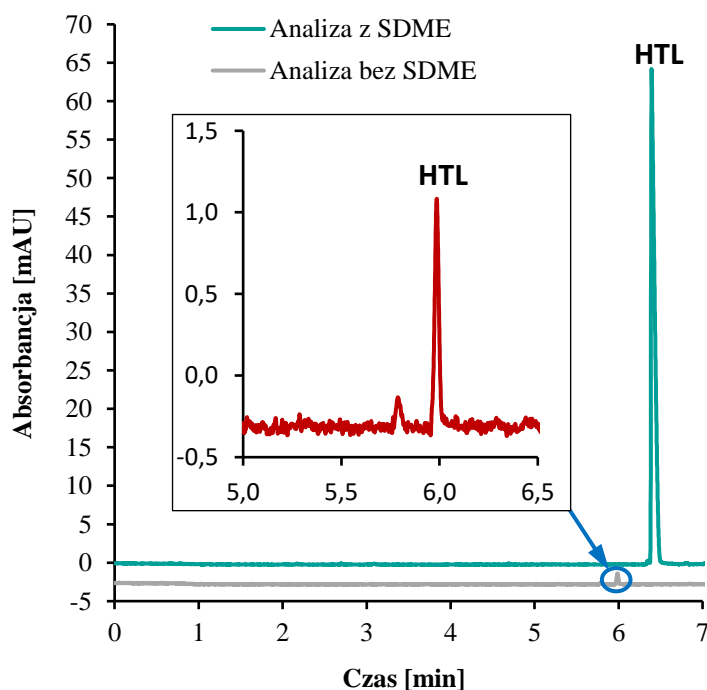
Prezentowana analityczna procedura oznaczania HTL za pomocą CZE ma w sobie element nowości, którym jest SDME w trybie off-line. Charakteryzuje się także prostym przygotowaniem próbki, niskim zużyciem odczynników chemicznych (w tym toksycznego dla środowiska i ludzi chloroformu), a proces ekstrakcji nie wymaga wyspecjalizowanej aparatury tylko zwykłej mikrostrzykawki. Przedstawioną metodę porównano z innymi opublikowanymi w literaturze naukowej procedurami oznaczania HTL w moczu z wykorzystaniem CE jako techniki separacyjnej (**tabela 9**).

Tabela 9. Porównanie opracowanej metody SDME-CZE z innymi opisanymi w literaturze metodami oznaczania HTL.

Technika analityczna	Metoda przygotowania próbki do analizy	Całkowity czas analizy [min]	LOD [$\mu\text{mol/L}$]	LOQ [$\mu\text{mol/L}$]	Zakres liniowości [$\mu\text{mol/L}$]	Matryca próbki	Rodzaj detekcji
CZE	SDME (off-line)	29	0,12	0,22	0,22 - 0,50	mocz	UV-Vis
FIA [90]	20-krotne rozcieńczenie próbki + separacja Hcy od HTL za pomocą modyfikowanych nanocząstek złota	40	0,6	2	2 - 30	mocz	FLD
GC [92]	LLE + derywatywacja	26	0,005	0,01	0,01 - 0,2	mocz	MS
GC [93]	LLE + derywatywacja	25	Nie podano	0,05	0,05 - 1	mocz	MS
HPLC [55]	SPE + derywatywacja	Podano tylko czas trwania analizy chromatograficznej – 8 min	Nie podano	Nie podano	0,0001 - 0,5	mocz	FLD
HPLC [98]	SPE + derywatywacja	Podano tylko czas trwania analizy chromatograficznej – 2,2 min	Nie podano	0,02	0,02 - 3	mocz	FLD
HP LC [100]	LLE + derywatywacja	53	Nie podano	Nie podano	0,2 - 2	mocz myszy	FLD
CZE [101]	-	7	1	Nie podano	20 - 2000	mieszana reakcyjna	UV-Vis
MEKC-FASI-CE [102]	LLE	42	Nie podano	0,09	0,1 - 1	mocz	UV-Vis

4.4. Wyznaczenie stopnia zateżenia analitu – współczynnik wzmocnienia czułości metody

Wydatność zateżenia analitu można wyrazić za pomocą SEF. Sposób jego wyznaczania dokładnie opisano w **podrozdziale 3.3**. W celu wyznaczenia tego współczynnika przygotowano dwie próbki w trzech powtórzeniach. Pierwszą próbkę przygotowaną w sposób jaki opisano w **podrozdziale 4.2. – Przygotowanie próbki do procedury ekstrakcji** wzbogacono znaną ilością HTL, tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 50 $\mu\text{mol/L}$ moczu. Następnie, z tak przygotowanej próbki przeprowadzono mikroekstrakcję do kropli w zoptymalizowanych warunkach w trybie off-line. Wzbogacony roztwór kropli przeniesiono do fiolki CE, dodano 1 μL wody dejonizowanej, wymieszano, po czym roztwór poddano analizie stosując wcześniej dobrane warunki rozdzielania elektroforetycznego opisane w **podrozdziale 4.1**. Drugą próbkę przygotowano w ten sposób, że do próbki Eppendorfa dodano mocz, który również doszczepiono roztworem standardowym HTL, tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 50 $\mu\text{mol/L}$ moczu. Następnie, dodano taką objętość wody dejonizowanej aby stosunek mocz:woda dejonizowana wynosił 1:2 (v/v). Tak przygotowaną próbkę moczu poddano analizie elektroforetycznej. Wartość współczynnika SEF_A obliczona z równania (9) wyniosła około 100. Na **rysunku 64** przedstawiono dwa reprezentatywne elektroforegramy, które uzyskano po analizie moczu metodą z wykorzystaniem SDME oraz po analizie moczu w procedurze bez stosowania procedury zateżenia.



Rys. 64. Reprezentatywne elektroforegramy uzyskane po analizie próbki moczu zawierającej HTL o stężeniu 50 $\mu\text{mol/L}$ metodą wykorzystującą SDME (zielona linia) oraz metodą bez stosowania SDME (szara linia).

4.5. Oznaczanie tiolaktonu homocysteiny w moczu człowieka

Pomimo kilkukrotnego zredukowania końcowej objętości próbki otrzymanej po wykonaniu ekstrakcji, tj. z 10 μL do 2 μL (zgodnie z opisem w **podrozdziale 4.4**) oraz przeprowadzenia optymalizacji warunków procedury SDME realizowanej za pomocą strzykawki (zgodnie z opisem w **podrozdziale 4.2**) w celu polepszenia czułości stężeniowej CE, niestety uzyskano wysoką wartość LOQ (0,22 $\mu\text{mol/L}$ moczu). Z tego powodu, zastosowanie opracowanej procedury do oznaczania HTL w moczu jest ograniczone, ponieważ metoda nadaje się jedynie do badania zawartości analitu w moczu pacjentów, u których stwierdzono hiperhomocysteinemię. U osób, u których metabolizm homocysteiny zachodzi prawidłowo, ilość wydalanego z moczem HTL będzie niewielka, więc monitorowanie jego zawartości z wykorzystaniem prezentowanej metody SDME-CZE nie jest możliwe. Z tego powodu postanowiono, aby w dalszym etapie badań zastosować w procedurze dodatkowe zateżnienie analitu wewnątrz kapilary. Szczegółowo zostało to opisane w kolejnym rozdziale.

Zoptymalizowane warunki analizy moczu na zawartość tiolaktonu homocysteiny

Podczas opracowania prezentowanej w **rozdziale 4** procedury analitycznej oznaczania HTL zoptymalizowano warunki SDME w trybie on-line. Parametry separacji CZE były natomiast takie jak opisano w **podrozdziale 4.1**:

- Kapilara: długość całkowita 64 cm (efektywna długość: 55,5 cm), średnica wewnętrzna 75 μm ;
- BGE: roztwór $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ o $\text{pH} = 4,75$ i stężeniu 0,1 mol/L;
- napięcie: 21 kV;
- temperatura kapilary: 23 $^\circ\text{C}$;
- hydrodynamiczne wprowadzenie próbki do kapilary: 50 mbar \times 20 s (co odpowiada objętości równej ~ 121 nL).

W trakcie optymalizacji procedury ekstrakcji SDME realizowanej poza układem pomiarowym CE dobrano następujące warunki:

- przygotowanie próbki: wymieszanie moczu z buforem fosforanowym o stężeniu 0,2 mol/L i $\text{pH} = 8,2$ w stosunku 1:2;
- rozpuszczalnik organiczny oraz jego objętość: chloroform o objętości 55 μL ;
- rodzaj fazy akceptorowej oraz jej stężenie: kwas ortofosforowy(V) o stężeniu 0,004 mol/L;
- czas ekstrakcji z próbki do fazy organicznej (I etap): 2 min;
- czas ekstrakcji z fazy organicznej do kropli fazy akceptorowej (II etap): 15 min.

5. Opracowanie metody oznaczania tiolaktonu homocysteiny za pomocą elektroforezy strefowej z wykorzystaniem mikroekstrakcji do pojedynczej kropli oraz wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego

5.1. Dobór warunków elektroforetycznego rozdzielania

Jednym z etapów opracowywania analitycznej procedury oznaczania HTL w moczu człowieka za pomocą CZE-SDME oraz wprowadzaniem próbki do kapilary ze wzmocnieniem pola (FASI), był ponowny dobór warunków rozdzielania. Było to spowodowane potrzebą dostosowania BGE do techniki zateżnienia za pomocą FASI, którą realizowano w kapilarze, bezpośrednio przed separacją elektroforetyczną, ponieważ w trakcie stosowania warunków pomiarowych CZE opisanych w **podrozdziale 4.1** dochodziło często do spadku natężenia prądu co prowadziło do przerwania analizy. Modyfikacja warunków separacji pozwoliła również uzyskać lepsze rozdzielanie składników próbki w krótkim czasie, z wysoką precyzją i czułością. W trakcie eksperymentów przeprowadzono dobór stężenia składników elektrolitu podstawowego:

- stężenie Na_2HPO_4 ,
- stężenie H_3PO_4 .

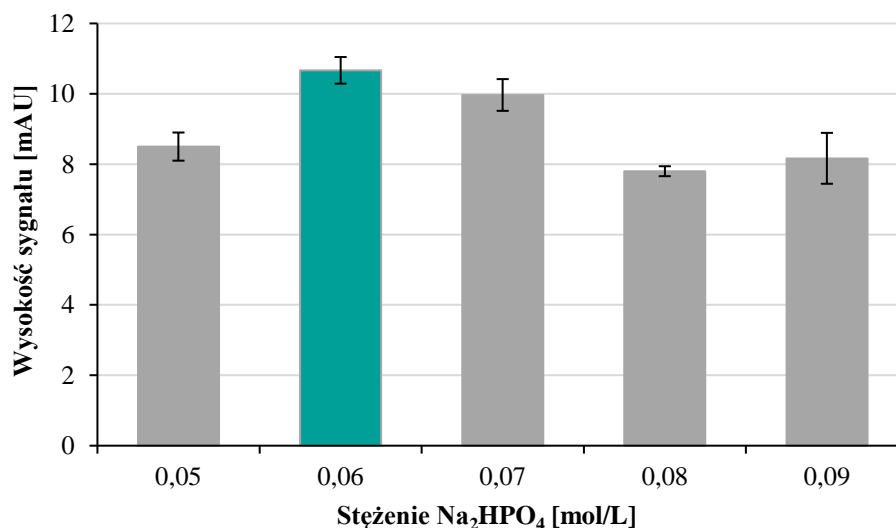
Przy ocenie jakości analiz elektroforetycznych przyjęto następujące kryteria: wysokość i pole powierzchni sygnału analitycznego pochodzącego od HTL oraz precyzję i dokładność metody. Dobór wyżej wymienionych warunków rozdzielania prowadzono wykorzystując wstępne poniższe parametry pomiarowe:

- kapilara: długość całkowita – 60 cm (długość efektywna 51,5 cm), średnica wewnętrzna – 75 μm ,
- temperatura kapilary: 23 °C,
- przykładane napięcie: 21 kV,
- pH elektrolitu podstawowego: 4,75,
- analityczna długość fali: 240 nm.

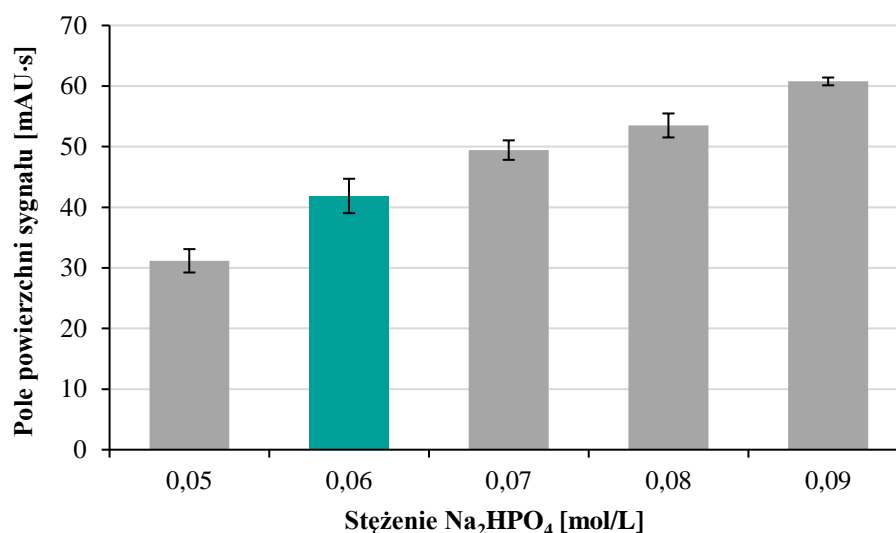
Optymalizacja parametrów CZE została wykonana przed opracowaniem procedury FASI realizowanej w układzie pomiarowym CE. W trakcie doboru warunków rozdzielania próbkę stanowił roztwór wzorcowy HTL o stężeniu 2,5 $\mu\text{mol/L}$ w 0,005 mol/L kwasie fosforowym(V), którą przygotowano poprzez odpowiednie rozcieńczenie roztworu standardu HTL o stężeniu 0,1 mol/L. Roztwór próbki wprowadzano do kapilary sposobem elektrokinetycznym przykładając napięcie 15 kV przez 20 s.

Stężenie Na_2HPO_4

Roztwór wodorofosforanu(V) disodu jest jednym ze składników, z którego przygotowywany był BGE do analiz elektroforetycznych. Drugim składnikiem tego elektrolitu był roztwór H_3PO_4 , którego stężenie wynosiło 1 mol/L. Badanie wpływu stężenia Na_2HPO_4 w BGE na wysokość i pole powierzchni sygnału HTL przeprowadzono przygotowując serię roztworów tego składnika w zakresie stężeń od 0,05 do 0,09 mol/L. Następnie sporządzono roztwory BGE o pH 4,75, kondycjonowano nimi kapilarę stosując następującą sekwencję: 5 min – 0,1 mol/L NaOH, 1 min – H_2O , 20 min – BGE o konkretnym stężeniu wodorofosforanu(V) disodu. Po kondycjonowaniu kapilary trójrotnie przeprowadzono analizy elektroforetyczne, wprowadzając próbkę do kapilary sposobem elektrokinetycznym. Na podstawie uzyskanych wyników sporządzono zależności wysokości oraz pola powierzchni sygnału HTL od stężenia Na_2HPO_4 w roztworze BGE, które przedstawiono na **rysunkach 65 i 66**. Na powyższych rysunkach można zauważyć różniący się przebieg zależności wysokości oraz pola powierzchni piku od stężenia Na_2HPO_4 . Na **rysunku 65** wysokość sygnału osiąga maksimum przy wartości stężenia 0,06 mol/L, przy czym dla wartości kolejnych wartości stężeń większych od 0,06 mol/L nastąpił spadek wysokości piku. Zgodnie z **rysunkiem 66**, wraz ze wzrostem stężenia Na_2HPO_4 następuje ciągle zwiększanie się pola powierzchni sygnału HTL.



Rys. 65. Zależność wysokości sygnału HTL od stężenia Na_2HPO_4 w roztworze elektrolitu podstawowego.

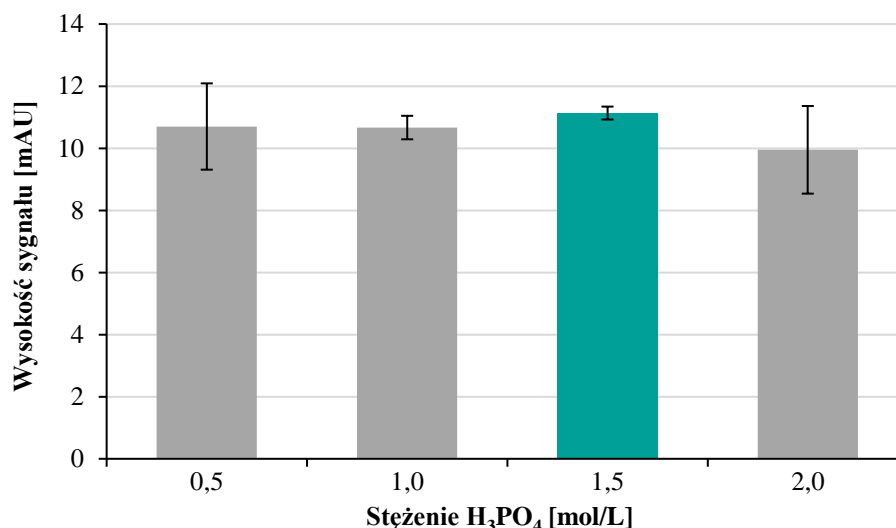


Rys. 66. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od stężenia Na₂HPO₄ w roztworze elektrolitu podstawowego.

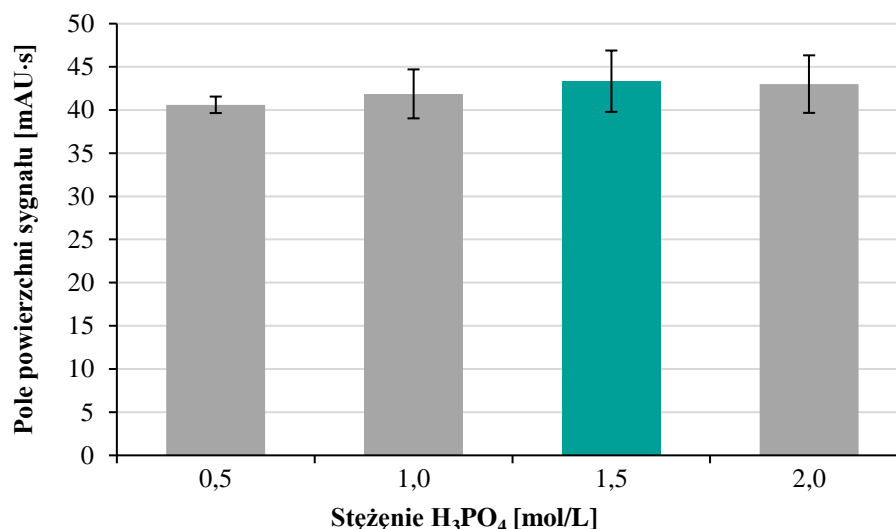
Prawdopodobną przyczyną przebiegu takiej zależności jest to, że wraz ze wzrostem stężenia Na₂HPO₄ maleje EOF. Spadek ruchliwości elektroosmotycznej powoduje wydłużanie się czasu migracji analitu, co w konsekwencji powoduje dyfuzję strefy analitu wzdłuż kapilary (tzw. dyfuzja wzdłużna), czyli spadek wysokości sygnału kosztem wzrostu pola powierzchni. Ponadto, dalszy wzrost stężenia BGE powyżej 0,09 mol/L powodował znaczne podwyższenie natężenia prądu (~300 μA), czego efektem było wydzielanie dużej ilości ciepła Joule'a i częste przerywanie analizy elektroforetycznej. W związku z tym do dalszej optymalizacji warunków rozdzielania elektroforetycznego zostało wybrane stężenie Na₂HPO₄ wynoszące 0,06 mol/L.

Stężenie H₃PO₄

Badanie wpływu stężenia kwasu fosforowego(V), stanowiącego drugi składnik roztworu BGE, na wysokość i pole powierzchni sygnału HTL, prowadzono sprawdzając różne stężenia roztworu H₃PO₄. Sporządzono roztwory elektrolitu podstawowego o pH 4,75, wykorzystując roztwór Na₂PO₄ o stężeniu 0,06 mol/L oraz roztwory H₃PO₄ w zakresie stężeń od 0,5 do 1,5 mol/L. Kapilarę do analiz elektroforetycznych kondycjonowano w ten sam sposób jak opisano w **podrozdziale 4.1**. Wykonano trójrotnie analizy elektroforetyczne roztworu próbki, wprowadzając ją do kapilary sposobem elektrokinetycznym. Na podstawie uzyskanych elektroforegramów wyznaczono wysokości i pola powierzchni sygnałów HTL, które wykorzystano do sporządzenia zależności tych parametrów od stężenia roztworu H₃PO₄. Uzyskane wyniki zaprezentowano na **rysunkach 67 i 68**.



Rys. 67. Zależność wysokości sygnału HTL od stężenia H₃PO₄ w roztworze elektrolitu podstawowego.



Rys. 68. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od stężenia H₃PO₄ w roztworze elektrolitu podstawowego.

Powyższe zależności jasno wskazują na praktycznie brak wpływu stężenia roztworu H₃PO₄ na wysokość oraz pole powierzchni sygnału HTL. Jednakże najwyższą wysokość i pole powierzchni pików uzyskano dla roztworu kwasu fosforowego(V) o stężeniu 1,5 mol/L. Stosowanie takiego stężenia nie powodowało problemów ze zbyt wysokim natężeniem prądu przepływającego przez kapilarę i wydzielaniem nadmiernego ciepła Joule'a. W związku z powyższym optymalne stężenia wodorofosforanu(V) disodu oraz kwasu fosforowego(V), za których pomocą sporządzano roztwór elektrolitu podstawowego do analiz elektroforetycznych, wynoszą odpowiednio 0,06 mol/L i 1,5 mol/L.

5.2. Dobór warunków elektrokinetycznego wprowadzania analitu do kapilary

Zatężanie poprzez spiętrzanie na drodze wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola (FASI), to jedna z wielu technik zatężania analitu realizowanych wewnątrz układu separacyjnego CE. FASI wykorzystuje elektrokinetyczne wprowadzanie do kapilary odpowiednio przygotowanej próbki. Próbka powinna charakteryzować się dużo niższym przewodnictwem od przewodnictwa roztworu BGE używanego do analiz elektroforetycznych. W tym celu próbkę przygotowuje się w rozcieńczonym roztworze BGE albo w innym roztworze o dużo niższym przewodnictwie. Po podstawieniu fiolki z próbką pod wlotowy koniec kapilary przykładane jest napięcie (gwarantem elektrokinetycznego spiętrzania musi być zanurzenie elektrod w roztworze próbki), w wyniku czego cząsteczki analitu w próbce o niskim przewodnictwie szybko migrują do wnętrza kapilary, po czym gwałtownie hamują na granicy próbka/BGE, ponieważ wnikają do roztworu BGE o większym przewodnictwie. W efekcie uzyskuje się znaczące spiętrzanie strefy oznaczanego związku chemicznego. W celu uzyskania dużej wydajności zatężania techniką FASI, zbadano wpływ następujących warunków i parametrów elektrokinetycznego wprowadzania próbki do kapilary:

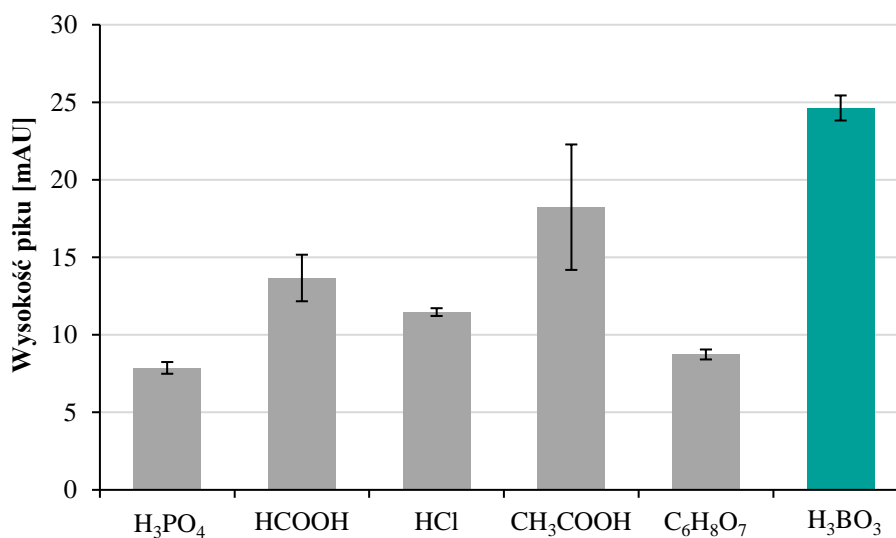
- rodzaj kwasu użytego do przygotowania próbki,
- stężenie roztworu kwasu użytego do przygotowania próbki,
- dobór wartości napięcia podczas wprowadzania próbki do kapilary,
- dobór czasu wprowadzania próbki do kapilary.

Dodatkowo sprawdzono potencjalny wpływ na wydajność FASI małej objętości strefy wody wprowadzanej sposobem hydrodynamicznym bezpośrednio przed oraz za strefą próbki. Strefa wody była już wcześniej, z powodzeniem stosowana w wielu opublikowanych metodach do zwiększenia wydajności FASI [156, 239-243]. Wszystkie eksperymenty były prowadzone wykorzystując do analiz elektroforetycznych wodny roztwór standardu HTL o stężeniu 2,5 nmol/mL, przygotowany poprzez odpowiednie rozcieńczenie standardowego roztworu HTL o stężeniu 0,1 mol/L. W początkowych etapach opracowania warunków zatężania techniką FASI, stosowano następujące parametry elektrokinetycznego wprowadzania próbki: napięcie wprowadzania 5 kV, czas wprowadzania 30 s.

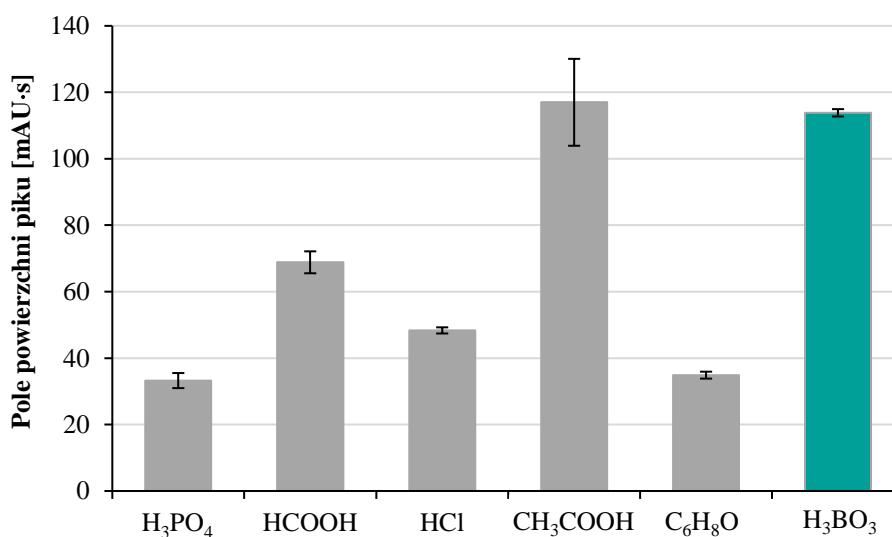
Dobór rodzaju kwasu do przygotowania próbki w zatężaniu techniką FASI

Jednym z pierwszych etapów opracowania zatężania HTL za pomocą techniki FASI było zbadanie wpływu rodzaju kwasu stosowanego do przygotowania próbki na wysokość oraz pole powierzchni sygnałów HTL. Przyczyną stosowania roztworów kwasów jest to, że w roztworze o pH poniżej wartości pK_a dla HTL następuje zjonizowanie cząsteczki poprzez przyłączenie

protonu do grupy aminowej. Umożliwia to migrację cząsteczki HTL do wnętrza kapilary po przyłożeniu napięcia do elektrod (wpływ pH na jonizację cząsteczki HTL został przedstawiony na **rysunku 37**). W tym celu przygotowano serię roztworów kwasów: fosforowego(V), octowego, solnego, mrówkowego, cytrynowego i borowego, o takim samym stężeniu wynoszącym 0,0005 mol/L. Z uzyskanych danych eksperymentalnych wyznaczono zależności wysokości oraz pola powierzchni sygnału HTL od rodzaju kwasu użytego do przygotowania próbki do analizy, które przedstawiono w postaci wykresów na **rysunkach 69** oraz **70**.



Rys. 69. Zależność wysokości sygnału HTL od rodzaju kwasu stosowanego do przygotowania próbki do analizy.



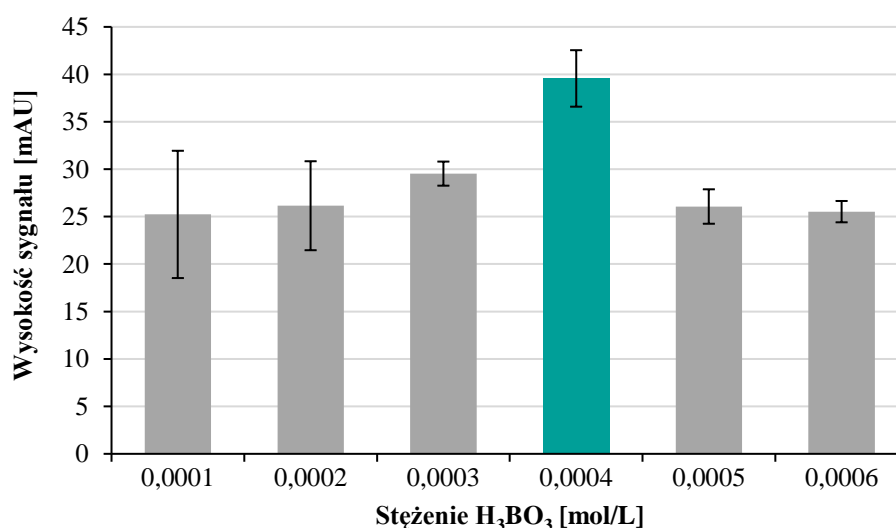
Rys. 70. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od rodzaju kwasu stosowanych do przygotowania próbki do analizy.

Na powyższych rysunkach zauważyć można zróżnicowany wpływ odczynnika stosowanego do przygotowania próbki na wydajność zateżania HTL techniką FASI. Najwyższe parametry

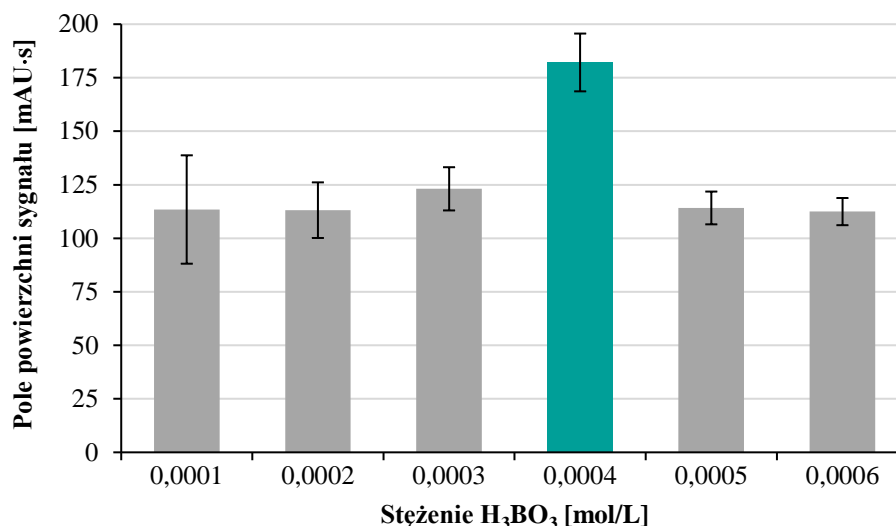
sygnałów uzyskano dla kwasów octowego oraz borowego. Stosowanie kwasu octowego skutkowało jednak uzyskaniem wyników o dużo gorszej precyzji niż w przypadku stosowania H_3BO_3 . Dlatego do dalszych eksperymentów wybrano kwas borowy, który był wykorzystywany do sporządzenia roztworów próbek.

Dobór stężenia kwasu do przygotowania próbki w zateżaniu techniką FASI

Po dobraniu rodzaju kwasu do przygotowania próbki, kolejnym etapem była optymalizacja stężenia kwasu borowego. Odpowiednie stężenie jest niezbędne, aby pH roztworu próbki było takie by cząsteczka HTL była zjonizowana. Żeby osiągnąć maksymalny efekt zateżania wynikający z różnicy przewodnictwa próbki i roztworu BGE, ważne jest by przewodnictwo próbki nie było zbyt wysokie. Wpływ stężenia H_3BO_3 na wydajność zateżania zbadano przygotowując roztwory tego kwasu w zakresie stężeń od 0,0001 do 0,0006 mol/L. Na podstawie uzyskanych sygnałów analitycznych sporządzono zależności wysokości oraz pola powierzchni sygnału od stężenia kwasu borowego. Zależności przedstawiono w postaci wykresów na **rysunkach 71 i 72**. Z poniższych wykresów zależności wysokości oraz pola powierzchni sygnału od stężenia kwasu borowego wynika, że najkorzystniejsze stężenie wynosi 0,0004 mol/L. Wraz ze wzrostem stężenia nieznacznie rośnie wysokość oraz pole powierzchni sygnału HTL. Dla wartości 0,0004 mol/L następuje natomiast dość gwałtowny wzrost obu parametrów sygnału osiągając maksimum. Kolejne zwiększanie stężenia H_3BO_3 powoduje jednak spadek wysokości oraz pola powierzchni. Dlatego do dalszych badań wybrano stężenie H_3BO_3 wynoszące 0,0004 mol/L.



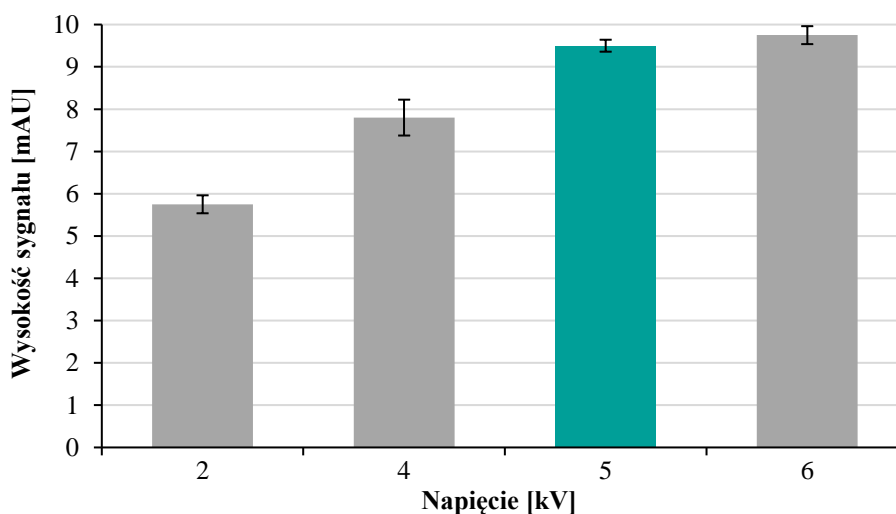
Rys. 71. Zależność wysokości sygnału HTL od stężenia kwasu borowego stosowanego do przygotowania próbki do analizy.



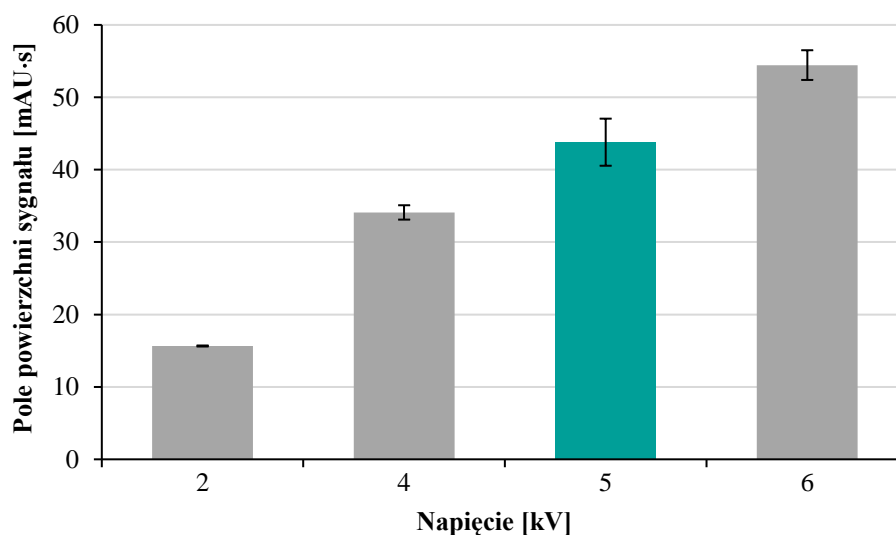
Rys. 72. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od stężenia kwasu borowego stosowanego do przygotowania próbki do analizy.

Dobór napięcia wprowadzania próbki do kapilary techniką FASI

Następnym etapem opracowania metody zatężania HTL techniką FASI był dobór odpowiedniego napięcia przykładanego do elektrod, podczas elektrokinetycznego wprowadzania próbki do kapilary. Wlotowy koniec kapilary zanurzony był w roztworze HTL o stężeniu 2,5 nmol/mL przygotowanym w 0,0004 mol/L H₃BO₃. Wpływ przykładanego napięcia podczas elektrokinetycznego wprowadzania próbki na wydajność zatężania HTL badano zmieniając napięcie w zakresie od 2 kV do 6 kV. Z uzyskanych wyników sporządzono zależności wysokości oraz pola powierzchni sygnału HTL od przykładanego napięcia podczas elektrokinetycznego wprowadzania próbki do kapilary, które w postaci wykresów przedstawiono na **rysunkach 73 i 74**.



Rys. 73. Zależność wysokości sygnału HTL od przykładanego napięcia podczas elektrokinetycznego wprowadzania próbki do kapilary.

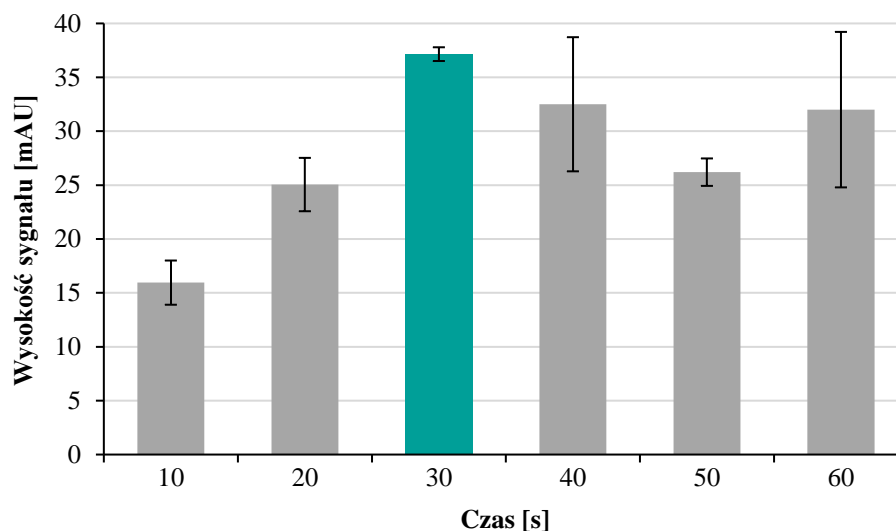


Rys. 74. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od przykładanego napięcia podczas elektrokinetycznego wprowadzania próbki do kapilary.

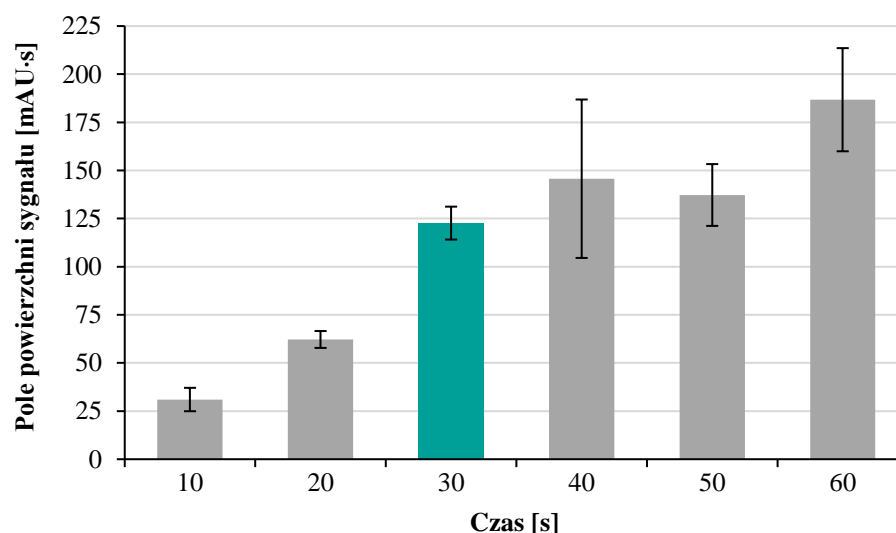
Na podstawie powyższych zależności można zauważyć, że wraz ze wzrostem przykładanego napięcia podczas elektrokinetycznego wprowadzania próbki rośnie wysokość i pole powierzchni sygnału HTL. Przy czym powyżej wartości 5 kV przyrost wysokości jest mniej wyraźny, natomiast pole powierzchni stale wzrasta. Mimo, że dla 6 kV uzyskano nieznacznie wyższy sygnał HTL, to jednak jego kształt był niesymetryczny a wierzchołek piku nie był ostry. Przy stosowaniu napięcia wynoszącego 5 kV uzyskiwano natomiast symetryczne i ostre sygnały, dlatego do dalszych badań wybrano tę wartość napięcia.

Dobór czasu wprowadzania próbki do kapilary techniką FASI

Kolejnym etapem badań był dobór czasu elektrokinetycznego wprowadzania próbki do kapilary. Wpływ czasu wprowadzania próbki do kapilary na wysokość oraz pole powierzchni sygnału HTL zbadano zmieniając czas w zakresie od 10 s do 60 s, przy stałym napięciu wprowadzania wynoszącym 5 kV. Po uzyskaniu elektroforegramów odczytano poszczególne parametry sygnałów HTL i sporządzono wykresy zależności wysokości oraz pola powierzchni od czasu wprowadzania próbki do kapilary, które zaprezentowano w postaci **rysunków 75 i 76**. Z poniższych zależności wynika, że dla początkowych czasów wprowadzania próbki 10 – 30 s rośnie zarówno wysokość jak i pole powierzchni sygnału HTL. Jednakże w przypadku wysokości sygnału nie obserwowano dalszego jej wzrostu wraz z wydłużaniem czasu wprowadzania próbki ponad 30 s, dodatkowo powtarzalność analiz nie była satysfakcjonująca.



Rys. 75. Zależność wysokości sygnału HTL od czasu elektrokinetycznego wprowadzania próbki do kapilary.



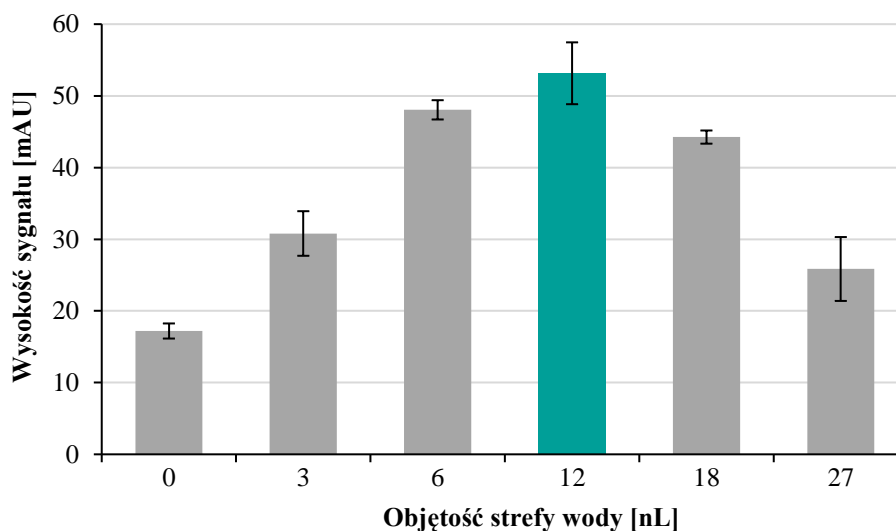
Rys. 76. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od czasu elektrokinetycznego wprowadzania próbki do kapilary.

Wydłużenie czasu wprowadzania próbki powodowało zwiększanie pola powierzchni piku, lecz kształt otrzymywanych sygnałów nie był symetryczny, a wierzchołek piku nie był ostry. Do dalszych badań jako czas elektrokinetycznego wprowadzania próbki do kapilary wybrano 30 s.

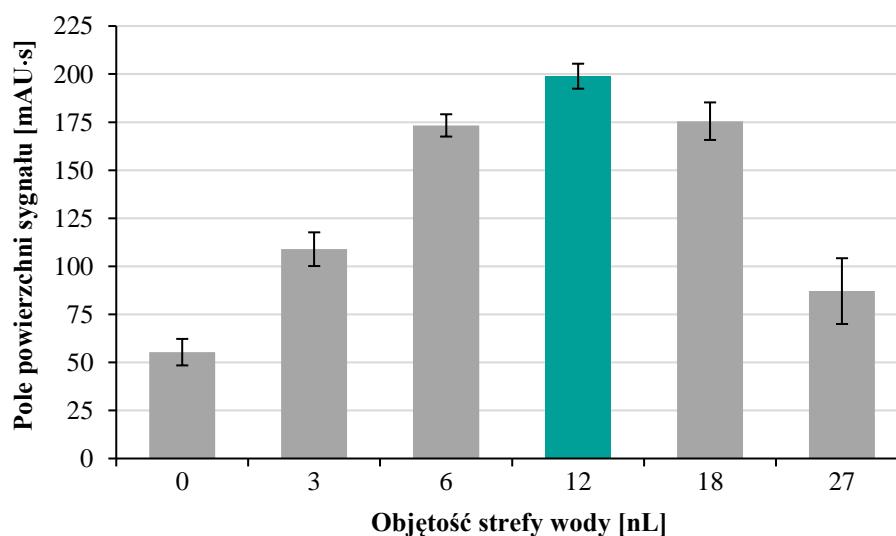
Dobór objętości strefy wody wprowadzonej do kapilary przed strefą próbki

Jednym z ostatnich etapów opracowania załączenia HTL w układzie pomiarowym CE techniką FASI było zbadanie wpływu obecności strefy wody wprowadzonej do kapilary przed strefą próbki oraz wpływu jej objętości na zwiększenie wydajności załączenia. Po przyłożeniu napięcia w strefie wody o bardzo niskim przewodnictwie jest wysokie pole elektryczne, dzięki któremu cząsteczki analitu wnikające w tą strefę osiągają jeszcze większą prędkość, co skutkuje

zwiększeniem efektu zateżenia. W związku z powyższym bezpośrednio przed elektrokinetycznym wprowadzeniem próbki do kapilary, w kolejnych analizach wprowadzano strefę wody o zwiększającej się objętości. Strefę wody wprowadzano sposobem hydrodynamicznym o następujących parametrach: 5 mbar przez 5 s, 10 mbar przez 5 s, 10 mbar przez 10 s, 15 mbar przez 10 s, 15 mbar przez 15 s, co odpowiada objętościom wody 3, 6, 12, 18, 27 nL. Na podstawie uzyskanych elektroforegramów odczytano wartości wysokości oraz pola powierzchni sygnału HTL i sporządzono wykresy ich zależności od objętości strefy wody wprowadzonej przed strefą próbki. Zależności przedstawiono na **rysunkach 77 i 78**.



Rys. 77. Zależność wysokości sygnału HTL od objętości strefy wody wprowadzonej do kapilary przed strefą próbki.



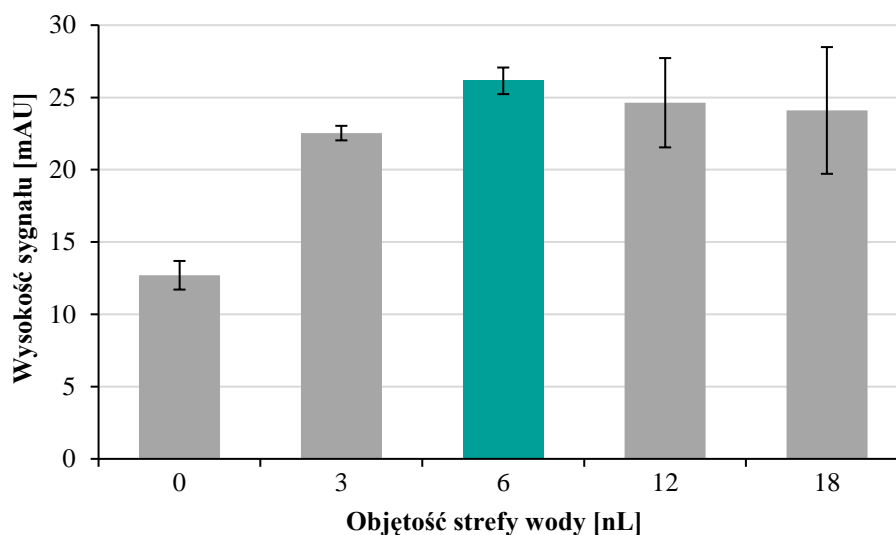
Rys. 78. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od objętości strefy wody wprowadzonej do kapilary przed strefą próbki.

Zależności przedstawione na powyższych rysunkach jasno wskazują, że najkorzystniejsza objętość strefy wody, wprowadzanej przed strefą próbki, wynosi 12 nL, co odpowiada wartościom ciśnienia i czasu 10 mbar przez 10 s. Porównując wielkość sygnałów analitycznych otrzymanych podczas analizy w której wprowadzano strefę wody do kapilary przed strefą próbki z sygnałami w analizie bez stosowania strefy wody, otrzymano około 4-krotne zwiększenie wydajności zatężania próbki. Wprowadzenie do kapilary większej objętości strefy wody przed próbką powodowało jednak zmniejszenie dodatkowego efektu spiętrzenia analitu. Może to być spowodowane miejscowym przegrzaniem kapilary w wyniku zbyt dużego pola elektrycznego w strefie wody, co w konsekwencji doprowadziło do zwiększenia objętości tej strefy i częściowego wypchnięcia próbki z kapilary. Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki eksperymentów do dalszych badań wybrano objętość strefy wody równą 12 nL, która odpowiadała parametrom wprowadzania próbki pod ciśnieniem 10 mbar przez 10 s.

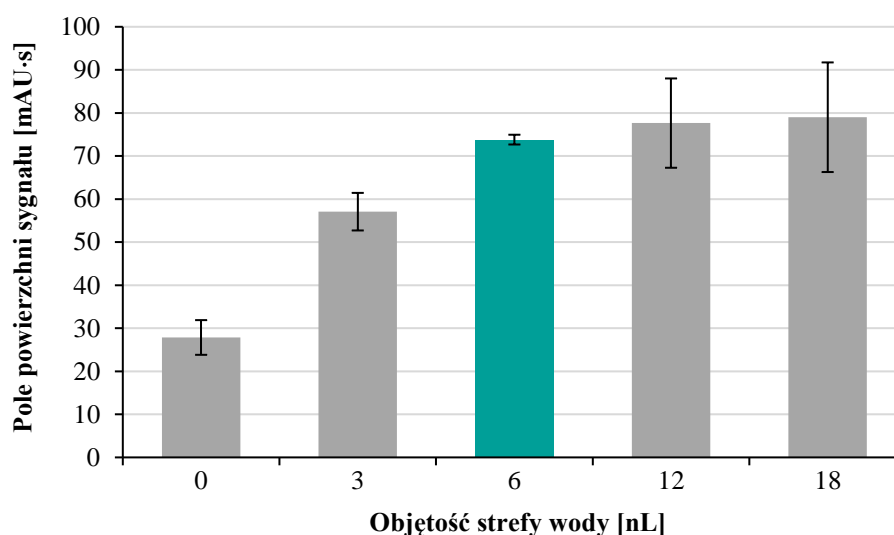
Dobór objętości strefy wody wprowadzonej do kapilary za strefą próbki

Ostatnim etapem opracowania zatężania HTL w kapilarze poprzez spiętrzenie techniką FASI, było zbadanie wpływu objętości strefy wody wprowadzonej do kapilary po strefie próbki na zwiększenie wydajności zatężania. Podobnie jak w przypadku strefy wody wprowadzonej do kapilary przed strefą próbki, strefa wody hydrodynamicznie wprowadzona za strefą próbki również może spotęgować wydajność zatężania. Polega to na tym, że po wprowadzeniu strefy wody za strefą próbki, przykładane jest napięcie w celu przeprowadzenia elektroforetycznej separacji. Prowadzi to do tego, że w strefie wody za próbką panuje wysokie pole elektryczne, które powoduje, że cząsteczki analitu ulegają dalszemu przyspieszaniu, zaś na granicy próbki – BGE ulegając gwałtownemu wyhamowaniu kationy analitu doznają spiętrzenia w jeszcze węższej strefie. Ponadto strefa wody wprowadzona za próbką wydłuża czas mieszania się próbki z BGE wewnątrz kapilary w trakcie trwania analizy elektroforetycznej, co dodatkowo wpływa pozytywnie na efekt zatężania techniką FASI.

W celu zbadania zależności, bezpośrednio po elektrokinetycznym wprowadzeniu próbki do kapilary, hydrodynamicznie wprowadzano strefę wody o zwiększającej się objętości tj. 3, 6, 12 i 18 nL, co odpowiada następującym wartościom ciśnienia i czasu: 5 mbar przez 5 s, 10 mbar przez 5 s, 10 mbar przez 10 s oraz 15 mbar przez 10 s. Następnie przeprowadzono analizę elektroforetyczną, a z uzyskanych elektroforegramów odczytano wartości wysokości oraz pola powierzchni sygnału HTL i na ich podstawie sporządzono odpowiednie wykresy (**rysunek 79 i 80**).



Rys. 79. Zależność wysokości sygnału HTL od objętości strefy wody wprowadzanej za strefą próbki.



Rys. 80. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od objętości strefy wody wprowadzanej za strefą próbki.

Z powyższych zależności można zauważyć, że obecność strefy wody wprowadzanej po strefie próbki również zwiększa wydajność zateżnienia w kapilarze. Najlepsze wyniki uzyskano dla objętości wynoszącej 6 nL (co odpowiada parametrom 10 mbar przez 5 s). Wprowadzanie strefy wody o większej objętości nie powodowało już znacznej zmiany wartości wysokości i pola powierzchni sygnału. Zauważono natomiast pogorszenie powtarzalności wyników analiz, co obrazują zaprezentowane na wykresach słupki błędów. W związku z tym, w dalszych eksperymentach, do kapilary za strefą próbki hydrodynamicznie wprowadzano strefę wody, przykładając ciśnienie 10 mbar przez 5 s.

Podsumowując obydwa etapy optymalizacji hydrodynamicznego wprowadzania strefy wody przed i za strefą próbki, polepszenie efektu zateżnienia analitu uzyskano poprzez wprowadzenie

strefy wody pod ciśnieniem 10 mbar przez 10 s przed strefą próbki oraz wprowadzenie strefy wody za strefą próbki stosując ciśnienie 10 mbar przez 5 s.

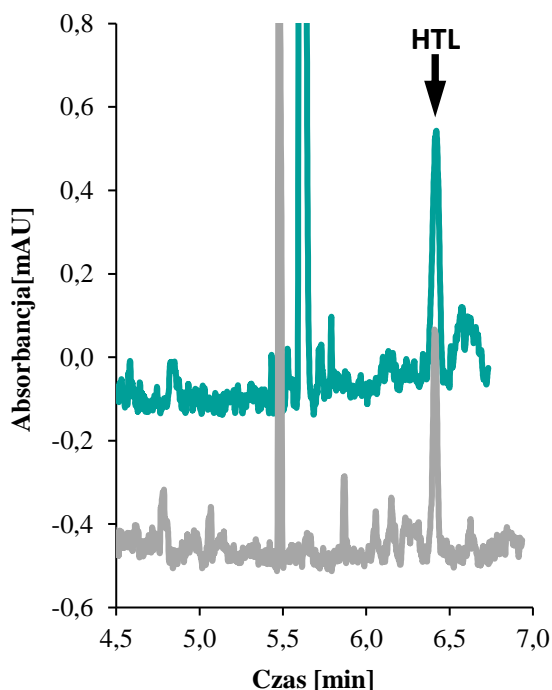
5.3. Mikroekstrakcja do pojedynczej kropli jako element przygotowania próbki oraz pierwszy etap zateżenia analitu

Po zakończeniu optymalizacji zateżenia HTL w układzie pomiarowym CE techniką FASI, kolejnym etapem opracowania przedstawianej metody oznaczania HTL w moczu człowieka było podjęcie próby połączenia opisanej w **podrozdziale 4.2** procedury SDME realizowanej w trybie off-line z zoptymalizowaną procedurą elektrokinetycznego wprowadzaniem próbki do kapilary, po której następowała analiza elektroforetyczna. Próbką, którą wykorzystywano podczas etapu przeprowadzania procedury SDME, był mocz człowieka uzyskany od pozornie zdrowego wolontariusza. Procedura SDME była podobna do procedury opisanej w **podrozdziale 4.2**, przy czym zmodyfikowano krok postępowania z kroplą po zakończeniu procesu ekstrakcji, podczas którego kroplę ekstraktu przeniesiono do specjalnego inserta umieszczanego w naczynku do CE. W dalszej kolejności roztwór kropli został odparowany do sucha w termostacie blokowym w temperaturze 70 °C. Następnie, aby osiągnąć jak najwyższą czułość metody, pozostałość po odparowaniu rozpuszczano w malejących objętościach roztworu kwasu borowego o stężeniu 0,0004 mol/L, tj. 30, 20, 10 i 5 µL. Z poczynionych obserwacji na podstawie uzyskanych elektroforegramów zauważono, że wraz ze zmniejszaniem objętości roztworu kwasu otrzymywano coraz wyższe sygnały analityczne pochodzące od analitu, gdzie najwyższe otrzymano dla objętości kwasu równej 10 µL. Przy stosowaniu objętości 5 µL sygnały HTL były mniejsze, co było prawdopodobnie spowodowane tym, że jest to zbyt mała objętość, aby efektywnie rozpuścić pozostałość na ściankach po odparowaniu próbki. W związku z powyższym, w dalszych etapach podczas procedury przygotowania próbki do analizy otrzymany wzbogacony roztwór kropli przenoszono do inserta, następnie odparowywano do sucha w 70 °C, a pozostałość rozpuszczano w 10 µL kwasu borowego o stężeniu 0,0004 mol/L.

5.4. Wyznaczenie stopnia zateżenia analitu – współczynnik wzmocnienia czułości metody

W kolejnym etapie badań przeprowadzono ocenę wpływu zastosowanych technik SDME oraz FASI na wydajność zateżenia analitu, poprzez wyznaczenie współczynnika wzmocnienia czułości metody (SEF). Dokładny sposób wyznaczania SEF opisano w **podrozdziale 3.3**. W tym celu przygotowano dwie próbki. Pierwszą z nich była próbka trzykrotnie przygotowana w niezależnych powtórzeniach w sposób jaki opisano w **podrozdziale 4.2**. – *Przygotowanie próbki do procedury ekstrakcji*, do której dodano znaną ilość HTL, aby końcowe stężenie analitu wynosiło 0,1 µmol/L moczu. Następnie przeprowadzono SDME w trybie off-line

w zoptymalizowanych warunkach opisanych w **podrozdziale 5.3**, po czym roztwór próbki wprowadzono elektrokinetycznie w celu zateżnienia oznaczanego analitu poprzez spiętrzenie techniką FASI, wykorzystując wcześniej dobrane parametry opisane w **podrozdziale 5.2**. W kolejnym kroku przeprowadzono analizę elektroforetyczną stosując wcześniej dobrane warunki rozdzielania opisane w **podrozdziale 5.1**. Drugą próbkę przygotowano również trzykrotnie w następujący sposób: do próbki Eppendorfa dodano mocz, który wzbogacono znaną ilością standardu, aby końcowe stężenie HTL wynosiło 8 $\mu\text{mol/L}$ moczu, po czym dodano taką objętość wody dejonizowanej, aby stosunek mocz:woda wynosił 1:2 (v/v). Tak przygotowaną próbkę moczu wprowadzono hydrodynamicznie do kapilary pod ciśnieniem 25 mbar przez 20 s (co odpowiada objętości wprowadzanej próbki równej 61 nL oraz ok. 2% całkowitej objętości kapilary), a następnie poddano analizie elektroforetycznej. Na podstawie uzyskanych elektroforegramów odczytano wartości pola powierzchni sygnału HTL dla obydwu rodzajów próbek, następnie wstawiając do równania (9) wyznaczone pole powierzchni oraz odpowiednie wartości stężeń HTL, wartość współczynnika SEF_A wyniosła około 212. Na poniższym **rysunku 81** przedstawiono dwa reprezentatywne elektroforegramy, które uzyskano po analizie moczu metodą z wykorzystaniem zateżnienia, tj. SDME i FASI, oraz po analizie moczu w procedurze bez stosowania żadnej procedury zateżnienia.



Rys. 81. Reprezentatywne elektroforegramy uzyskane po analizie próbki moczu zawierającej HTL o stężeniu 0,1 $\mu\text{mol/L}$ metodą wykorzystującą SDME-FASI (zielona linia) oraz po analizie próbki moczu zawierającej HTL o stężeniu 8 $\mu\text{mol/L}$ metodą bez stosowania SDME-FASI (szara linia).

5.5. Walidacja opracowanej metody

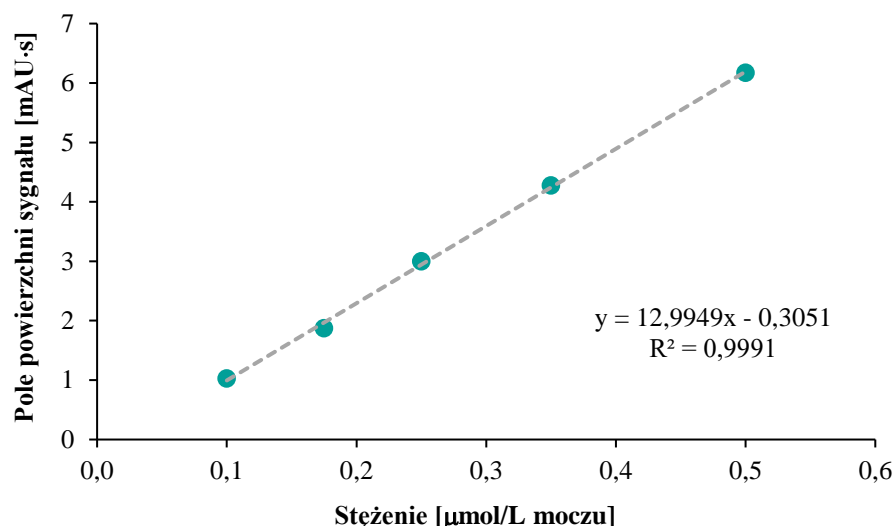
W kolejnym etapie opracowania prezentowanej metody przeprowadzono jej walidację zgodnie z kryteriami dla próbek biologicznych [228], przy wykorzystaniu SDME w trybie off-line jako techniki przygotowania próbki do analizy, dobranych warunków oraz parametrów zaęężania HTL poprzez spięętrzenie techniką FASI oraz warunków elektroforetycznych. Podczas walidowania metody wyznaczono nastęęujące parametry: LOD oraz LOQ, zakres liniowości, wewnątrz- oraz międzydniową precyzję i dokładność. Ponadto przedstawioną metodę porównano z innymi opisanymi w literaturze naukowej procedurami oznaczania HTL [55, 90, 92, 93, 98, 100-102].

Wykorzystując metodę stosunku wielkości sygnału do szumu (S/N) zgodnie z opisem w **podrozdziale 3.4**, wyznaczone eksperymentalnie wartości LOD i LOQ dla HTL w moczu wyniosły odpowiednio 0,04 $\mu\text{mol/L}$ i 0,1 $\mu\text{mol/L}$. W porównaniu z innymi procedurami, otrzymana wartość LOQ jest podobna dla metody oznaczania HTL w moczu za pomocą MEKC-FASI [102], która w tym przypadku wynosiła 0,09 $\mu\text{mol/L}$. Wartość LOQ prezentowanej metody była natomiast niższa niż dla procedury FIA do oznaczania HTL w moczu (2 $\mu\text{mol/L}$) [90], z kolei była ona wyższa w porównaniu z procedurami wykorzystującymi GC-MS [92, 93] HPLC-FLD [98] do oznaczania HTL w moczu (odpowiednio 0,01 $\mu\text{mol/L}$, 0,05 $\mu\text{mol/L}$ oraz 0,02 $\mu\text{mol/L}$). W następnej kolejności, dla opracowanej metody przeprowadzono kalibrację poprzez wyznaczenie zależności pola powierzchni sygnału od rosnącego stęężenia HTL w moczu, stosując roztwory o nastęęujących stęężeniach: 0,100, 0,175, 0,250, 0,350, 0,500 $\mu\text{mol/L}$. Otrzymane wyniki analiz elektroforetycznych zestawiono w **tabeli 10** oraz na **rysunku 82**.

Tabela 10. Wyniki kalibracji metody SDME-FASI-CZE do oznaczania HTL w moczu człowieka.

Dodano [$\mu\text{mol/L}$ moczu]	Znaleziono \pm SD [$\mu\text{mol/L}$ moczu]	RSD [%]	Odzysk [%]
0,100	0,103 \pm 0,012	11,7	103,0
0,175	0,167 \pm 0,005	3,0	95,4
0,250	0,254 \pm 0,013	5,1	101,6
0,350	0,352 \pm 0,028	8,0	100,6
0,500	0,498 \pm 0,011	2,2	99,6

n=3



Rys. 82. Krzywa kalibracyjna HTL w próbkach moczu wykonana na podstawie pól powierzchni sygnałów HTL.

Na przedstawionym **rysunku 81** można zauważyć, że sporządzona krzywa kalibracyjna w badanym zakresie stężeń wykazała charakter liniowy, a współczynnik korelacji liniowej był bliski 1. Stosując funkcję Reglinp w arkuszu kalkulacyjnym Ms Excel, wyznaczone równanie prostej było następujące: $y = (12,9949 \pm 0,2282)x - (0,3051 \pm 0,0704)$. Precyzja metody, wyrażona względnym odchyleniem standardowym, dla punktów krzywej kalibracyjnej w moczu nie przekraczała 12% i mieściła się w przedziale od 2,2 do 11,7%, podczas gdy wartość dokładności metody, wyrażona odzyskiem, była w zakresie 95,4 - 103,0%. Liniowa zależność pola powierzchni sygnału analitycznego względem wzrastających stężeń HTL pozwala na wykorzystanie przedstawionej metody do ilościowego oznaczania badanego analitu w moczu.

W kolejnym etapie walidacji opracowanej metody wyznaczono jej wewnątrz- oraz międzydniową precyzję i dokładność metody. Stąd wybrano trzy stężenia HTL, które reprezentują cały zakres krzywej kalibracyjnej, gdzie pierwszym było stężenie zbliżone do wartości LOQ, drugie reprezentowało środek zakresu krzywej, a trzecie było blisko końca krzywej kalibracyjnej. W tym celu sporządzono trzy próbki moczu zgodnie z procedurą opisaną w **podrozdziale 4.2. – Przygotowanie próbki do procedury ekstrakcji** wzbogacając je znaną ilością standardu HTL w ten sposób, aby końcowe stężenia analitu wynosiły odpowiednio 0,15, 0,30 i 0,45 $\mu\text{mol/L}$ moczu. Następnie wykonano ekstrakcję SDME, po którym elektrokinetycznie wprowadzono próbkę do kapilary, korzystając z techniki FASI oraz przeprowadzono separację za pomocą CZE. W **tabeli 11** przedstawiono uzyskane dane z przeprowadzonego eksperymentu.

Tabela 11. Dane walidacyjne dla metody SDME-FASI-CZE.

Dodano [$\mu\text{mol/L}$]	Wewnątrzdniowa			Międzydniowa		
	Znaleziono \pm SD [$\mu\text{mol/L}$]	Precyzja [%]	Dokładność [%]	Znaleziono \pm SD [$\mu\text{mol/L}$]	Precyzja [%]	Dokładność [%]
0,15	0,15 \pm 0,01	6,6	102,7	0,15 \pm 0,01	8,3	98,2
0,30	0,28 \pm 0,03	10,2	94,9	0,29 \pm 0,03	9,5	97,6
0,45	0,46 \pm 0,03	7,3	101,5	0,44 \pm 0,03	6,4	102,7

n=3

Zgodnie z powyższą tabelką wartości precyzji wewnątrzdniowej były mniejsze niż 11%, a dokładność mieściła się w przedziale od 94,9% do 102,7%. Z kolei wartości precyzji międzydniowej były zaś mniejsze niż 10,0%, a dokładność mieściła się w zakresie 97,6 - 102,7%. Zgodnie z powyższymi wartościami parametrów, tj. precyzji oraz dokładności, były zadowalające i zgodne z kryteriami dla analizy próbek biologicznych [228].

Ponieważ elementem nowości prezentowanej procedury analitycznej oznaczania HTL za pomocą CZE jest wykorzystanie dwóch odmiennych technik zatężania analitu, tj. spiętrzania techniką FASI oraz SDME w trybie off-line, to porównując z innymi opisanymi w literaturze procedurami (**tabela 12**), technika ta charakteryzuje się dużo niższym zużyciem odczynników chemicznych oraz uproszczoną procedurą przygotowania próbki do analizy. Ponadto przeprowadzenie procesu zatężania analitu nie wymaga użycia wyspecjalizowanej aparatury (wystarczy do tego mikrostrzykawka), dzięki czemu metoda jest prosta i tania, a całkowity czas potrzebny na wykonanie analizy został znacznie skrócony.

Tabela 12. Porównanie opracowanej metody SDME-CZE z innymi opisanymi w literaturze metodami oznaczania HTL.

Technika analityczna	Metoda przygotowania próbki do analizy	Całkowity czas analizy [min]	LOD [$\mu\text{mol/L}$]	LOQ [$\mu\text{mol/L}$]	Zakres liniowości [$\mu\text{mol/L}$]	Matryca próbki	Rodzaj detekcji
CZE	SDME (off-line)	30	0,04	0,1	0,1 - 0,5	mocz	UV-Vis
FIA [90]	20-krotne rozcieńczenie próbki + separacja Hcy od HTL za pomocą modyfikowanych nanocząstek złota	40	0,6	2	2 - 30	mocz	FLD
GC [92]	LLE + derywatywacja	26	0,005	0,01	0,01 - 0,2	mocz	MS
GC [93]	LLE + derywatywacja	25	Nie podano	0,05	0,05 - 1	mocz	MS
HPLC [55]	SPE + derywatywacja	Podano tylko czas trwania analizy chromatograficznej – 8 min	Nie podano	Nie podano	0,0001 - 0,5	mocz	FLD
HPLC [98]	SPE + derywatywacja	Podano tylko czas trwania analizy chromatograficznej – 2,2 min	Nie podano	0,02	0,02 - 3	mocz	FLD
HP LC [100]	LLE + derywatywacja	53	Nie podano	Nie podano	0,2 - 2	mocz myszy	FLD
CZE [101]	-	7	1	Nie podano	20 - 2000	mieszana reakcyjna	UV-Vis
MEKC-FASI-CE [102]	LLE	42	Nie podano	0,09	0,1 - 1	mocz	UV-Vis

5.6. Oznaczanie tiolaktonu homocysteiny w moczu człowieka

Ostatnim etapem badań po przeprowadzeniu optymalizacji metody, jej kalibracji oraz walidacji, było oznaczanie tiolaktonu homocysteiny w moczu człowieka za pomocą kapilarnej elektroforezy strefowej z wykorzystaniem mikroekstrakcji do pojedynczej kropli realizowanej w trybie off-line oraz spiętrzania analitu na drodze wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego. W tym celu próbki moczu pobrano od grupy 12 pozornie zdrowych ochotników, którą stanowiło 9 kobiet i 3 mężczyzn. Próbki zostały przygotowane zgodnie z procedurą opisaną w **podrozdziale 4.2. – Przygotowanie próbki do procedury ekstrakcji** oraz wzbogacone znaną ilością standardu HTL, tak aby jego stężenie końcowe wynosiło 0,100 $\mu\text{mol/L}$ moczu ($\sim\text{LOQ}$). Następnie przeprowadzono zatężanie próbki w kapilarze z wykorzystaniem FASI oraz analizę elektroforetyczną za pomocą CZE, a uzyskane dane zebrano w **tabeli 13**.

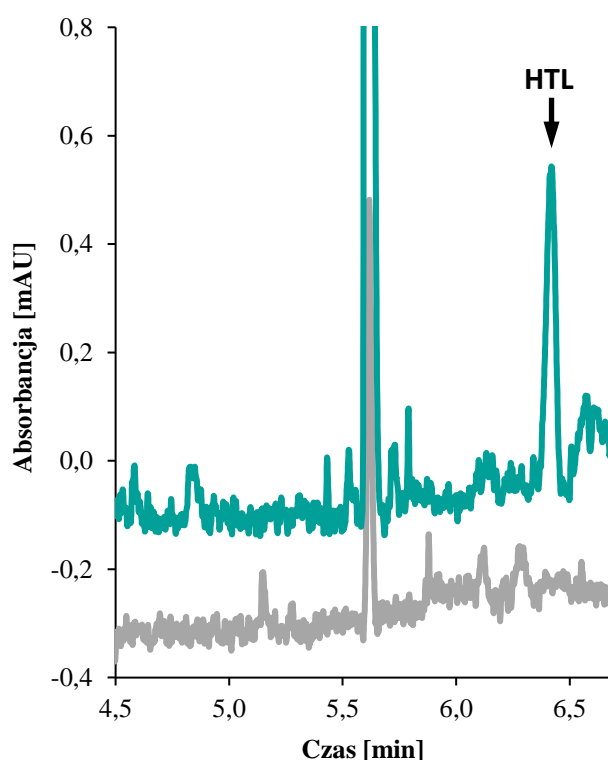
Tabela 13. Stężenie HTL w moczu człowieka.

Numer próbki	Dodano [$\mu\text{mol/L}$ moczu]	Znaleziono \pm SD [$\mu\text{mol/L}$ moczu]	RSD [%]
1 (m)	0,100	0,091 \pm 0,002	2,2
2 (m)	0,100	0,110 \pm 0,002	1,8
3 (m)	0,100	0,134 \pm 0,011	8,2
4 (k)	0,100	0,102 \pm 0,007	6,9
5 (k)	0,100	0,149 \pm 0,002	1,3
6 (k)	0,100	0,121 \pm 0,015	12,4
7 (k)	0,100	0,112 \pm 0,008	7,1
8 (k)	0,100	0,098 \pm 0,001	1,0
9 (k)	0,100	0,115 \pm 0,007	6,1
10 (k)	0,100	0,103 \pm 0,006	5,8
11 (k)	0,100	0,161 \pm 0,006	3,7
12 (k)	0,100	0,137 \pm 0,004	2,9

m – mężczyzna; k – kobieta;
n=3

Na podstawie powyższych danych średnia zawartość HTL w doszczepionym moczu zdrowych ochotników wynosi 0,119 $\mu\text{mol/L}$, a średnia wartość RSD z oznaczeń wynosi 5,0%. W oparciu o uzyskane dane można zauważyć, że w przypadku niektórych próbek dokładność oznaczeń

nie spełnia przyjętych kryteriów dla oznaczeń próbek biologicznych [228]. Dla próbki nr 1 wyznaczone stężenie HTL było niższe od LOQ, aczkolwiek wartość ta mieściła się w zakresie kryterium dokładności, tj. 80 - 120%. Natomiast dla próbek o numerach 3, 5, 11, 12 wartość stężenia była wyższa niż LOQ, lecz w ich przypadku dokładność oznaczeń znacznie przekraczała 120%. Sytuacja opisana powyżej może być prawdopodobnie spowodowana błędami popełnionymi podczas przygotowania próbki do SDME, np. złe ustawienie prędkości mieszania, wygenerowanie innej objętości kropli niż 1 μL , błąd popełniony podczas pipetowania. Ponadto podwyższone wartości HTL w stosunku do wzbogacenia, mogą wynikać z endogennej zawartości HTL w tych próbkach. Reprezentatywne elektroforegramy próbki moczu pozornie zdrowego wolontariusza oraz doszczepionej próbki moczu znaną ilością standardu HTL przedstawiono na **rysunku 83**.



Rys. 83. Reprezentatywne elektroforegramy uzyskane podczas analizy próbki moczu (szara linia) oraz próbki moczu wzbogaconej standardem HTL, tak aby jego końcowa zawartość w płynie ustrojowym wynosiła 0,1 $\mu\text{mol/L}$ (zielona linia).

Zoptymalizowane warunki analizy moczu na zawartość tiolaktonu homocysteiny:

Opracowując prezentowaną w **rozdziale 5** procedurę analityczną oznaczania HTL zoptymalizowano parametry dla zateżzania techniką FASI oraz ponownie dobrano skład BGE zgodnie z opisem w **podrozdziale 5.1**. W związku z powyższym parametry separacji CZE były następujące:

- Kapilara: długość całkowita 64 cm (efektywna długość: 55,5 cm), średnica wewnętrzna 75 μm ;
- BGE: mieszanina 0,06 mol/L roztworu Na_2HPO_4 i 1 mol/L roztworu H_3PO_4 , pH = 4,75;
- napięcie: 21 kV;
- temperatura kapilary: 23 $^\circ\text{C}$;

Podczas opracowania prezentowanej metody korzystano z procedury ekstrakcji SDME realizowanej poza układem pomiarowym CE (zgodnie z opisem w **podrozdziale 5.3**), która składała się z następujących etapów:

- przygotowanie próbki: wymieszanie moczu z buforem fosforanowym o stężeniu 0,2 mol/L i pH = 8,2 w stosunku 1:2;
- rozpuszczalnik organiczny oraz jego objętość: chloroform o objętości 55 μL ;
- rodzaj fazy akceptorowej oraz jej stężenie: kwas ortofosforowy(V) o stężeniu 0,004 mol/L;
- czas ekstrakcji z próbki do fazy organicznej (I etap): 2 min;
- czas ekstrakcji z fazy organicznej do kropli fazy akceptorowej (II etap): 15 min.

Po zakończeniu procesu ekstrakcji kroplę ekstraktu przeniesiono do inserta w celu odparowania do sucha roztworu wzbogaconej kropli i rozpuszczenia pozostałości w odpowiednio dobranym rozpuszczalniku, który stanowił roztwór wodny kwasu.

W wyniku optymalizacji warunków zażęzania techniką FASI określono dla niej poniższe parametry:

- rodzaj oraz stężenie kwasu użytego do rozpuszczania pozostałości po odparowaniu ekstraktu: 0,0004 mol/L H_3BO_3 ;
- napięcie wprowadzania próbki do kapilary: 5 kV;
- czas wprowadzania próbki do kapilary: 30 s;
- czas i ciśnienie podczas wprowadzania strefy wody przed strefą próbki: 10 mbar przez 10 s (co odpowiada objętości równej 12 nL);
- czas i ciśnienie podczas wprowadzania strefy wody za strefą próbki: 10 mbar przez 5 s (co odpowiada objętości równej 6 nL).

Podsumowanie i wnioski końcowe

Literatura naukowa wskazuje na szczególną rolę HTL w rozwoju chorób cywilizacyjnych oraz zawiera małą liczbę skutecznych metod pozwalających na potwierdzenie obecności i monitorowanie jego stężenia w organizmie człowieka. W związku z powyższym, przedmiotem badań podjętych w ramach prezentowanej rozprawy było sprawdzenie przydatności techniki CE z detekcją UV-Vis, w wykrywaniu i oznaczaniu HTL w próbce rzeczywistej o dużym skomplikowaniu matrycy. Praktycznym rezultatem moich badań jest opracowanie analitycznych procedur oznaczania HTL w moczu człowieka, który jest powszechnie wykorzystywanym w diagnostyce materiałem biologicznym. W badaniach wykorzystano technikę CE, która jest często stosowana w różnych gałęziach nauki i przemysłu. Dzisiejsza CE to nowoczesna technika analityczna pozwalająca na względnie szybkie oraz efektywne rozdzielanie cząstek, które znajdują się w próbce o bardzo małej objętości. CE charakteryzuje się ponadto wysoką selektywnością, dużą rozdzielczością oraz podatnością na miniaturyzację. Technika ta oprócz wymienionych powyżej zalet, posiada również pewne niedogodności. Niewątpliwie jej głównym ograniczeniem, porównując do chromatografii cieczowej, jest niska czułość stężeniowa w przypadku stosowania detektora spektrofotometrycznego UV-Vis. Dostępnych jest kilka rozwiązań tego problemu począwszy od aparaturowych, np. zastosowanie dużo czulszych detektorów (LIF, MS), wykorzystanie specjalnych kapilar, czy wyrafinowanych celek detekcyjnych, poprzez rozwiązania proceduralne na etapie przygotowania próbki, np. zastosowanie technik mikroekstrakcyjnych, czy też reakcji derywatyzacji, a skończywszy na zatężaniu (wzbogacaniu) analitów bezpośrednio w układzie analitycznym CE. Wykorzystanie czulszych detektorów co prawda pozwala na znaczące obniżenie granic wykrywalności i oznaczalności, ale jest jednak najczęściej związane z koniecznością przeprowadzenia kosztownych inwestycji aparaturowych. Rozszerzenie procedury przygotowania próbki o etap derywatyzacji niestety wydłuża czas analizy oraz może przyczynić się do pogorszenia precyzji oraz zdolności rozdzielczej CE. Dużym zainteresowaniem cieszy się natomiast wykorzystanie metod mikroekstrakcyjnych oraz zatężania analitów w kapilarze. W tych pierwszych, do niewątpliwych zalet zaliczyć można m.in. stosunkowo krótki czas procesu, niskie zużycie toksycznych rozpuszczalników, przydatność do analizy próbek o bardzo skomplikowanej matrycy, czy też możliwość automatyzacji i zastosowania wraz z innymi technikami analitycznymi. W przypadku zatężania analitów, manipulacja przewodnictwem próbki i/lub rodzajem BGE w celu skupienia analitu w bardzo wąskiej strefie, nie wymaga wprowadzenia żadnych modyfikacji w aparaturze, a sam proces ma miejsce we wnętrzu kapilary separacyjnej, co niweluje ryzyko straty analitu. Mając powyższe

na uwadze, w celu uproszczenia skomplikowanej matrycy próbki oraz polepszenia czułości CE, planując badania w ramach niniejszej rozprawy postanowiono wykorzystać jedną z najpopularniejszych technik mikroekstrakcyjnych, jaką jest mikroekstrakcja do pojedynczej kropli (SDME). Dodatkowo w badaniach zastosowano zateżenie analitu w kapilarze techniką spiętrzania podczas elektrokinetycznego wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola (FASI). Wy miernym rezultatem badań było opracowanie trzech nowych procedur analitycznych i ich praktyczne zastosowanie do oznaczania HTL w ludzkim moczu.

Opracowanie i optymalizacja warunków separacji elektroforetycznej

Pierwszym etapem badań było opracowanie oraz optymalizacja warunków separacji elektroforetycznej. Zbadano szereg czynników wpływających na jakość rozdzielania i czas analizy, m.in. długość i średnicę wewnętrzną kapilary, stężenie i pH elektrolitu podstawowego, napięcie podczas separacji, czy też temperaturę kapilary. Na podstawie otrzymanych wyników sporządzono odpowiednie zależności przedstawione na **rysunkach 35, 36, 38, 39, 40, 41 i 42** i wybrano najlepsze parametry. Zoptymalizowane warunki separacji zastosowano zarówno w metodzie wykorzystującej SDME, która była realizowana w układzie CE, jak i w metodach z ekstrakcją poza układem. Na otrzymanych elektroforegramach moczu człowieka (**rysunki 55 i 81**) można zauważyć dobrze wykształcony i całkowicie rozdzielony sygnał HTL, który pojawiał się, w zależności od zastosowanej procedury, pomiędzy 6 a 7 minutą analizy. Za pomocą opracowanych metod przeanalizowano wiele próbek moczu od różnych dawców i nie zauważono praktycznie żadnego wpływu matrycy próbki na otrzymywane wyniki analiz, w tym ich dokładność oraz precyzję.

Opracowanie procedury wykonania SDME

Drugi etap obejmował opracowanie procedury wykonania SDME i dobranie takich warunków procesu ekstrakcji, aby odpowiednio oczyścić matrycę próbki oraz uzyskać jak największy stopień zateżenia analitu. W toku prowadzonych badań zoptymalizowano dwa sposoby realizacji SDME, tj. poza układem elektroforetycznym (off-line) oraz bezpośrednio w aparacie do CE (on-line). Odpowiednie schematy wykonania obu procedur przedstawiono na **rysunkach 43 i 56**. Parametrami, które sprawdzono podczas optymalizacji procedur były: pH próbki (**rysunek 58**), sposób jej przygotowania (**rysunki 44 i 57**), dobór rodzaju oraz objętości rozpuszczalnika organicznego (**rysunki 47 i 59**), rodzaj oraz stężenie fazy akceptorowej (**rysunki 48, 49 i 60**) oraz czasy poszczególnych etapów ekstrakcji (**rysunki 51, 52, 61 i 62**). W przypadku procedury SDME realizowanej on-line napotkano na niespodziewane niedogodności

aparaturowe, uniemożliwiające regulację z poziomu oprogramowania aparatu, głębokości zanurzenia kapilary w warstwie organicznej i wytworzenia kropli fazy akceptorowej w odpowiednim jej miejscu. W celu regulacji zanurzenia kapilary, konieczne więc było dobranie właściwej objętości próbki w naczynku (**tabela 2**). Konieczne było również opracowanie i skuteczne zastosowanie sposobu pozwalającego na stabilizację kropli fazy akceptorowej na końcu kapilary lub igły, co miało bezpośredni wpływ na powtarzalność procesu ekstrakcji. W metodzie SDME-FASI-CZE po raz pierwszy w jednej elektroforetycznej procedurze zastosowanej do oznaczania HTL w moczu, wykorzystano jednocześnie dwie różne techniki załężania analitu. Najpierw przeprowadzono SDME poza układem pomiarowym CE, a następnie analit dodatkowo załężono w kapilarze techniką FASI.

Opracowanie procedury załężania analitu techniką FASI

Kolejny etap badań dotyczył doboru warunków wprowadzania próbki do kapilary, w celu jej dodatkowego załężenia wewnątrz układu elektroforezy kapilarnej. Postanowiono zastosować opracowane wcześniej warunki separacji, z wyjątkiem stężenia elektrolitu podstawowego, które zostało ponownie poddane optymalizacji (**rysunki 65, 66, 67 i 68**). Było to spowodowane potrzebą dostosowania BGE do techniki załężania za pomocą FASI, którą realizowano w kapilarze, bezpośrednio przed separacją elektroforetyczną. W trakcie stosowania warunków pomiarowych CZE opracowanych we wcześniejszych procedurach, dochodziło do gwałtownych spadków natężenia prądu, co prowadziło do przerwania analizy. Następnie sprawdzono rodzaj oraz stężenie kwasu użytego do przygotowania próbki (**rysunki 69, 70, 71 i 72**). Ważnymi parametrami w kontekście załężania analitu techniką FASI są czas (**rysunki 73 i 74**) oraz napięcie zastosowane podczas wprowadzenia próbki do kapilary (**rysunki 76 i 77**). W celu zwiększenia efektu załężania postanowiono także sprawdzić skuteczność wprowadzenia niewielkiej strefy wody przed oraz po strefie próbki. Takie postępowanie odniosło oczekiwany skutek, którego wymiernym efektem było uzyskanie około 8-krotnie większych sygnałów analitycznych, co przełożyło się na obniżenie granicy oznaczalności. Uzyskane wyniki przedstawiono na **rysunkach 77, 78, 79 i 80**.

Porównując opracowane metody pod względem uzyskanych współczynników wzmocnienia czułości można zauważyć, że najlepszy współczynnik uzyskano dla metody on-line SDME-CZE ($SEF_A = 340$), natomiast dużo niższy dla metody off-line SDME-CZE ($SEF_A = 100$). Zastosowanie w drugiej z tych procedur dodatkowego załężania analitu techniką FASI, pozwoliło uzyskać w metodzie off-line SDME-FASI-CZE współczynnik wzmocnienia czułości na poziomie $SEF_A = 212$.

Aplikacja opracowanych metod do oznaczania HTL w moczu człowieka

W czwartym etapie zastosowano opracowane metody do oznaczania HTL w moczu człowieka (**tabele 6 i 13**). Proponowana procedura oznaczania HTL w moczu człowieka z wykorzystaniem CE w połączeniu z realizowanym on-line SDME, jest pierwszym opublikowanym tego typu doniesieniem. Opracowane przez mnie elektroforetyczne metody oznaczania HTL, w porównaniu z dostępnymi w literaturze procedurami (**tabele 2, 5, 9 i 12**), charakteryzują się stosunkowo prostym przygotowaniem próbki, niskim kosztem i krótkim czasem analizy, znacznie zredukowanym zużyciem toksycznych odczynników chemicznych oraz względnie wysoką czułością stężeniową. Cechy te sprawiają, że metody mogą stanowić w przyszłości przydatne narzędzia analityczne w diagnostyce laboratoryjnej.

Ponieważ procedura przygotowania próbki jest bardzo prosta, a dodatkowo proces ekstrakcji jest zautomatyzowany, całkowity czas analizy dla metody on-line SDME-CZE (~21 min) był krótszy niż poprzednio podawany dla MEKC-FASI w moczu (~42 min) [102], HPLC-FLD w moczu (~96 min) [98], GC-MS w moczu (~120 min) [92], GC-MS w osoczu (~55 min) [91] i podobny do podawanego dla HPLC-FLD w osoczu (~24 min) [97] i dla LC-MS/MS w osoczu (~14 min) [99]. Całkowite czasy analizy dla metody off-line SDME-CZE (~29 min) i dla metody off-line SDME-FASI-CZE (~30 min) były krótsze niż w przypadku wcześniej zgłoszonych procedur dla MEKC-FASI w moczu (~42 min) [102], HPLC-FLD w moczu (~96 min) [98], GC-MS w moczu (~120 min) [93], GC-MS w ślinie (~60 min) [94] i GC-MS w osoczu (~55 min) [91], natomiast były one zbliżone do podawanych dla HPLC-FLD w osoczu (~24 min) [97] oraz dłuższe od podawanych dla LC-MS/MS w osoczu (~13,6 min) [99].

W literaturze niektóre z opisanych metod oznaczania HTL wymagają użycia kilku lub kilkadziesiąt mililitrów rozpuszczalników organicznych do procesu ekstrakcji. Moja metoda charakteryzuje się małym zużyciem odczynników chemicznych, a zwłaszcza toksycznych rozpuszczalników organicznych, co jest zgodne z filozofią zielonej chemii. Zużycie rozpuszczalników organicznych w naszej metodzie (on-line SDME-CZE) wynosi 60 μL (20 μL metanolu i 40 μL chloroformu), co jest znacznie mniejszą objętością niż podawana dla MEKC-FASI w moczu (LLE - 1,5 mL chloroformu) [102], GC-MS w osoczu (SPE - 2 mL acetonitrylu, ok. 6 mL metanolu i 2,2 mL heksanu) [91], HPLC-FLD w osoczu (LLE - 1 mL mieszaniny chloroformu i metanolu) [55], HPLC-FLD w moczu (SPE - 2 mL propanolu, 0,25 mL 70% roztworu acetonitrylu) [98] i HPLC-FLD w osoczu (LLE - 1 mL mieszaniny chloroformu i metanolu) [97] oraz podobne jak w metodzie GC-MS w moczu (0,3 mL chloroformu) [93].

W przeciwieństwie do innych metod, w celu identyfikacji HTL zastosowano prostą detekcję UV (znaną ze swojej stabilności i niewielkich wymagań w zakresie obsługi). Warto

podkreślić, że nie była potrzebna czasochłonna reakcja derywatywacji. Z drugiej strony, etap mikroekstrakcji nie jest w przypadku opracowanych metod ograniczeniem, ponieważ można przygotować duży zestaw próbek w tym samym czasie. Wykazano we wcześniejszych badaniach, że stężenie HTL w moczu jest ~100-krotnie wyższe niż w osoczu i wynosi od 0,01 do 0,5 $\mu\text{mol/L}$ [55, 98]. Granice oznaczalności osiągnięte w opracowanych w ramach tej dysertacji metodach (0,1 $\mu\text{mol/L}$ dla SDME-FASI-CZE oraz 0,05 $\mu\text{mol/L}$ dla on-line SDME-CZE) pozwalają zatem na oznaczanie HTL w moczu ludzi z podwyższonym i wysokim poziomem HTL. LOQ opracowanej przez mnie metody (on-line SDME-CZE) jest podobne do procedury HPLC-FLD [98] i GC-MS [93] dla oznaczania HTL w moczu (odpowiednio 0,02 i 0,01 $\mu\text{mol/L}$), niższe niż dla MEKC-FASI w moczu (0,1 $\mu\text{mol/L}$) [102] i LC-MS/MS w osoczu (0,5 $\mu\text{mol/L}$) [99], ale wyższe niż dla HPLC-FLD w osoczu (0,001 $\mu\text{mol/L}$) [97] czy GC-MS w osoczu (0,0052 $\mu\text{mol/L}$) [91].

Zastosowanie stosunkowo taniej aparatury jaką jest CE oraz niskie koszty analizy mogą umożliwić, zwłaszcza w krajach mniej rozwiniętych, rozszerzenie badań nad wpływem podwyższonego stężenia HTL w organizmie człowieka na rozwój chorób sercowo-naczyniowych.

Nowe metody analizy będące rezultatem badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej

Wykorzystanie techniki elektroforezy kapilarnej oraz mikroekstrakcji do pojedynczej kropli w celu polepszenia czułości stężeniowej CE, realizacja SDME w dwóch trybach, tj. w układzie pomiarowym CE oraz poza układem, połączenie techniki SDME i FASI, a także separacja elektroforetyczna z detekcją w zakresie nadfioletu, pozwoliły na opracowanie nowych, prostych i dokładnych metod oznaczania HTL w moczu człowieka:

1. Oznaczanie HTL w moczu człowieka za pomocą elektroforezy kapilarnej z wykorzystaniem mikroekstrakcji do pojedynczej kropli realizowanej poza układem pomiarowym CE

Główne etapy procedury to: rozcieńczenie moczu buforem fosforanowym o stężeniu 0,2 mol/L i pH = 8,2 (1:2, v/v), nałożenie warstwy chloroformu na powierzchnię próbki, przeprowadzenie ekstrakcji SDME, odparowanie do sucha przeniesionej do fiolki kropli ekstraktu i rozpuszczenie pozostałości, wprowadzenie próbki sposobem hydrodynamicznym: 50 mbar przez 20 s (~121 nL), separacja w kapilarze (średnica 75 μm , długość L = 64 cm, l = 55,5 cm, temperatura 23 °C, BGE: roztwór Na₂HPO₄/H₃PO₄ o stężeniu 0,1 mol/L i pH = 4,75, napięcie 21 kV) według mechanizmu CZE z detekcją przy analitycznej długości fali 240 nm i odczytanie wyniku z krzywej kalibracyjnej.

2. Oznaczanie HTL w moczu człowieka za pomocą elektroforezy kapilarnej z wykorzystaniem mikroekstrakcji do pojedynczej kropli realizowanej poza układem pomiarowym CE oraz wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego

Opracowana procedura analityczna składała się następujących etapów: rozcieńczenie moczu buforem fosforanowym o stężeniu 0,2 mol/L i pH = 8,2 (1:2, v/v), nałożenie warstwy chloroformu na powierzchnię próbki, przeprowadzenie ekstrakcji SDME, odparowanie do sucha przeniesionej do fiolki kropli ekstraktu i rozpuszczenie pozostałości, wprowadzenie sposobem hydrodynamicznym małej strefy H₂O przed i za strefą próbki, wprowadzenie próbki do kapilary sposobem elektrokinetycznym: 5 kV przez 30 s, separacja w kapilarze (średnica 75 μm , długość L = 64 cm, l = 55,5 cm, temperatura 23 °C, BGE: mieszanina 0,06 mol/L roztworu Na₂HPO₄ i 1 mol/L roztworu H₃PO₄, pH = 4,75, napięcie 21 kV) według mechanizmu CZE z detekcją przy analitycznej długości fali 240 nm i odczytanie wyniku z krzywej kalibracyjnej.

3. Oznaczanie HTL w moczu człowieka za pomocą elektroforezy kapilarnej z wykorzystaniem mikroekstrakcji do pojedynczej kropli realizowanej w układzie pomiarowym CE

Procedura składała się z następujących czynności: rozcieńczenie moczu buforem fosforanowym o stężeniu 0,2 mol/L i pH = 8,2 (1:1, v/v), dodanie metanolu do mieszaniny, nałożenie warstwy chloroformu na powierzchnię próbki, przeprowadzenie ekstrakcji SDME w układzie pomiarowym CE, wprowadzenie kropli ekstraktu do kapilary sposobem hydrodynamicznym: 8 mbar przez 8 s (~8 nL), separacja w kapilarze (średnica 75 μm , długość $L = 64$ cm, $l = 55,5$ cm, temperatura 23 $^{\circ}\text{C}$, BGE: roztwór $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ o stężeniu 0,1 mol/L i pH = 4,75, napięcie 21 kV) według mechanizmu CZE z detekcją przy analitycznej długości fali 240 nm i odczytanie wyniku z krzywej kalibracyjnej.

Wnioski

W oparciu o otrzymane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wyniki eksperymentów wyszczególniono następujące wnioski:

1. Mikroekstrakcja do pojedynczej kropli (SDME) jest stosunkowo prostą i tanią techniką, która może z powodzeniem zostać zastosowana do wydzielenia i zateżenia tiolaktonu homocysteiny (HTL) w moczu człowieka,
2. SDME może być zrealizowana albo w sposób ręczny poza układem elektroforetycznym, albo w sposób automatyczny w kapilarze bezpośrednio przed separacją,
3. Dzięki automatyzacji procedury SDME w układzie pomiarowym CE, znacznie ograniczono ilość etapów przygotowania próbki do analizy realizowanych bezpośrednio przez eksperymentatora, co przełożyło się na uzyskanie większej precyzji wyników analiz,
4. W jednej z opracowanych procedur wykorzystano zateżanie HTL w sposób automatyczny, wewnątrz urządzenia do CE, bez konieczności jakiegokolwiek modyfikacji posiadanej aparatury. Zastosowano zateżanie analitu w kapilarze techniką spiętrzania podczas elektrokinetycznego wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola (FASI),
5. Zastosowanie SDME oraz FASI w opracowanych metodach oznaczania HTL w moczu, pozwoliło na duże zwiększenie czułości CE wyrażone współczynnikami wzmocnienia (SEF_A) wynoszącymi dla metody on-line SDME-CZE ($SEF_A=340$), dla metody off-line SDME-CZE ($SEF_A=100$) oraz dla metody off-line SDME-FASI-CZE ($SEF_A=212$),
6. W elektroforetycznym oznaczaniu HTL w moczu człowieka z wykorzystaniem detekcji UV-Vis, po zastosowaniu SDME w trybie on-line lub SDME w trybie off-line wraz z FASI, nie jest konieczne stosowanie czasochłonnej derywatywacji analitu,
7. Istotną zaletą opisywanych procedur jest ich niski koszt i niewielkie zużycie toksycznych odczynników, co czyni je ekonomicznymi jak również przyjaznymi dla środowiska,
8. Opracowane i opublikowane procedury oznaczania HTL w moczu człowieka są pierwszymi, które bazują na wykorzystaniu SDME oraz CE. Pomimo swoich ograniczeń mogą stanowić realną alternatywę dla metod wykorzystujących techniki HPLC oraz GC,
9. Wypracowane na podstawie badań procedury analityczne oznaczania HTL, z uwagi na dużą precyzję i dokładność, mogą być stosowane do rutynowej analizy moczu. Umiarkowana czułość opracowanych metod może, w niektórych przypadkach, nie pozwolić na określenie zawartości HTL w moczu u osób z jego poziomem poniżej $0,05 \mu\text{mol/L}$.

Streszczenie

Trwające do dziś badania nad zaburzeniami metabolizmu tiolaktonu homocysteiny (HTL) wskazują, że obecność HTL w organizmie człowieka w dużych stężeniach może sygnalizować wysokie ryzyko wystąpienia chorób układu krążenia oraz nerwowego. Wysoka ilość HTL w organizmie człowieka może mieć kilka przyczyn. Pierwszą z nich jest genetycznie uwarunkowany niedobór enzymów mających zdolność metabolizowania prekursora HTL, którym jest homocysteina. Kolejnymi przyczynami są prowadzenie nieodpowiedniego stylu życia oraz błędy w żywieniu poprzez niedostateczne dostarczanie odpowiednich witamin do organizmu.

Głównym materiałem diagnostycznym, wykorzystywanym do śledzenia zawartości HTL w organizmie człowieka jest moczu. W moczu stężenie tego związku może wahać się od 10 - 500 nmol/L, dlatego ważne jest, aby opracowywać metody analityczne zdolne do badania poziomu tego związku w szerokim zakresie. Większość znanych procedur wykorzystuje techniki chromatograficzne, często w połączeniu z wyrafinowanymi sposobami detekcji. W literaturze opisana jest tylko jedna metoda, która wykorzystuje technikę elektroforezy kapilarnej (CE) do oznaczania HTL w moczu. Małe zainteresowanie techniką CE wynika zapewne z niskiej czułości stężeniowej w przypadku detekcji UV-Vis. W celu polepszenia czułości przeprowadza się zatężanie analitu technikami elektroforetycznymi realizowanymi w układzie pomiarowym CE lub wykorzystuje techniki mikroekstrakcyjne, w tym mikroekstrakcję do pojedynczej kropli (SDME). Wyróżnia się ona dużą wydajnością i stosunkowo prostym wykonaniem, jest łatwa w automatyzacji oraz charakteryzuje się wysokim współczynnikiem wzbogacenia.

Rozprawa doktorska podzielona została na dwie części, zatytułowane: część teoretyczna oraz część eksperymentalna. Część teoretyczna składa się z czterech rozdziałów i przygotowano ją na podstawie przeglądu najnowszej literatury.

W rozdziale pierwszym opisano chemię i biochemię homocysteiny (Hcy), która jest bezpośrednim substratem syntezy HTL. Przedstawiono szlak metaboliczny powstawania Hcy oraz jej wpływ na organizm człowieka. Opisano sposób w jaki z Hcy powstaje HTL, skierowano również uwagę na negatywny wpływ HTL na organizm człowieka.

Drugi rozdział dotyczy dostępnych w literaturze metod oznaczania HTL w różnych rodzajach próbek. Opis tych metod przeprowadzono skupiając się na sposobie przygotowania próbki do analizy oraz zastosowanych warunkach pomiarowych. Wyszczególniono również parametry walidacyjne, którymi charakteryzowała się dana procedura analityczna.

Rozdział trzeci obejmuje teorię oraz praktykę techniki CE. Uwagę poświęcono również sposobom polepszania czułości stężeniowej CE, z uwzględnieniem derywatywacji chemicznej,

technologii budowy specjalistycznych kapilar oraz sposobów zatężania analitu bezpośrednio w kapilarze.

Rozdział czwarty został poświęcony technice ekstrakcji, która jest powszechnie stosowana na etapie przygotowania próbki do analizy. Przedstawiono podstawy teoretyczne i sposób wykonania klasycznej ekstrakcji, a w dalszej części rozdziału sposób wykonania ekstrakcji w skali mikro. Szczególną uwagę poświęcono mikroekstrakcji do fazy ciekłej, którą scharakteryzowano i opisano praktyczną stronę niektórych odmian tej techniki.

Część eksperymentalną podzielono na 5 rozdziałów, w których szczegółowo opisano etapy opracowywania i optymalizacji zaprezentowanych procedur oznaczania HTL w moczu człowieka.

W rozdziale pierwszym w sposób bardzo zwięzły opisano wyznaczenie analitycznej długości fali wykorzystywanego do eksperymentów detektora spektrofotometrycznego.

Rozdział drugi obejmuje opis parametrów walidacyjnych jakie wyznaczano podczas opracowania metod oraz opis kryteriów akceptacji jakimi kierowano się przy ocenie tych parametrów.

W trzecim rozdziale przedstawiono opracowanie metody oznaczania HTL w moczu z wykorzystaniem techniki CE oraz SDME realizowanej w układzie pomiarowym CE. Opisano dobór warunków elektroforetycznych, skupiono się również na optymalizacji parametrów procedury SDME. Przeprowadzono walidację metody wykorzystując zoptymalizowane warunki elektroforetyczne i mikroekstrakcji oraz zastosowano procedurę do oznaczania HTL w moczu.

Rozdział czwarty obejmuje opis opracowania metody oznaczania HTL w moczu człowieka za pomocą CE z wykorzystaniem SDME realizowanej poza układem pomiarowym CE. W tym rozdziale przedstawiono sposób optymalizacji parametrów ekstrakcji SDME. Po zakończeniu etapu optymalizacji metodę poddano walidacji zgodnie z wytycznymi dla analizy próbek biologicznych.

W piątym rozdziale opisano optymalizację metody oznaczania HTL, w której w celu zatężania analitu wykorzystano SDME oraz zatężanie poprzez wprowadzanie próbki ze wzmocnieniem pola (FASI). Procedurę ekstrakcji, z pewnymi modyfikacjami, zaimplementowano z metody opisanej w rozdziale czwartym, przeprowadzono dobór warunków elektroforetycznych i skupiono się na optymalizacji parametrów techniki FASI. Przeprowadzono walidację metody oraz zastosowano ją do oznaczania HTL w moczu.

Praca zawiera ponadto wykaz skrótów, używanych odczynników i aparatury oraz cytowanej literatury.

Summary

The ongoing studies on disorders of homocysteine thiolactone (HTL) metabolism indicate that the presence of HTL in the human body in high concentrations may signal a high risk of cardiovascular and nervous system diseases. The high amounts of HTL in the human body may have several causes. The first reason is a genetically determined deficiency of enzymes that have the ability to metabolize the precursor of the HTL, which is homocysteine (Hcy). Further reasons are inappropriate lifestyle and nutritional errors through insufficient supplementation of adequate vitamins to the body.

The main diagnostic material utilized to test the HTL content in the human body is urine. In urine, concentrations of this compound can range from 10 - 500 nmol/L. Therefore, it is important to develop analytical methods capable of testing levels of this compound over a wide range. Most known procedures use chromatographic techniques, often in combination with sophisticated detection methods. Only one method is described in the literature, which uses capillary electrophoresis (CE) technique to determine HTL in urine. The low interest in this technique is probably due to the low concentration sensitivity for UV-Vis detection. In order to improve sensitivity, analyte concentration is carried out by electrophoretic techniques implemented in the CE measurement system or microextraction techniques, including single drop microextraction (SDME). SDME is characterized by high efficiency of the extraction process and relatively simple execution, is easy to automate and has a high enrichment factor.

The dissertation is divided into two parts, entitled: the theoretical part and the experimental part. The theoretical part consists of four chapters and was prepared on the basis of a review of recent literature.

Chapter one describes the chemistry and biochemistry of Hcy, which is the direct substrate for HTL synthesis. The metabolic pathway of Hcy formation and its effect on the human organism are presented. The way how HTL is formed from Hcy is also described, and attention is also directed to the negative effects of HTL on the human organism.

The second chapter deals with the methods available in the literature for the determination of HTL in different types of samples. The description of these methods was carried out focusing on how the sample was prepared for analysis and what measurement conditions were used. The validation parameters with which the analytical procedure was characterized are also listed.

The third chapter covers the theory and practice of CE technique. Attention is also given to ways of improving the concentration sensitivity of CE, including chemical derivatization,

specialized capillaries construction technology, and techniques of analyte concentration directly in the capillary.

The fourth chapter was devoted to the extraction technique that is commonly used in the step of sample preparation for analysis. The theoretical basis and method of conducting of classical extraction are presented. In the rest of the chapter, how to perform microextraction is presented. Particular attention is given to liquid phase microextraction which is characterized and the practicalities of some variations of this technique are described.

The experimental part is divided into 5 chapters which detail the development and optimization steps of the presented procedures for the determination of HTL in human urine.

Chapter one describes very briefly the determination of analytical wavelength of the spectrophotometric detector used for the experiments.

The second chapter includes a description of the validation parameters that were determined during the development of the methods and the acceptance criteria used to assess these parameters.

The third chapter describes the development of a method for the determination of HTL in urine with the use of the CZE technique and SDME realized in a CE measuring system. It describes the selection of electrophoretic conditions and focuses on the optimization of parameters for the SDME procedure. Validation of the method using optimized electrophoretic and microextraction conditions was carried out. The procedure was applied for the determination of HTL in urine.

Chapter four covers the description of the development of a method for the determination of HTL in human urine by CZE using SDME realized outside the CE measurement system. This chapter presents how the SDME extraction parameters were optimised. After the optimisation step, the method was validated according to the guidelines for the analysis of biological samples.

The fifth chapter describes the optimization of the HTL determination method, which used SDME and field amplified sample injection (FASI) to concentrate the analyte. The extraction procedure, with some modifications, was implemented from the method described in chapter four, the selection of electrophoretic conditions was carried out and the focus was on optimizing the parameters of the FASI technique. Validation of the method was performed and the procedure was applied to the determination of HTL in urine.

The work also contains a list of abbreviations, reagents and apparatus used, and literature cited.

Abstract

Clinical trials clearly indicate a cause-and-effect relationship between metabolism disorders of sulfur compounds, such as homocysteine (Hcy), and progression of cancer, neurodegenerative and cardiovascular diseases. The presence of Hcy in the human organism in high levels can indicate a high risk of disease. Homocysteine thiolactone (HTL) is metabolically linked to Hcy and is formed by so-called error-editing reaction due to the capture of Hcy instead of methionine by methionyl-tRNA synthetase. HTL has a negative impact on human health, due to its high reactivity it forms isopeptide bonds with the amino groups of lysine in a process called *N*-homocysteinylation. In humans with a properly functioning excretory system, most of the toxic HTL is excreted with urine. Therefore, urine is the most commonly used matrix for HTL determination.

Taking into account above mentioned reasons, the main aim of the study was to develop new analytical methods for the determination of HTL in human urine using efficient and cheap tools. As a result of the research, three new methods were developed, that are based on a combination of two techniques, i.e. capillary electrophoresis (CE) and single drop microextraction (SDME). The CE is characterized by high resolution and separation efficiency, as well as very short analysis time and low sample and chemicals consumption. However, CE has one significant drawback, i.e. low concentration sensitivity. To improve CE sensitivity, SDME technique was utilized. SDME is a powerful tool characterized by several advantages that are crucial for CE determinations. It allows sample cleanup, significantly reduces the use of toxic organic solvents, the extraction process can also be easily automated and, most importantly, it has a high enrichment factor. During the experiments, the main focus was on three aspects: the selection of sample preparation conditions prior to the SDME procedure, the selection of optimal SDME conditions to obtain the highest yield, and the use of a method that allows drop stabilization, which has a direct impact on the repeatability of the extraction process. Owing to the automation of the SDME procedure in CE system, the number of steps in the procedure performed directly by the experimenter is reduced. It is also possible to combine in one procedure two techniques to improve CE concentration sensitivity, i.e. SDME in off-line mode and sample stacking by field amplified sample injection.

Elaborated procedures are characterized by a simple sample preparation by SDME extraction followed by CE analysis. Each of developed methodologies is characterized by satisfactory validation parameters, such as linearity, precision, accuracy and limit of quantification. These methods can be used in the future as analytical tools to help find evidence to support thesis of an association between elevated HTL levels and cardiovascular diseases. To the best of my

knowledge, the developed procedures for HTL determination in human urine are the first that are based on the usage of SDME and CE.

Literatura

- [1] H. Jakubowski, *Homocysteine in Protein Structure-Function and Human Disease Chemical Biology of Homocysteine containing Proteins*, wyd. 1, Springer Vienna, 2013.
- [2] J.H. Mueller, *A new sulfur-containing amino acid isolated from the hydrolytic products of protein*. Journal of Biological Chemistry, 1923, 58, 157-169.
- [3] L.W. Butz, V. du Vigneaud, *The formation of homologue of cysteine by the decomposition of methionine with sulfuric acid*, Journal of Biological Chemistry, 1932, 99, 135-142.
- [4] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/778> (lipiec 2020 r.).
- [5] J.D. Finkelstein, *Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals*, Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 2000, 26, 219-225.
- [6] J.A. Duerre, *In vivo and in vitro metabolism of S-adenosyl-l-Homocysteine by Saccharomyces cerevisiae*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 1968, 124, 422-430.
- [7] V.K.Ch. Ponnaluri, P.-O. Estève, C.I. Ruse, S. Pradhan, *S-adenosylhomocysteine Hydrolase Participates in DNA Methylation Inheritance*, Journal of Molecular Biology, 2018, 430, 2051-2065.
- [8] J.T. Brosnan, R.L. Jacobs, L.M. Stead, M.E. Brosnan, *Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism*, Acta Biochimica Polonica, 2004, 51, 405-413.
- [9] Y.W. Teng, M.G. Mehedint, T.A Garrow, S.H. Zeisel, *Deletion of betaine-homocysteine S-methyltransferase in mice perturbs choline and 1-carbon metabolism, resulting in fatty liver and hepatocellular carcinomas*. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286, 36258-3667.
- [10] H. Jakubowski, *Proofreading in vivo: editing of homocysteine by methionyl-tRNA synthetase in Escherichia coli*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87, 4504-4508.
- [11] H. Jakubowski, E. Goldman, *Synthesis of homocysteine thiolactone by methionyl-tRNA synthetase in cultured mammalian cells*, FEBS Letters, 1993, 317, 593-598.
- [12] H. Jakubowski, A. Fersht, *Alternative pathways of rejection of noncognate amino acids by aminoacyl-tRNA synthetases*, Nucleic Acids Research, 1981, 9, 3105-3117.
- [13] G. Chwatko, G.H. Boers, K.A. Strauss, D.M. Shih, H. Jakubowski, *Mutations in methylenetetrahydrofolate reductase or cystathionine β -synthase gene, or a high-methionine diet, increase homocysteine thiolactone levels in humans and mice*, FASEB Journal, 2007, 21, 1707-1713.
- [14] R. Clarke, S. Lewington, P. Sherliker, J. Armitage, *Effects of B-vitamins on Plasma Homocysteine Concentrations and on Risk of Cardiovascular Disease and Dementia*, Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 2007, 10, 32-39.
- [15] B.A. Maron, J. Loscalzo, *The Treatment of Hyperhomocysteinemia*, Annual Review of Medicine, 2009, 60, 39-54.
- [16] J. Zimny, M. Sikora, A. Guranowski, H. Jakubowski, *Protective mechanisms against homocysteine toxicity: the role of bleomycin hydrolase*, Journal of Biological Chemistry 2006, 281, 22485-22492.

- [17] H. Jakubowski, *Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation*. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275, 3957-3962.
- [18] M. Kędzińska, R. Głowacki, U. Czernek, K. Szydłowska-Pazera, P. Potemski, J. Piekarski, A. Jeziorski, B. Olas, *Changes in plasma thiol levels induced by different phases of treatment in breast cancer; the role of commercial extract from black chokeberry*, Molecular and Cellular Biochemistry, 2013, 372, 47-55.
- [19] A. Zinellu, S. Sotgia, G. Loriga, L. Deiana, A.E. Satta, C. Carru, *Oxidative stress improvement is associated with increased levels of taurine in CKD patients undergoing lipid-lowering therapy*, Amino Acids, 2012, 43, 1499-1507.
- [20] J.M. Visy, P. Le Coz, B. Chadeaux, C. Fressinaud, F. Woimant, J. Marquet, J. Zittoun, J. Visy, J.M. Vallat, M. Haguenu, *Homocystinuria due to 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency related by stroke in adult siblings*, Neurology, 1991, 41, 1313-1315.
- [21] M. Coppola, R. Mondola, *Correlation between plasma homocysteine levels and craving in alcohol dependent stabilized patients*, Clinical Nutrition, 2018, 37, 1061-1065.
- [22] S. Chen, P. Wu, L. Zhou, Y. Shen, Y. Li, H. Song, *Relationship between increase of serum homocysteine caused by smoking and oxidative damage in elderly patients with cardiovascular disease*, International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2015, 8, 4446-4454.
- [23] A.M. Miranda, J. Steluti, R.M. Fisberg, D.M. Marchioni, *Association between Coffee Consumption and Its Polyphenols with Cardiovascular Risk Factors: A Population-Based Study*, Nutrients, 2017, 9, 1-15.
- [24] J.J. Strain, L. Dowey, M. Ward, K. Pentieva, H. McNulty, *B-vitamins, homocysteine metabolism and CVD*, Proceedings of the Nutrition Society, 2004, 63, 597-603.
- [25] I.E. Futschek, E. Schernhammer, H. Haslacher, E. Stogmann, J. Lehrner, *Homocysteine – A predictor for five year-mortality in patients with subjective cognitive decline, mild cognitive impairment and Alzheimer's dementia*, Experimental Gerontology, 2023, 172, 112045.
- [26] V.P. Nguyen, A.E. Collins, J.P. Hickey, J.A. Pfeifer, B.E. Kalisch, *Sex Differences in the Level of Homocysteine in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease Patients: A Meta-Analysis*, Brain Sciences, 2023, 13, 153.
- [27] J. Li, J. Zhang, Y. Chen, L. Gao, X. Yan, M. Zhang, F. Wang, Y. He, W. Hu, H. Peng, *Mean platelet volume modifies the contribution of homocysteine to cardiovascular disease: A real-world study*, Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases, 2023, 33, 194-202.
- [28] R. Muzaffar, M.A. Khan, M.H. Mushtaq, M. Nasir, A. Khan, I. ul Haq, J. Muhammad, *Hyperhomocysteinemia as an independent risk factor for coronary heart disease. Comparison with conventional risk factors*, Brazilian Journal of Biology, 2023, 83, e249104.
- [29] S.S. Kang, P.W. Wong, M.R. Malinow, *Hyperhomocysteinemia as a risk factor for occlusive vascular disease*, Annual Review of Nutrition, 1992, 12, 279-298.
- [30] K.M. Varela Almanza, A.M. Puebla-Pérez, J.I. Delgado-Saucedo, F. Rodríguez-Arévalo, G.M. Zúñiga-González, L.E. Figuera, A. Morán-Mendoza, M.P. Gallegos-Arreola, *Increased*

homocysteine plasma levels in breast cancer patients of a Mexican population, *Experimental Oncology*, 2018, 40, 114-118.

[31] J.W. Miller, S.A.A. Beresford, M.L. Neuhouser, T.-Y.D. Cheng, X. Song, E.C. Brown, Y. Zheng, B. Rodriguez, R. Green, C.M. Ulrich, *Homocysteine, cysteine, and risk of incident colorectal cancer in the Women's Health Initiative observational cohort*, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2013, 97, 827-834.

[32] F.-F. Chiang, S.-C. Huang, H.-M. Wang, F.-P. Chen, Y.-C. Huang, *High serum folate might have a potential dual effect on risk of colorectal cancer*, *Clinical Nutrition*, 2015, 34, 986-990.

[33] C.J. Boushey, S.A. Beresford, G.S. Omenn, A.G. Motulsky, *A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes*, *JAMA*, 1995, 74, 1049-1057.

[34] Homocysteine Studies Collaboration, *Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke; a meta-analysis*, *JAMA*, 2002, 288, 2015-2022.

[35] I. Chernyavskiy, S. Veeranki, U. Sen, S.C. Tyagi, *Atherogenesis: hyperhomocysteinemia interactions with LDL, macrophage function, paraoxonase 1, and exercise*, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2016, 1363, 2016, 138-154.

[36] M. Cattaneo, *Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis*, *Thrombosis and Haemostasis*, 1999, 81, 165-176.

[37] A.R. Nelson, M.D. Sweeney, A.P. Sagare, B.V. Zlokovic, *Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2016, 1862, 887-900.

[38] S. Tomic, V. Pekic, Z. Popijac, T. Pucic, M. Petek Vinkovic, T. Gilman Kuric, Z. Popovic, *Hyperhomocysteinemia influenced malnutrition in Parkinson's disease patients*, *Neurological Sciences*, 2018, 39, 1691-1695.

[39] R.J. Havlik, M. Feinleib, *Proceedings of the Conference on the Decline in Coronary Heart Disease Mortality*, U. S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health, 1979, 79-1610.

[40] H.A. Schroeder, *Losses of vitamins and trace minerals resulting from processing and preservation of foods*, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1971, 24, 562-573.

[41] J. Selhub, P.F. Jacques, P.W.F. Wilson, D. Rush, I.H. Rosenberg, *Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population*, *Journal of the American Medical Association*, 1993, 270, 2693-2698.

[42] K.S. McCully, *Homocysteine theory of arteriosclerosis: development and current status*, w: A.M. Gotto Jr, R. Paoletti (ed.), *Atherosclerosis Reviews*, wyd. 11, Nowy Jork, Raven Press, 1983, 157-246.

[43] P.F. Jacques, J. Selhub, A.G. Bostom, P.W.F. Wilson, I.H. Rosenberg, *The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations*, *New England Journal of Medicine*, 1990, 340, 1449-1454.

- [44] H. Refsum, A.D. Smith, P.M. Ueland, E. Nexø, R. Clarke, J. McPartlin, C. Johnston, F. Engbaek, J. Schneede, C. McPartlin, J.M. Scott, *Facts and recommendations about total homocysteine determinations: An expert opinion*, *Clinical Chemistry*, 2004, 50, 3-32.
- [45] K.S. McCully, *Homocysteine, vitamins, and vascular disease prevention*, *American Journal of Clinical Nutrition*, 2007, 86, 1563S-1568S.
- [46] Q. Yang, J.M. Friedman, L.D. Botto, *Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1990 to 2002*, *Circulation*, 2006, 113, 1335-1343.
- [47] S.H. Mudd, F. Skovby, H.L. Levy, K.D. Pettigrew, B. Wilcken, R.E. Pyeritz, G. Andria, G.H.J. Boers, I.L. Brombert, R. Cerone, B. Fowler, H. Grobe, H. Schmidt, L. Schweitzer, *The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta synthase deficiency*, *American Journal of Human Genetics*, 1985, 37, 1-31.
- [48] D.W. Jacobsen, *Practical chemistry of homocysteine and other thiols*, w: R. Carmel, D.W. Jacobsen (ed.), *Homocysteine in Health and Disease*, Cambridge UK: Cambridge University Press, 2001, 9-20.
- [49] R. Głowacki, E. Bald, H. Jakubowski, *Identification and origin of N ϵ -homocysteinyl-lysine isopeptide in humans and mice*, *Amino Acids*, 2010, 39, 1563-1569.
- [50] H. Jakubowski, *Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels*, *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272, 1935-1942.
- [51] B. Riegel, V DuVigneaud, *The isolation of homocysteine and its conversion to a thiolactone*, *Journal of Biological Chemistry*, 1935, 222, 149-154.
- [52] E. Spindel, K.S. McCully, *Conversion of methionine to homocysteine thiolactone in liver*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1974, 343, 687-691.
- [53] V. DuVigneaud, W.I. Patterson, M. Hunt, *Opening of the ring of the thiolactone of homocysteine*, *Journal of Biological Chemistry*, 1938, 126, 217-231.
- [54] K.S. McCully, M.P. Vezeridis, *Chemopreventive and antineoplastic activity of N-homocysteine thiolactonyl retinamide*, *Carcinogenesis* 1987, 8, 1559-1562.
- [55] G. Chwatko, H. Jakubowski, *Urinary excretion of homocysteine-thiolactone in humans*, *Clinical Chemistry*, 2005, 51, 408-415.
- [56] K.S. McCully, M.P. Vezeridis, *Histopathological effects of homocysteine thiolactone on epithelial and stromal tissues*, *Experimental and Molecular Pathology*, 1989, 51, 159-170.
- [57] K.S. McCully, A.C.A Carvalho, *Homocysteine thiolactone, N-homocysteine thiolactonyl retinamide and platelet aggregation*, *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 1987, 56, 349-360.
- [58] R. Benesch, R.E. Benesch, *Thiolation of proteins*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1958, 44, 848-853.
- [59] M. Vidal, J. Sainte-Marie, J. Philippot, A. Bienvenue, *Thiolation of lipoproteins and their interaction with L2C leukemic lymphocytes*, *Biochimie*, 1986, 68, 723-730.

- [60] M. Naruszewicz, E. Mirkiewicz, A.J. Olszewski, K.S. McCully, *Thiolation of low density lipoprotein by homocysteine thiolactone causes increased aggregation and interaction with cultured macrophages*, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 1994, 4, 70-79.
- [61] G.K. Hansson, *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*, *New England Journal of Medicine*, 2005, 352, 1685-1695.
- [62] K.S. McCully, *Vascular pathology of homocysteinemia: Implications for the pathogenesis of arteriosclerosis*, *American Journal of Pathology*, 1969, 56, 111-128.
- [63] K.S. McCully, R.B. Wilson, *Homocysteine theory of arteriosclerosis*, *Atherosclerosis*, 1975, 22, 215-227.
- [64] P.M. Ueland, H. Refsum, *Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy*, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1989, 224, 473-501.
- [65] K.S. McCully, *Micronutrients, homocysteine metabolism and atherosclerosis*, w: A. Bendich, C.E. Butterworth Jr (ed.), *Micronutrients in Health and in Disease Prevention*, wyd. 1, Dekker, 1991, 69-93.
- [66] M.J. Stampfer, M.R. Malinow, W.C. Willett, L.M. Newcomer, B. Upson, D. Ullman, P.V. Tishler, C.H. Hennekens, *A prospective study of plasma homocysteine and risk of myocardial infarction in US physicians*, *Journal of the American Medical Association*, 1992, 268, 877-881.
- [67] J.J. Genest, J.R. McNamara, D.N. Salem, P.W.F. Wilson, E.J. Schaefer, M.R. Malinow, *Plasma homocysteine levels in men with premature coronary artery disease*, *Journal of the American College of Cardiology*, 1990, 16, 1114-1119.
- [68] V.A. DuVigneaud, *A Trail of Research in Sulfur Chemistry and Metabolism*, wyd. 1, Cornell University Press, 1952, 112-115.
- [69] N.A.J. Carson, D.W. Neill, *Metabolic abnormalities in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland*, *Archives of Disease in Childhood*, 1962, 37, 505-513.
- [70] S.H. Mudd, J.D. Finkelstein, F. Irreverre, L. Laster, *Homocystinuria: An enzymatic defect*, *Science*, 1964, 143, 1443-1445.
- [71] S.H. Mudd, H.L. Levy, R.H. Abeles, *A derangement in B12 metabolism leading to homocystinemia, cystathioninemia and methyl-malonic aciduria*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1969, 35, 121-126.
- [72] S.H. Mudd, B.W. Uhlendorf, J.M. Freeman, J.D. Finkelstein, V.E. Shih, *Homocystinuria associated with decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1972, 46, 905-912.
- [73] Y.S. Kanwar, J.R. Manaligod, P.W.K. Wong, *Morphologic studies in a patient with homocystinuria due to 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency*, *Pediatric Research*, 1976, 10, 598-609.
- [74] B.C. Halpern, B.R. Clark, D.N. Hardy, R.A. Smith, *The effect of replacement of methionine by homocystine on survival of malignant and normal adult mammalian cells in culture*,

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1974, 71, 1133-1136.

[75] K.S. McCully, *Homocysteine thiolactone metabolism in malignant cells*, Cancer Research, 1976, 36, 3198-3202.

[76] K.S. McCully, M.P. Vezeridis, *Homocysteine thiolactone in arteriosclerosis and cancer*, Research communications in chemical pathology and pharmacology, 1988, 59, 107-119.

[77] D.F.H. Wallach, *Generalized membrane defects in cancer*, New England Journal of Medicine, 1969, 280, 761-767.

[78] N.A. Carson, C.E. Dent, C.M. Field, G.E. Gaull, *Homocystinuria: clinical and pathological review of ten cases*, Journal of Pediatrics, 1965, 66, 565-583.

[79] J.M. Freeman, J.D. Finkelstein, S.H. Mudd, *Folate-responsive homocystinuria and "schizophrenia". A defect in methylation due to deficient 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity*, New England Journal of Medicine, 1975, 292, 491-496.

[80] D.K. Rassin, R.C. Longhi, G.E. Gaull, *Free amino acids in liver of patients with homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency: effects of vitamin B6*, Journal of Pediatrics, 1977, 91, 574-577.

[81] H. Jakubowski, *Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels*, FASEB Journal, 1999, 13, 2277-2283.

[82] H. Jakubowski, *Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans*, Journal of Nutrition, 2000, 130, 377-381.

[83] H. Jakubowski, *Biosynthesis and reactions of homocysteine thiolactone*, w: D.W. Jacobson, R. Carmel (ed.), *Homocysteine in health and disease, Homocysteine in health and disease*, wyd.1, Cambridge University Press, 2001, 21-31.

[84] G. Ferretti, T. Bacchetti, C. Moroni, A. Vignini, L. Nanetti, G. Curatola, *Effect of homocysteinylation of low density lipoproteins on lipid peroxidation of human endothelial cells*, Journal of Cellular Biochemistry, 2004, 92, 351-360.

[85] P. Paoli, F. Sbrana, B. Tiribilli, A. Caselli, B. Pantera, P. Cirri, *Protein N-homocysteinylation induces the formation of toxic amyloid-like protofibrils*, Journal of Molecular Biology, 2010, 400, 889-907.

[86] K. Borowczyk, J. Piechocka, R. Głowacki, I. Dhar, Ø. Midtun, G.S. Tell, P.M. Ueland, O. Nygård, H. Jakubowski, *Urinary excretion of homocysteine thiolactone and the risk of acute myocardial infarction in coronary artery disease patients: the WENBIT trial*, Journal of Internal Medicine, 2019, 285, 232-244.

[87] J.S. Stamler, J. Loscalzo, *Capillary zone electrophoretic detection of biological thiols and their S-nitrosated derivatives*, Analytical Chemistry, 1992, 64, 779-785.

[88] E. Jellum, V.A. Bacon, W. Patton, W. Pereira, B. Halpern, *Quantitative determination of biologically important thiols and disulfides by gas-liquid chromatography*, Analytical Biochemistry, 1969, 31, 339-347.

[89] H. Jakubowski, *Proofreading in vivo: editing of homocysteine by methionyl-tRNA synthetase in the yeast Saccharomyces cerevisiae*, EMBO Journal, 1991, 10, 593-598.

- [90] A. Tsiasioti, C.K. Zacharis, P.D. Tzanavaras, *Single-Step Hydrolysis and Derivatization of Homocysteine Thiolactone Using Zone Fluidics: Simultaneous Analysis of Mixtures with Homocysteine Following Separation by Fluorosurfactant-Modified Gold Nanoparticles*, *Molecules*, 2022, 27, 2040.
- [91] P. Daneshvar, M. Yazdanpanah, C. Cuthbert, D.E.C. Cole, *Quantitative assay of plasma homocysteine thiolactone by gas chromatography/mass spectrometry*, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2003, 17, 358-362.
- [92] M. Wrońska, G. Chwatko, K. Borowczyk, J. Piechocka, P. Kubalczyk, R. Głowacki, *Application of GC-MS technique for the determination of homocysteine thiolactone in human urine*, *Journal of Chromatography B*, 2018, 1099, 18-24.
- [93] J. Piechocka, M. Wrońska, G. Chwatko, H. Jakubowski, R. Głowacki, *Quantification of homocysteine thiolactone in human saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry*, *Journal of Chromatography B*, 2020, 1149, 122155.
- [94] J. Piechocka, M. Wieczorek, R. Głowacki, *Gas Chromatography–Mass Spectrometry Based Approach for the Determination of Methionine-Related Sulfur-Containing Compounds in Human Saliva*, *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21, 9252.
- [95] Y. Mukai, T. Togawa, T. Suzuki, K. Ohata, S. Tanabe, *Determination of homocysteine thiolactone and homocysteine in cell cultures using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*, *Journal of Chromatography B*, 2002, 767, 263-268.
- [96] H. Jakubowski, *The determination of homocysteine-thiolactone in biological samples*, *Analytical Biochemistry*, 2002, 308, 112-119.
- [97] G. Chwatko, H. Jakubowski, *The determination of homocysteine-thiolactone in human plasma*, *Analytical Biochemistry*, 2005, 337, 271-277.
- [98] R. Głowacki, E. Bald, H. Jakubowski, *An on-column derivatization method for the determination of homocysteine-thiolactone and protein N-linked homocysteine*, *Amino Acids*, 2011, 41, 187-194.
- [99] B. Arora, A. Narayanasamy, J. Nirmal, N. Halder, S. Patnaik, A.K. Ravi, T. Velpandian, *Development and validation of a LC-MS/MS method for homocysteine thiolactone in plasma and evaluation of its stability in plasma samples*, *Journal of Chromatography B*, 2014, 944, 49-54.
- [100] H. Jakubowski, *Quantification of urinary S- and N-homocysteinylated protein and homocysteine-thiolactone in mice*, *Analytical Biochemistry*, 2016, 508, 118-123.
- [101] A. Zinellu, S. Sotgia, B. Scanu, E. Pisanu, M. Sanna, S. Sati, L. Deiana, S. Sengupta, C. Carru, *Determination of homocysteine thiolactone, reduced homocysteine, homocystine, homocysteine-cysteine mixed disulfide, cysteine and cystine in a reaction mixture by overimposed pressure/voltage capillary electrophoresis*, *Talanta*, 2010, 82, 1281-1285.
- [102] P. Furmaniak, P. Kubalczyk, R. Głowacki, *Determination of homocysteine thiolactone in urine by field amplified sample injection and sweeping MEKC method with UV detection*, *Journal of Chromatography B*, 2014, 961, 36-41.

- [103] L. Michaelis, *Electric transport of enzymes, malt distaste and pepsin*, *Biochemische Zeitschrift*, 1909, 16, 81-86.
- [104] A. Tiselius, *A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures*, *Transactions of the Faraday Society*, 1937, 33, 524.
- [105] S. Hjertén, *The history of the development of electrophoresis in Uppsala*, *Electrophoresis*, 1988, 9, 3-15.
- [106] S. Hjertén, *Free Zone Electrophoresis*, University of Uppsala, Dissertation, 1967.
- [107] K.D. Lukacs, J.W. Jorgenson, *Capillary zone electrophoresis: effect of physical parameters on separation efficiency and quantitation*, *Journal of High Resolution Chromatography*, 1985, 8, 407-411.
- [108] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries*, *Analytical Chemistry*, 1984, 56, 111-113.
- [109] R.P. Oda, B.J. Madden, J.C. Morris, T.C. Spelsberg, J.P. Landers, *Multiple buffer additive strategies for enhanced capillary electrophoretic separation of peptides*, *Journal of Chromatography*, 1994, 680, 341-351.
- [110] J.M. Miller, *Separation Methods in Chemical Analysis*, John Wiley & Sons Inc, 1975, 280.
- [111] S.F.Y. Li, Y.S. Wu, *Capillary Electrophoresis*, w: I.D. Wilson (ed.), *Encyclopedia of Separation Science*, wyd. 1, Academic Press, 2000, 1176-1187.
- [112] A. Alizadeh, W.-L. Hsu, M. Wang, H. Daiguji, *Electroosmotic flow: From microfluidics to nanofluidics*, *Electrophoresis* 2021, 42, 834-868.
- [113] M.L. Marina, A. Rios, M. Valcarcel, *Fundamentals of capillary electrophoresis*, w: M.L. Marina, A. Ríos, M. Valcarcel (ed.), *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, wyd. 1, Elsevier Science, 2005, 1-27.
- [114] C. Schwer, E. Kenndler, *Capillary electrophoresis*, *Chromatographia*, 1990, 30, 546-554.
- [115] D.R. Baker, *Capillary Electrophoresis Techniques in Analytical Chemistry*, wyd. 1, Wiley-Interscience, 1995, 19-100.
- [116] Y. Chen, W. Lü, X. Chen, M. Teng, *Review of recent developments of on-line sample stacking techniques and their application in capillary electrophoresis*, *Central European Journal of Chemistry*, 2012, 10, 611-638.
- [117] D.N. Heiger, P. Kaltenbach, H.-J.P. Sievert, *Diode-array detection in capillary electrophoresis*, *Electrophoresis*. 1994, 15, 1234-1247.
- [118] T. Liénard-Mayor, B. Yanga, N.T. Tran, A. Bruneel, A. Guttman, M. Taverna, T.D. Mai, *High sensitivity capillary electrophoresis with fluorescent detection for glycan mapping*, *Journal of Chromatography A*, 2021, 1657, 462593.
- [119] T. Kawai, *Recent Advances in Trace Bioanalysis by Capillary Electrophoresis*, *Analytical Sciences*, 2020, 37, 27-36.
- [120] Y. Deng, N. Gasilova, L. Qiao, Y.-L. Zhou, X.-X. Zhang, H.H. Girault, *Highly sensitive detection of five typical fluoroquinolones in low-fat milk by field-enhanced sample injection-based CE in bubble cell capillary*, *Electrophoresis*, 2014, 35, 3355-3362.

- [121] A. Rodat, P. Gavard, F. Couderc, *Improving detection in capillary electrophoresis with laser induced fluorescence via a bubble cell capillary and laser power adjustment*, Biomedical Chromatography, 2009, 23, 42-47.
- [122] K. Petru, J. Siroka, L. Bydzovska, L. Krcmova, M Polasek, *Assay of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by capillary electrophoresis with spectrophotometric detection using a high-sensitivity detection cell and solid-phase extraction*, Electrophoresis, 2014, 35, 2546-2549.
- [123] P. Kubalczyk, K. Borowczyk, G. Chwatko, R. Głowacki, *A simple micellar electrokinetic chromatography method for the determination of hydrogen sulfide in hen tissues*, Electrophoresis, 2015, 36, 1028-1032.
- [124] I.H. Sung, Y.W. Lee, D.S. Chung, *Liquid extraction surface analysis in-line coupled with capillary electrophoresis for direct analysis of a solid surface sample*, Analytica Chimica Acta, 2014, 838, 45-50.
- [125] W.J.M. Underberg, J.C.M. Waterval, *Derivatization trends in capillary electrophoresis: An update*, Electrophoresis, 2002, 23, 3922-3933.
- [126] M.C. Breadmore, W. Grochocki, U. Kalsoom, M.N. Alves, S.C. Phung, M.T. Rokh, J.M. Cabot, A. Ghiasvand, F. Li, A.I. Shallan, A.S.A. Keyon, A.A. Alhusban, H.H. See, A. Wuethrich, M. Dawod, J.P. Quirino, *Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips (2016 - 2018)*, Electrophoresis, 2019, 40, 17-39.
- [127] M. Urbanek, L. Krivankova, P. Bocek, *Stacking phenomena in electromigration: From basic principles to practical procedures*, Electrophoresis, 2003, 24, 466-485.
- [128] P. Husek, P. Simek, *Alkyl Chloroformates in Sample Derivatization Strategies for GC Analysis. Review on a Decade Use of the Reagents as Esterifying Agents*, Current Pharmaceutical Analysis, 2006, 2, 23-43.
- [129] M.L. Marina, M. Castro-Puyana, *Derivatization in Capillary Electrophoresis*, w: P. Schmitt-Kopplin (ed.), *Capillary Electrophoresis: Methods and Protocols*, wyd. 2, Humana Press, Nowy Jork, 2016, 37-50.
- [130] A. Wuethrich, J.P. Quirino, *Derivatisation for separation and detection in capillary electrophoresis (2015–2017)*, Electrophoresis, 2018, 39, 82-96.
- [131] J. Segura., R. Ventura, C. Jurado, *Derivatization Procedures for Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Determination of Xenobiotics in Biological Samples, with Special Attention to Drugs of Abuse and Doping Agents*, Journal of Chromatography B, 1998, 713, 61-90.
- [132] D. Tsikas, *Pentafluorobenzyl Bromide – a Versatile Derivatization Agent in Chromatography and Mass Spectrometry: I. Analysis of Inorganic Anions and Organophosphates*, Journal of Chromatography B, 2017, 1043, 187-201.
- [133] J. Wolf, J. Korf, *4-Bromomethyl-7-Methoxycoumarin and Analogues as Derivatization Agents for High-Performance Liquid Chromatography Determinations: A Review*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1992, 10, 99-107.

- [134] H.A. Bardelmeijer, H. Lingeman, C. de Ruiter, W.J.M. Underberg, *Derivatization in capillary electrophoresis*, Journal of Chromatography A, 1998, 807, 3-26.
- [135] A. Padarauskas, *Derivatization of inorganic ions in capillary electrophoresis*, Electrophoresis, 2003, 24, 2054-2063.
- [136] H.A. Bardelmeijer, J.C. Waterval, H. Lingeman, R.V. Hof, A. Bult, W.J. Underberg, Underberg, *Pre-, on- and post-column derivatization in capillary electrophoresis*, Electrophoresis, 1997, 18, 2214-2227.
- [137] V.A. Galievsky A.S. Stasheuski, S.N. Krylov, "Getting the best sensitivity from on-capillary fluorescence detection in capillary electrophoresis" – A tutorial, *Analytica Chimica Acta*, 2016, 935, 58-81.
- [138] Z. Glatz, *On-capillary derivatisation as an approach to enhancing sensitivity in capillary electrophoresis*, Electrophoresis, 2015, 36, 744-763.
- [139] A. Cela, A. Madr, T. Dedova, M. Pelcova, M. Jeseta, J. Zakova, I. Crha, Z. Glatz, *MEKC-LIF method for analysis of amino acids after on-capillary derivatization by transverse diffusion of laminar flow profiles mixing of reactants for assessing developmental capacity of human embryos after in vitro fertilization*, Electrophoresis, 2016, 37, 2305-2312.
- [140] X. Liu, J. Yang, S. Sun, L. Guo, L. Yang, *Enzyme and inhibition assay of urease by continuous monitoring of the ammonium formation based on capillary electrophoresis*, Electrophoresis, 2016, 37, 2692-2698.
- [141] K.L. Kostel, S.M. Lunte, *Evaluation of capillary electrophoresis with post-column derivatization and laser-induced fluorescence detection for the determination of substance P and its metabolites*, Journal of Chromatography B, 1997, 695, 27-38.
- [142] M.E. Szulc, I.S. Krull, *Improved detection and derivatization in capillary electrophoresis*, Journal of Chromatography A 1994, 659, 231-245.
- [143] T. Tsuda, J.V. Sweedler, R.N. Zare, *Rectangular Capillaries for Capillary Zone Electrophoresis*, Analytical Chemistry, 1990, 62, 2149-2152.
- [144] J.P. Chervet, R.E.J. Van Soest, M. Ursem, *Z-shaped flow cell for UV detection in capillary electrophoresis*, Journal of Chromatography A, 1991, 543, 439-449.
- [145] *High-sensitivity detection cell for the Agilent Capillary Electrophoresis system*, Technical Note, Agilent Technologies, 2008.
- [146] M. Jansson, A. Emmer, J. Roeraade, *Some Design Considerations in Miniaturized Electrokinetic Separation Systems*, Journal of High Resolution Chromatography 1989, 17, 797-801.
- [147] M. Albin, P.D. Grossman, S.E. Moring, *Sensitivity Enhancement for Capillary Electrophoresis*, Analytical Chemistry, 1993, 65, 489-497.
- [148] S.E. Moring, R.T. Reel, R.E.J. Van Soest, *Optical Improvements of a Z-Shaped Cell for High-Sensitivity UV Absorbance Detection in Capillary Electrophoresis*, Analytical Chemistry, 1993, 65, 3454.
- [149] *Diode-array detection in capillary electrophoresis using Agilent Extended Light Path capillaries*, Technical Note, Agilent Technologies, 2009.

- [150] Y. Xue, E.S. Yeung, *Characterization of Band Broadening in Capillary Electrophoresis due to Nonuniform Capillary Geometries*, Analytical Chemistry, 1994, 66, 3575-3580.
- [151] W. Grochocki, M.J. Markuszewski, J.P. Quirino, *Stacking And Multidimensional Techniques For Capillary Electromigration Methods* w: C.F. Poole (ed.), *Capillary Electromigration Separation Methods*, wyd. 1, Elsevier, 2018, str. 313-334.
- [152] A. Šlampová, Z. Malá, P. Gebauer, *Recent progress of sample stacking in capillary electrophoresis (2016-2018)*, Electrophoresis, 2019, 40, 40-54.
- [153] L. Suntornsuk, O. Anurukvorakun, *Sensitivity enhancement in capillary electrophoresis and their applications for analyses of pharmaceutical and related biochemical substances*, Electrophoresis 2022, 0, 1-16.
- [154] M. Wang, Q. Gong, W. Liu, S. Tan, J. Xiao, C. Chen, *Applications of capillary electrophoresis in the fields of environmental, pharmaceutical, clinical, and food analysis (2019 - 2021)*, Journal of Separation Sciences, 2022, 45, 1918-1941.
- [155] S. Dziomba, P. Kowalski, T. Baczek, *Field-amplified sample stacking–sweeping of vitamins B determination in capillary electrophoresis*, Journal of Chromatography A, 2012, 1267, 224-230.
- [156] F. Gao, X. Chen, X. Li, J. Li, J. Li, H. Liu, H. Liu, L. Chen, *Field-amplified sample injection combined with capillary electrophoresis for the simultaneous determination of five chlorophenols in water samples*, Electrophoresis, 2019, 40, 1771-1778.
- [157] J.F. Flores-Aguilar, L.C. Medrano, E. Perez-Escalante, J.A. Rodriguez, R.L. Camacho-Mendoza, I.S. Ibarra, *Large-volume sample stacking with polarity switching for analysis of azo dyes in water samples by capillary electrophoresis*, International Journal of Environmental Analytical Chemistry 2019, 99, 1255-1267.
- [158] Y. Kong, G. Yang, L. Kong, Z. Hou, G. Yang, H. Li, X. Ji, M. Gao, *New Application of pH-Mediated Acid Stacking Technique for Amphoteric Compounds in Capillary Electrophoresis: Example Assay of Blood Glutathiones*, Journal of Chromatographic Science, 2017, 55, 477-483.
- [159] A.V. Ivanov, K.A. Nikiforova, P.O. Bulgakova, E.D. Virus, A.A. Kubatiev, *Determination of blood plasma amino thiols using derivatization-enhanced capillary transient isotachopheresis*, Analytical Sciences, 2018, 34, 505-508.
- [160] Z.K. Shihabi, *Transient pseudo-isotachopheresis for sample concentration in capillary electrophoresis*, Electrophoresis, 2002, 23, 1612-1617.
- [161] X. Xu, Z. Jia, Y. Shu, L. Liu, *Dynamic pH junction-sweeping technique for on-line concentration of acidic amino acids in human serum by capillary electrophoresis with indirect UV detection*, Journal of Chromatography B, 2015, 980, 20-27.
- [162] M. Wu, W. Chen, G. Wang, P. He, Q. Wang, *Analysis of acrylamide in food products by microchip electrophoresis with on-line multiple-preconcentration techniques*, Food Chemistry, 2016, 209, 154-161.

- [163] B. Feist, *Selective dispersive micro solid-phase extraction using oxidized multiwalled carbon nanotubes modified with 1,10-phenanthroline for preconcentration of lead ions*, Food Chemistry, 2016, 209, 37-42.
- [164] A. Asfarama, M. Ghaedia, A. Goudarzi, *Optimization of ultrasound-assisted dispersive solid-phase microextraction based on nanoparticles followed by spectrophotometry for the simultaneous determination of dyes using experimental design*, Ultrasonics Sonochemistry, 2016, 32, 407-417.
- [165] S. Tiwari, N. Sharma, R. Saxena, *On-line speciation of chromium using a modified chelating resin and determination in industrial water samples by flame atomic absorption spectrometry*, New Journal of Chemistry, 2016, 40, 1412-1419.
- [166] A. Gholami, S. Masoum, A. Mohsenikia, S. Abbasi, *Chemometrics-assisted excitation–emission fluorescence analytical data for rapid and selective determination of optical brighteners in the presence of uncalibrated interferences*, Spectrochimica Acta Part A, 2016, 153, 108-117.
- [167] E. Yilmaz, I. Ocsoy, N. Ozdemir, M. Soylak, *Bovine serum albumin-Cu(II) hybrid nanoflowers: An effective adsorbent for solid phase extraction and slurry sampling flame atomic absorption spectrometric analysis of cadmium and lead in water, hair, food and cigarette samples*, Analytica Chimica Acta, 2016, 906, 110-117.
- [168] R. Gürkan, S. Korkmaz, N. Altunay, *Preconcentration and determination of vanadium and molybdenum in milk, vegetables and foodstuffs by ultrasonic-thermostatic-assisted cloud point extraction coupled to flame atomic absorption spectrometry*, Talanta, 2016, 155, 38-46.
- [169] M. Shamsipur, N. Yazdanfar, M. Ghambarian, *Combination of solid-phase extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by GC-MS for determination of pesticide residues from water, milk, honey and fruit juice*, Food Chemistry, 2016, 204, 289-297.
- [170] N. Jalbani, E. Yilmaz, R.M. Alosmanov, M. Soylak, *Solid-phase extraction of copper and zinc in water samples using diethylamine-modified phosphorus-containing polymer*, Desalination and Water Treatment, 2016, 57, 2834-2842.
- [171] Y.E. Unsal, M. Tuzen, M. Soylak, *Speciation of chromium by the combination of dispersive liquid–liquid microextraction and microsample injection flame atomic absorption spectrometry*, Turkish Journal of Chemistry, 2014, 38, 173-181.
- [172] L. Ramos, J.J. Ramos, U.A.Th. Brinkman, *Miniaturization in sample treatment for environmental analysis*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005, 381, 119-140.
- [173] R.M. Smith, *Before the injection - Modern methods of sample preparation for separation techniques*, Journal of Chromatography A, 2003, 1000, 3-27.
- [174] C. Nerin, J. Salafranca, M. Aznar, R. Batll, *Critical review on recent developments in solventless techniques for extraction of analytes*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 393, 809-833.
- [175] J. Namieśnik, Z. Jamrógiewicz, M. Pilarczyk, L. Torres, *Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy*, wyd. 1, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1999.

- [176] D.A. Lambropoulou, *An overview of modern extraction techniques for the determination of organic pollutants in environmental matrices: A review*, *Current Organic Chemistry*, 2010, 14, 2247-2267.
- [177] S. Xiao, S. Lv, Z. Cheng, C. Hu, P. Li, F. Nan, X. Liu, D. Liu, Z. Zhou, P. Wang, *A Simple Method for the Determination of Pharmaceutical and Personal Care Products in Fish Tissue Based on Matrix Solid-Phase Dispersion*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69, 15738-15745.
- [178] Y. Hamidi, S.A. Ataei, A. Sarraf, *A simple, fast and low-cost method for the efficient separation of hydrocarbons from oily sludge*, *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 413, 125328.
- [179] M.H. Hosseini, M. Rezaee, S. Akbarian, F. Mizani, M.R. Pourjavid, M. Arabieh, *Homogeneous liquid-liquid microextraction via flotation assistance for rapid and efficient determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples*, *Analytica Chimica Acta*, 2013, 762, 54-60.
- [180] C.C.E. Baltussen, P. Sandra, F. David, *Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles*, *Journal of Microcolumn Separations*, 1999, 11, 737-747.
- [181] S. Berijani, Y. Assadi, M. Anbia, M.-R.M. Hosseini, E. Aghaee, *Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection: very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water*, *Journal of Chromatography A*, 2006, 1123, 1-9.
- [182] S. Jeong, J.E. Valdez, N. Miękus, J.Y. Kwon, W. Kwon, T. Bączek, D.S. Chung, *Facile and highly efficient three-phase single drop microextraction in-line coupled with capillary electrophoresis*, *Journal of Chromatography A*, 2021, 1655, 462520.
- [183] <https://www.acs.org/content/dam/acsorg/greenchemistry/redesign/principles/the-12-principles-of-green-chemistry-pocket-guide.pdf> (06.2021).
- [184] M. Alexoviča, Y. Dotsikas, P. Bober, J. Sabo, *Achievements in robotic automation of solvent extraction and related approaches for bioanalysis of pharmaceuticals*, *Journal of Chromatography B*, 2018, 1092, 402-421.
- [185] S.M. Daryanavard, H. Zolfaghari, A. Abdel-Rehim, M. Abdel-Rehim, *Recent applications of microextraction sample preparation techniques in biological samples analysis*, *Biomedical Chromatography*, 2021, 35, 1-31.
- [186] J. Lee, H.K. Lee, K.E. Rasmussen, S.P. Bjergaard, *Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review*, *Analytica Chimica Acta*, 2008, 624, 253-268.
- [187] A.A. Nuhu, C. Basheer, B. Saad, *Liquid-phase and dispersive liquid-liquid microextraction techniques with derivatization: Recent applications in bioanalysis*, *Journal of Chromatography B* 2011, 879, 1180-1188.
- [188] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, *Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method*, *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217, 2342-2357.

- [189] H. Kataoka, *Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 396, 339-364.
- [190] X. Fu, Y. Liao, H. Liu, *Sample preparation for pharmaceutical analysis*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005, 381, 75-77.
- [191] T.G Halvorsen, S.P. Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction*, Journal of Chromatography B, 2001, 760, 219-226.
- [192] M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction*, Journal of Chromatography A, 2006, 1116, 1-9.
- [193] H. Farahani, P. Norouzi, R. Dinarvand, M.R. Ganjali, *Development of dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry as a simple, rapid and highly sensitive method for the determination of phthalate esters in water samples*, Journal of Chromatography A, 2007, 1172, 105-112.
- [194] M. Bashiry, A. Mohammadi, H. Hosseini, M. Kamankesh, S. Aeenehvand, Z. Mohammadi, *Application and optimization of microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for sensitive determination of polyamines in turkey breast meat samples*, Food Chemistry, 2016, 190, 1168-1173.
- [195] B.A. Rocha, B.R.B. Da Costa, N.C.P. De Albuquerque, A.R.M. De Oliveira, J.S.O. Souza, M. Al-Tameemi, A.D. Campiglia, F. Barbosa, *A fast method for bisphenol A and six analogues (S, F, Z, P, AF, AP) determination in urine samples based on dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, Talanta 2016, 154, 511-519.
- [196] M. Pouyan, G. Bagherian, N. Goudarzi, *Determination of ultra-trace palladium(II) in water, soil, and food samples by dispersive liquid-liquid microextraction-atomic absorption spectrometry using 2-mercaptobenzimidazole as a complexing agent*, Microchemical Journal, 2016, 127, 46-51.
- [197] H. Wang, J. Gao, N. Yu, J. Qu, F. Fang, H. Wang, M. Wang, X. Wang, *Development of a novel naphthoic acid ionic liquid and its application in "no-organic solvent microextraction" for determination of triclosan and methyltriclosan in human fluids and the method optimization by central composite design*, Talanta, 2016, 154, 381-391.
- [198] J. Sandrejova, N. Campillo, P. Vinas, V. Andruch, *Classification and terminology in dispersive liquid-liquid microextraction*, Microchemical Journal, 2016, 127, 184-186.
- [199] A. Herrera-Herrera, M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, M. Rodríguez Delgado, *Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes*, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2010, 29, 728-751.
- [200] E. Sobhanzadeh, N.K.A. Bakar, M.R.B. Abas, K. Nemati, *Low temperature followed by matrix solid-phase dispersion-sonication procedure for the determination of multiclass pesticides in palm oil using LC-TOF-MS*, Journal of Hazardous Materials, 2011, 186, 1308-1313.

- [201] J. Zhang, H. Gao, B. Peng, S. Li, Z. Zhou, *Comparison of the performance of conventional, temperature-controlled, and ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography in analyzing pyrethroid pesticides in honey samples*, *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218, 6621-6629.
- [202] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis*, *Analytical Chemistry*, 1999, 71, 2650-2656.
- [203] S.P. Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction*, *Journal of Chromatography A* 2008, 1184, 132-142.
- [204] L. Arce, L. Nozal, B.M. Simonet, M. Valcarcel, A. Rios, *Liquid-phase microextraction techniques for simplifying sample treatment in capillary electrophoresis*, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2009, 28, 842-853.
- [205] S.P. Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques*, *Journal of Chromatography B*, 2005, 817, 3-12.
- [206] K.E. Rasmussen, S.P. Bjergaard, *Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction*, *Trends in Analytical Chemistry*, 2004, 23, 1-10.
- [207] M.R. Payán, M.Á. Bello-López, R. Fernández-Torres, J.L.P. Bernal, M.C. Mochón, *HPLC determination of ibuprofen, diclofenac and salicylic acid using hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME)*, *Analytica Chimica Acta*, 2009, 653, 184-190.
- [208] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, A. Brekke, T.S. Ho, T.G. Halvorsen, *Liquid-phase microextraction of basic drugs - Selection of extraction mode based on computer calculated solubility data*, *Journal of Separation Science*, 2005, 28, 1195-1203.
- [209] M.A. Bello-Lopez, M. Ramos-Payán, J.A. Ocaña-González, R. Fernández-Torres, M. Callejón-Mochón, *Analytical Applications of Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction (HF-LPME): A Review*, *Analytical Letters*, 2012, 45, 804-830.
- [210] H.H. Liu, P.K. Dasgupta, *Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop*, *Analytical Chemistry*, 1996, 68, 1817-1821.
- [211] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, *Solvent microextraction into a single drop*, *Analytical Chemistry*, 1996, 68, 2236-2240.
- [212] D. Han, K.H. Row, *Trends in liquid-phase microextraction, and its application to environmental and biological samples*, 2012, *Mirochimica Acta*, 176, 1-22.
- [213] M. Szultka, P. Pomastowski, V. Railean-Plugaru, B. Buszewski, *Microextraction sample preparation techniques in biomedical analysis*, *Journal of Separation Science*, 2014, 37, 3094-3105.
- [214] L. Novakova, H. Vickova, *A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation*, *Analytica Chimica Acta*, 2009, 656, 8-35.
- [215] A.L. Theis, A.J. Waldack, S.M. Hansen, M.A. Jeannot, *Headspace Solvent Microextraction*, *Analytical Chemistry*, 2001, 73, 5651-5654.

- [216] S. Shariati-Feizabadi, Y. Yamini, N. Bahramifar, *Headspace solvent microextraction and gas chromatographic determination of some polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples*, *Analytica Chimica Acta*, 2003, 489, 21-31.
- [217] F. Zhao, S. Lu, W. Du, B. Zeng, *Ionic liquid-based headspace single-drop microextraction coupled to gas chromatography for the determination of chlorobenzene derivatives*, *Microchimica Acta*, 2009, 165, 29-33.
- [218] Y.C. Fiamegos, C.D. Stalikas, *Theoretical analysis and experimental evaluation of headspace in-drop derivatization single-drop microextraction using aldehydes as model analytes*, *Analytica Chimica Acta*, 2007, 599, 76-83.
- [219] M. Khajeh, Y. Yamini, J. Hassan, *Trace analysis of chlorobenzenes in water samples using headspace solvent microextraction and gas chromatography/electron capture detection*, *Talanta* 2006, 69, 1088-1094.
- [220] W. Liu, H.K. Lee, *Continuous-Flow Microextraction Exceeding 1000-Fold Concentration of Dilute Analytes*, *Analytical Chemistry*, 2000, 72, 4462-4467.
- [221] Y. Li, T. Zhang, P. Liang, *Application of continuous-flow liquid-phase microextraction to the analysis of volatile halohydrocarbons in water*, *Analytica Chimica Acta*, 2005, 536, 245-249.
- [222] S. Liu, P.K. Dasgupta, *Liquid Droplet. A Renewable Gas Sampling Interface*, *Analytical Chemistry*, 1995, 67, 2042-2049.
- [223] M.A. Jeannot, A. Przyjazny, J.M. Kokosa, *Single drop microextraction – Development, applications and future trends*, *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217, 2326-2336.
- [224] M. Ma, F.F. Cantwell, *Solvent Microextraction with Simultaneous Back-Extraction for Sample Cleanup and Preconcentration: Preconcentration into a Single Microdrop*, *Analytical Chemistry*, 1999, 71, 388-393.
- [225] J. Pawliszyn, S.P. Bjergaard, *Analytical microextraction: current status and future trends*, *Journal of Chromatographic Science*, 2006, 44, 291-307.
- [226] Y. He, Y.-J. Kang, *Single drop liquid-liquid-liquid microextraction of methamphetamine and amphetamine in urine*, *Journal of Chromatography Am* 2006, 1133, 35-40.
- [227] K. Choi, S.J. Kim, Y.G. Jin, Y.O. Jang, J.S. Kim, D.S. Chung, *Single Drop Microextraction Using Commercial Capillary Electrophoresis Instruments*, *Analytical Chemistry*, 2009, 81, 225-230.
- [228] M10 Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis Guidance for Industry by U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, November 2022. <https://www.fda.gov/media/162903/download>.
- [229] J.-P. Hsu, Y.-H. Tai, L.-H. Yeh, S. Tseng, *Importance of Temperature Effect on the Electrophoretic Behavior of Charge-Regulated Particles*, *Langmuir*, 2012, 28, 1013-1019.
- [230] M. Malak, H. Ebrahim, H. Sonbol, A. Ali, Y. Aboulella, G. Hadad, S. Emara, *Highly Sensitive In-Capillary Derivatization and Field Amplified Sample Stacking to Analyze Narcotic Drugs in Human Serum by Capillary Zone Electrophoresis*, *Separations*, 2023, 10, 58.

- [231] A. García-Vázquez, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Single-drop microextraction combined in-line with capillary electrophoresis for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine samples*, *Electrophoresis*, 2016, 37, 274-281.
- [232] M. Clarkson, B. Brenner, C. Magee, *Pocket Companion to Brenner and Rector's The Kidney*, wyd.2, Saunders, 2010, 27-28.
- [233] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6212#section=Solubility> (data odwiedzin: 01.2023).
- [234] Y. He, H.K. Lee, *Liquid-Phase Microextraction in a Single Drop of Organic Solvent by Using a Conventional Microsyringe*, *Analytical Chemistry*, 1997, 69, 4634-4640.
- [235] W. Gao, Y. Chen, G. Chen, J. Xi, Y. Chen, J. Yang, N. Xu, *Trace analysis of three antihistamines in human urine by on-line single drop liquid-liquid-liquid microextraction coupled to sweeping micellar electrokinetic chromatography and its application to pharmacokinetic study*, *Journal of Chromatography B*, 2012, 904, 121-127.
- [236] P. Li, X. Zhang, B. Hu, *Phase transfer membrane supported liquid-liquid-liquid microextraction combined with large volume sample injection capillary electrophoresis-ultraviolet detection for the speciation of inorganic and organic mercury*, *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218, 9414-9421.
- [237] B. Buszewski, E. Dziubakiewicz, *Principles of electromigration techniques*, w: B. Buszewski, E. Dziubakiewicz, M. Szumski (eds.), *Electromigration Techniques – Theory and Practice*, wyd. 1, Springer Series in Chemical Physics 105, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2013, pp. 5-26.
- [238] K. Borowczyk, G. Chwatko, P. Kubalczyk, H. Jakubowski, J. Kubalska, R. Głowacki, *Simultaneous determination of methionine and homocysteine by on-column derivatization with o-phthalaldehyde*, *Talanta*, 2016, 161, 917-924.
- [239] F. Belala, M. Walasha, M. Fathya, S. Zayed, H. Borg, *Sensitive analysis of five alpha blockers in dosage forms and human plasma by field amplified sample injection combined with micellar electrokinetic chromatography*, *Microchemical Journal*, 2019, 146, 1173-1180.
- [240] R. Gottia, J. Fiori, S. Bosi, G. Dinelli, *Field-amplified sample injection and sweeping micellar electrokinetic chromatography in analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in wheat*, *Journal of Chromatography A*, 2019, 1601, 357-364.
- [241] A. Pérez-Alcaraz, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Field-amplified sample injection combined with CE for the enantiodetermination of cathinones in urine samples*, *Journal of Separation Sciences*, 2020, 43, 2914-2924.
- [242] S. Ma, S. Yang, Z. Song, J. Li, Q. Shi, H. You, H. Liu, M. Lv, L. Chen, *A twin enrichment method based on dispersive liquid-liquid microextraction and field-amplified sample injection for the simultaneous determination of sulfonamides*, *Analyst*, 2020, 145, 1825-1832.
- [243] N. Li, S. He, C. Li, F. Yang, Y. Dong, *Sensitive Analysis of Metoprolol Tartrate and Diltiazem Hydrochloride in Human Serum by Capillary Zone Electrophoresis Combining on Column Field-Amplified Sample Injection*, *Journal of Chromatographic Science*, 2021, 59, 465-472.

Wykaz tabel

Tabela 1. Podsumowanie i porównanie metod oznaczania HTL	49
Tabela 2. Wpływ objętości próbki w fiolce na wydajność ekstrakcji	97
Tabela 3. Wyniki kalibracji metody SDME-CZE do oznaczania HTL w moczu człowieka	105
Tabela 4. Dane walidacyjne dla metody SDME-CZE	106
Tabela 5. Porównanie opracowanej metody SDME-CZE z innymi opisanymi w literaturze metodami oznaczania HTL.....	107
Tabela 6. Stężenie HTL w moczu człowieka	108
Tabela 7. Wyniki kalibracji metody SDME-CZE do oznaczania HTL w moczu człowieka	121
Tabela 8. Dane walidacyjne dla metody SDME-CZE	122
Tabela 9. Porównanie opracowanej metody SDME-CZE z innymi opisanymi w literaturze metodami oznaczania HTL.....	124
Tabela 10. Wyniki kalibracji metody SDME-FASI-CZE do oznaczania HTL w moczu człowieka	142
Tabela 11. Dane walidacyjne dla metody SDME-FASI-CZE	144
Tabela 12. Porównanie opracowanej metody SDME-CZE z innymi opisanymi w literaturze metodami oznaczania HTL	145
Tabela 13. Stężenie HTL w moczu człowieka	146

Wykaz rysunków

Rys. 1. Wzór strukturalny homocysteiny	9
Rys. 2. Poglądowy schemat metabolizm homocysteiny u człowieka	10
Rys. 3. Reakcja edycji Hcy do HTL	12
Rys. 4. N-homocysteinyłacja białka przez tiolakton homocysteiny	20
Rys. 5. Krzywa kalibracyjna HTL w próbkach osocza wykonana na podstawie stosunków pól powierzchni sygnałów pochodzących od HTL i d ₄ -HTL [91]	23
Rys. 6. Przykładowy chromatogram uzyskany po analizie osocza za pomocą techniki GC-MS. Czarna linia - chromatogram uzyskany podczas monitorowania jonu molekularnego 293 m/z dla HTL. Szara linia - chromatogram uzyskany podczas monitorowania jonu molekularnego 297 m/z dla d ₄ -HTL. Czas retencji HTL wynosi 10,84 min [91]	24
Rys. 7. Reprezentatywny chromatogram próbki moczu, w której stężenie HTL wynosiło 13,5 μmol/L moczu [92]	26
Rys. 8. Reprezentatywne chromatogramy próbki śliny (A) oraz moczu (B) – szara linia, próbek doszczepionych, gdzie stężenie HTL wynosiło 0,5 μmol/L – linia przerywana oraz próbek niezawierających analitu - linia czarna [93]	28
Rys. 9. Reprezentatywne chromatogramy roztworów standardów HTL, Met, Cys i Hcy oraz ludzkiej śliny. A - wodny roztwór ślepej próby (czarna linia) i roztwór wodnych standardów HTL, Met, Cys i Hcy (szara linia); B - próbka ludzkiej śliny (czarna linia) i ta sama próbka z dodatkiem docelowych analitów (10 μmol/L) (szara linia) [94]	29
Rys. 10. Reprezentatywne chromatogramy ekstraktów komórek Hep G2, gdzie A – 1 μmol/L HTL, B – ekstrakt komórek Hep G2, C – ekstrakt komórek wzbogacony 1 μmol/L HTL, 1 – Hcy, 2 – HTL, 3 – glutation, 4 – histydyna [95]	32
Rys. 11. Zależność absorbancji ($\lambda_{HTL} = 240$ nm) od stężenia HTL w roztworze kalibracyjnym [96]	34
Rys. 12. Reprezentatywne chromatogramy uzyskane po analizie poszczególnych rodzajach ekstraktów komórkowych. MetE – szczep <i>E. coli</i> z genetycznie indukowanym niedoborem syntazy metioniny; cys2cys4 - szczep <i>S. cerevisiae</i> z genetycznie indukowanym niedoborem β -syntazy cystationinowej; w.t. – typ dziki szczepu <i>S. cerevisiae</i> ; SLK – linia komórek śródbłonna człowieka [96]	35
Rys. 13. Zależność fluorescencji od stężenia HTL w osoczu człowieka [97]	37

Rys. 14. Reprezentatywne chromatogramy ludzkiego osocza, gdzie 1 – stężenie HTL równe 6,7 nmol/L osocza, 2 – stężenie HTL równe 2,8 nmol/L osocza, 3 – próbka osocza potraktowana NaOH przed analizą HPLC, 4 – roztwór standardu HTL (100 fmol) [97]	37
Rys. 15. Reprezentatywne chromatogramy ludzkiego moczu, gdzie górny wykres – próbka moczu po 5 min inkubacji roztworem NaOH o stężeniu 0,1 mol/L, środkowy wykres – próbka moczu zawierająca HTL o stężeniu 538 nmol/L, dolny wykres – roztwór standardu (HTL – pik nr 3) [55]	39
Rys. 16. Reprezentatywne chromatogramy uzyskane po analizie moczu człowieka. 1 – mocz doszczepiony 0,4 μ mol/L HTL, 2 – próbka moczu bez doszczepienia, 3 – próbka moczu inkubowana w roztworze NaOH oraz H ₂ O ₂ [98]	40
Rys. 17. Reprezentatywny chromatogram próbki osocza zdrowego ochotnika [99]	42
Rys. 18. Zależność fluorescencji od stężenia HTL w moczu myszy [100]	43
Rys. 19. Reprezentatywne chromatogramy mysiego moczu, gdzie 1 – próbka moczu pobrana od myszy z niedoborem CBS, 2 – próbka moczu pobrana od myszy z niedoborem CBS wzbogacona 20 pmol HTL, 3 – próbka moczu potraktowana 0,1 mol/L NaOH przed analizą HPLC [100]	44
Rys. 20. Reprezentatywny elektroforegram uzyskany po analizie mieszaniny standardów wszystkich analitów, gdzie 1 - HTL [101]	45
Rys. 21. Krzywa kalibracyjna HTL w próbkach moczu wykonana na podstawie wysokości sygnałów pochodzących od HTL [102]	46
Rys. 22. Reprezentatywne elektroforegramy próbki moczu (linia kropkowana), moczu wzbogaconego 0,100 μ mol/L HTL (czarna linia) oraz próbki moczu inkubowanego z 0,1 mol/L NaOH (szara linia) [102]	47
Rys. 23. Fotografia przedstawiająca przekrój prostokątnej kapilary o wymiarach wewnętrznych 50 \times 1000 μ m i grubości ścian wynoszącej 50 μ m [143]	58
Rys. 24. Schemat budowy kapilary z oknem detekcyjnym w kształcie litery Z, którego długość wynosi 3 mm. (A) widok od góry; (B) widok przekroju okna detekcyjnego. 1 – spiek tlenku glinu z przelotem o średnicy 300 μ m; 2 – dyski z tworzywa sztucznego; 3 – kapilara o średnicy wewnętrznej 50 lub 75 μ m [144]	59
Rys. 25. Kompresja stref próbek w detekcyjnej celce pęcherzykowej oraz wpływ wymiarów szczeliny okna detekcyjnego na rozdzielanie elektroforetyczne: A – standardowa kapilara o standardowych wymiarach szczeliny, B – kapilara z pęcherzykiem o standardowych wymiarach szczeliny, C – kapilara z pęcherzykiem o zwężonej szczelinie [149]	60
Rys. 26. Schemat budowy celki wysokiej czułości [141]	61

Rys. 27. Schemat przedstawiający układ ekstrakcji ciecz-ciecz	67
Rys. 28. Schemat technik ekstrakcji w zależności od stanu skupienia próbki [176]	68
Rys. 29. Schemat realizacji techniki DLLME [202]	70
Rys. 30. Schemat realizacji HF-LPME w układzie dwu- oraz trójfazowym [203, 205]	71
Rys. 31. Schemat ekstrakcji techniką HS-SDME [215]	72
Rys. 32. Schemat realizacji CF-SDME [213]	73
Rys. 33. Schemat realizacji DI-SDME: (1) – DI-SDME w układzie dwufazowym, (2a) – DI-SDME w układzie trójfazowym, gdzie faza organiczna oddzielająca próbkę od kropli jest nałożona na powierzchnię fazy donorowej, (2b) – DI-SDME w układzie trójfazowym, gdzie faza organiczna oddzielająca próbkę od fazy akceptorowej stanowi ciekłą warstwę wokół kropli [222, 227]	74
Rys. 34. Widmo absorpcji UV-Vis HTL	82
Rys. 35. Zależność wysokości sygnału HTL od pH roztworu elektrolitu podstawowego	84
Rys. 36. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od pH roztworu elektrolitu podstawowego	85
Rys. 37. Wpływ pH środowiska na ładunek cząsteczki HTL	85
Rys. 38. Zależność wysokości sygnału HTL od stężenia roztworu elektrolitu podstawowego	86
Rys. 39. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od stężenia roztworu elektrolitu podstawowego	86
Rys. 40. Zależność wysokości sygnału HTL od temperatury kapilary	87
Rys. 41. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od temperatury kapilary	88
Rys. 42. Zależność natężenia prądu od przyłożonego napięcia. Wyznaczenie maksymalnego napięcia (U)	89
Rys. 43. Schemat procedury SDME realizowanej w układzie pomiarowym CE	90
Rys. 44. Schemat przygotowania próbki moczu do procedury SDME	93
Rys. 45. Próbkę moczu z warstwą organiczną, która opadła na dno fiolki	94
Rys. 46. Próbkę moczu z nałożoną warstwą organiczną	94

Rys. 47. Wpływ rodzaju rozpuszczalnika lub mieszaniny rozpuszczalników na wydajność ekstrakcji	95
Rys. 48. Wpływ rodzaju kwasu na wydajność ekstrakcji	98
Rys. 49. Wpływ stężenia kwasu fosforowego(V) na wydajność ekstrakcji	99
Rys. 50. Schemat przedstawiający dwuetapową ekstrakcję SDME	99
Rys. 51. Wpływ czasu pomiędzy przygotowaniem próbki a wytworzeniem kropli na pole powierzchni sygnału HTL	100
Rys. 52. Zależność wydajności ekstrakcji do kropli fazy akceptorowej od czasu	101
Rys. 53. Reprezentatywne elektroforegramy uzyskane po analizie próbki moczu zawierającej HTL o stężeniu 50 $\mu\text{mol/L}$ metodą wykorzystującą SDME (zielona linia) oraz metodą bez stosowania SDME (szara linia)	103
Rys. 54. Krzywa kalibracyjna dla HTL w moczu	105
Rys. 55. Reprezentatywne elektroforegramy uzyskane podczas analizy próbki moczu (szara linia) oraz próbki moczu wzbogaconej standardem HTL, tak aby jego końcowa zawartość w płynie ustrojowym wynosiła 0,05 $\mu\text{mol/L}$ moczu (zielona linia)	109
Rys. 56. Schemat procedury SDME realizowanej za pomocą mikrostrzykawki	113
Rys. 57. Schemat przygotowania próbki moczu do procedury SDME	114
Rys. 58. Wpływ pH 0,2 mol/L buforu fosforanowego na wydajność ekstrakcji	115
Rys. 59. Wpływ objętości fazy organicznej na wydajność ekstrakcji	117
Rys. 60. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od stężenia kwasu fosforowego(V)	118
Rys. 61. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od czasu I etapu ekstrakcji	119
Rys. 62. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od czasu II etapu ekstrakcji	120
Rys. 63. Krzywa kalibracyjna HTL w moczu wykonana na podstawie pól powierzchni sygnałów pochodzących od HTL	121
Rys. 64. Reprezentatywne elektroforegramy uzyskane po analizie próbki moczu zawierającej HTL o stężeniu 50 $\mu\text{mol/L}$ metodą wykorzystującą SDME (zielona linia) oraz metodą bez stosowania SDME (szara linia)	125
Rys. 65. Zależność wysokości sygnału HTL od stężenia Na_2HPO_4 w roztworze elektrolitu podstawowego	128

Rys. 66. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od stężenia Na_2HPO_4 w roztworze elektrolitu podstawowego	129
Rys. 67. Zależność wysokości sygnału HTL od stężenia H_3PO_4 w roztworze elektrolitu podstawowego	130
Rys. 68. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od stężenia H_3PO_4 w roztworze elektrolitu podstawowego	130
Rys. 69. Zależność wysokości sygnału HTL od rodzaju kwasu stosowanego do przygotowania próbki do analizy	132
Rys. 70. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od rodzaju kwasu stosowanych do przygotowania próbki do analizy	132
Rys. 71. Zależność wysokości sygnału HTL od stężenia kwasu borowego stosowanego do przygotowania próbki do analizy	134
Rys. 72. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od stężenia kwasu borowego stosowanego do przygotowania próbki do analizy	135
Rys. 73. Zależność wysokości sygnału HTL od przykładanego napięcia podczas elektrokinezycznego wprowadzania próbki do kapilar	134
Rys. 74. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od przykładanego napięcia podczas elektrokinezycznego wprowadzania próbki do kapilary	135
Rys. 75. Zależność wysokości sygnału HTL od czasu elektrokinezycznego wprowadzania próbki do kapilary	136
Rys. 76. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od czasu elektrokinezycznego wprowadzania próbki do kapilar	136
Rys. 77. Zależność wysokości sygnału HTL od objętości strefy wody wprowadzonej do kapilary przed strefą próbki	137
Rys. 78. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od objętości strefy wody wprowadzonej do kapilary przed strefą próbki	137
Rys. 79. Zależność wysokości sygnału HTL od objętości strefy wody wprowadzanej za strefą próbki	139
Rys. 80. Zależność pola powierzchni sygnału HTL od objętości strefy wody wprowadzanej za strefą próbki	139
Rys. 81. Reprezentatywne elektroforegramy uzyskane po analizie próbki moczu zawierającej HTL o stężeniu $0,1 \mu\text{mol/L}$ metodą wykorzystującą SDME-FASI (zielona linia) oraz po	

analizie próbki moczu zawierającej HTL o stężeniu 8 $\mu\text{mol/L}$ metodą bez stosowania SDME-FASI (szara linia)	141
Rys. 82. Krzywa kalibracyjna HTL w próbkach moczu wykonana na podstawie pól powierzchni sygnałów HTL	143
Rys. 83. Reprezentatywne elektroforegramy uzyskane podczas analizy próbki moczu (szara linia) oraz próbki moczu wzbogaconej standardem HTL, tak aby jego końcowa zawartość w płynie ustrojowym wynosiła 0,1 $\mu\text{mol/L}$ (zielona linia)	147

Dorobek naukowy

Artykuły w czasopismach naukowych wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

1. **K. Purgat**, P. Olejarz, I. Kośka, R. Głowacki, P. Kubalczyk, *Determination of homocysteine thiolactone in human urine by capillary zone electrophoresis and single drop microextraction*, **Analytical Biochemistry**, 2020, 596, 113640.
2. **K. Purgat**, I. Kośka, P. Kubalczyk, *The use of single drop microextraction and field amplified sample injection for CZE determination of homocysteine thiolactone in urine*, **Molecules**, 2021, 26, 5687.

Pozostałe artykuły:

3. A. Zygmunt, Z. Adamczewski, K. Wojciechowska-Durczynska, K. Krawczyk-Rusiecka, E. Bieniek, M. Stasiak, A. Zygmunt, **K. Purgat**, R. Zakrzewski, J. Brzeziński, M. Karbownik-Lewinska, A. Lewinski, *Evaluation of effectiveness of iodine prophylaxis in Poland based on over 20-year observations of iodine supply in school-aged children in the central region of the country*, **Archives of Medical Science**, 2019 15, 1468-1474.
4. **K. Purgat**, K. Borowczyk, R. Zakrzewski, R. Głowacki, P. Kubalczyk, *Determination of nikhethamide by micellar electrokinetic chromatography*, **Biomedical Chromatography**, 2019, 33, 4571.
5. P. Olejarz, G. Chwatko, P. Kubalczyk, K. Purgat, R. Głowacki, K. Borowczyk, *Application of high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of tenofovir and creatinine in human urine and plasma samples*, **Pharmaceuticals**, 2020, 13, 367
6. I. Kośka, **K. Purgat**, R. Głowacki, P. Kubalczyk, *Simultaneous determination of ciprofloxacin and ofloxacin in animal tissues with the use of capillary electrophoresis with transient pseudo-isotachophoresis*, **Molecules**, 2021, 26, 6931.
7. I. Kośka, **K. Purgat**, P. Kubalczyk, *Simple, fast and reliable CE method for simultaneous determination of ciprofloxacin and ofloxacin in human urine*, **Scientific Reports**, 2022, 12, 7729.

Komunikaty Konferencyjne

Wystąpienia ustne:

1. **K. Purgat**, P. Kubalczyk, D. Stawińska, R. Zakrzewski, R. Głowacki, *Wykorzystanie mikroekstrakcji do pojedynczej kropli realizowanej w układzie pomiarowym kapilarnej*

- elektroforezy*, VI Ogólnopolska Konferencja Pomiedzy Naukami, Chorzów, Polska, 15 września 2017, materiały konferencyjne: A7, str. 20.
2. **K. Purgat**, P. Kubalczyk, R. Zakrzewski, R. Głowacki, *Oznaczanie tiolaktonu homocysteiny w moczu z wykorzystaniem mikroekstrakcji do pojedynczej kropli w elektroforezie kapilarnej*, X Polska Konferencja Chemii Analitycznej, Lublin, Polska, 1-5 lipca 2018, materiały konferencyjne M-31, str. 168.
 3. **K. Purgat**, P. Kubalczyk, R. Głowacki, *Determination of lipoic acid in human urine by capillary zone electrophoresis*, The 4th International Conference "New Trends on Sensing-Monitoring-Telediagnosis for Life Science", Brasov, Rumunia, 30 sierpnia - 1 września 2018, materiały konferencyjne O-1.9, str. 30.
 4. **K. Purgat**, I. Kośka, P. Kubalczyk, *Wykorzystanie mikroekstrakcji do pojedynczej kropli w oznaczaniu tiolaktonu homocysteiny za pomocą elektroforezy kapilarnej*, X Sesja Magi-strantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, Łódź, Polska, 4 czerwca 2019, materiały konferencyjne WP-05, str. 15.
 5. P. Kubalczyk, I. Kośka, **K. Purgat**, *Proste, szybkie i tanie sposoby poprawy czułości w elektroforezie kapilarnej*, 63. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Łódź, Polska, 13-17 września 2021.

Postery:

1. **K. Purgat**, D. Stawińska, P. Kubalczyk, *Oznaczanie lewofloksacyny metodą CE z zastosowaniem mikroekstrakcji w układzie pomiarowym*, V Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, Łódź, Polska, 11-12 maja 2017, materiały konferencyjne P-93, str. 159.
2. **K. Purgat**, P. Kubalczyk, J.A. Białek, R. Zakrzewski, R. Głowacki, *Determonation of kardiamid In pharmaceutical formulation by micellar electrokinetic chromatography*, 24th International Symposium on Electro- and Liquid Phase- Separation Techniques – "Chromatography in pharmacy and bioanalysis", Sopot, Polska, 10-13 września 2017, materiały konferencyjne P129, str. 233.
3. **K. Purgat**, P. Kubalczyk, I. Miszczak, R. Głowacki, *Application of single drop microextraction for the determination of homocysteine thiolactone by capillary zone electrophoresis*, The 41st Symposium Chromatographic Methods of Investigating Organic Compounds, Szczyrk, Polska, 19-22 czerwca 2018, materiały konferencyjne P-28.
4. **K. Purgat**, I. Kośka, P. Kubalczyk, *Utilization of single drop microextraction for urine sample preparation*, The VII Doctoral Symposium on Chemistry in Lodz, Łódź, Polska, 9-10 maja 2019, materiały konferencyjne S02-P32, str. 88.

5. **K. Purgat**, I. Kośka, P. Kubalczyk, *Electrophoretic determination of homocysteine thiolactone in human urine*, The 25th International Symposium on Separation Sciences, Łódź, Polska, 15-18 września 2019, materiały konferencyjne PP-69, str. 175.
6. I. Kośka, **K. Purgat**, P. Kubalczyk, *Simultaneous determination of ciprofloxacin and ofloxacin in human urine by capillary electrophoresis*, 27th International Symposium on Electrophoretic and Liquid Phase Separation Techniques, ITP 2020, Nanjing, Chiny, 2-4 listopada 2020.
7. I. Kośka, P. Kubalczyk, **K. Purgat**, *Elektroforetyczne oznaczanie wybranych fluorochinolonów w moczu człowieka*, 63. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Łódź, Polska, 13-17 września 2021.

Projekty badawcze:

1. Wykonawca projektu zatytułowanego „Wykorzystanie technik separacyjnych do oznaczania biologicznie aktywnych związków w preparatach farmaceutycznych i próbkach biologicznych. analityce wybranych związków aktywnych biologicznie” Grant przyznany w roku 2017 z dofinansowania prac badawczych młodych naukowców Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, grant nr. (B1711100001599.02).
2. Wykonawca projektu zatytułowanego „Wykorzystanie technik separacyjnych w analityce wybranych związków aktywnych biologicznie” Grant przyznany w roku 2018 z dofinansowania prac badawczych młodych naukowców Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, grant nr. (B1811100001857.02).

Szkolenia:

1. Szkolenie z zakresu wykorzystania spektrometrii mas do bezpośredniego monitorowania reakcji chemicznych oraz identyfikacji związków chemicznych prowadzone przez firmę ADVION, zorganizowane przez Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, 10 listopada 2016.
2. Szkolenie pt. „Introduction to design of experiments” z zakresu chemometrii oraz planowania eksperymentu, przeprowadzone przez prof. Riccardo Leardi, zorganizowane przez Instytut Chemii Uniwersytetu Śląskiego, 19 czerwca 2018
3. Szkolenie z zakresu oczyszczania próbki z wykorzystaniem chromatografii typu FLASH oraz analizy uzyskanych frakcji za pomocą LC-DAD-ESI-MS, zorganizowane przez firmę SHIMADZU, 15 września 2019

4. Szkolenie pt. „*LC-MS Method Development for Analysis of Extractable Compounds in Plastic Containers*” zorganizowane przez firmę Waters, 21 maja 2020.
5. Szkolenie pt. „*HPLC System Optimization – EMEA*”, zorganizowane przez firmę Phenomenex, 24 września 2020
6. Szkolenie pt. „*Techniki statystyczne w praktyce laboratoryjnej – szacowanie niepewności pomiaru, stwierdzanie niezgodności z wymaganiami, walidacja metod badawczych. Warsztaty komputerowe*” zorganizowane przez CE2 Centrum Nauki, 8 października 2020.

Nagrody i stypendia:

1. Nagroda od Komitetu Organizacyjnego X Polskiej Konferencji Chemii Analitycznej w Lublinie za najlepszą prezentację ustną w SESJI MŁODYCH: K. Purgat, P. Kubalczyk, R. Zakrzewski, R. Głowacki, *Oznaczanie tiolaktonu homocysteiny w moczu z wykorzystaniem mikroekstrakcji do pojedynczej kropli w elektroforezie kapilarnej*, X Polska Konferencja Chemii Analitycznej, Lublin, Polska, 1-5 lipca 2018.
2. Stypendium doktoranckie z dotacji projakościowej na rok akademicki 2016/2017, 2019/2020.
3. Stypendium Rektora Uniwersytetu Łódzkiego dla najlepszych doktorantów na rok akademicki 2019/2020.

Stáže:

1. Udział w zagranicznym stażu naukowym w ramach programu CEEPUS organizowanego przez Transilvania University of Brasov, Brasov, Rumunia, 24 sierpnia - 9 września 2018.

Inne:

1. Uczestnictwo w Szkole Letniej „*Food Safety And Healthy Living*” organizowaną przez Transilvania University of Brasov, Brasov, Rumunia, 26-30 sierpnia 2018.
2. Udział w organizowaniu konferencji *VII Łódzkiego Symposium Doktorantów Chemii*, 9-10 maja 2019.
3. Udział w organizowaniu konferencji *25th International Symposium on Separation Sciences*, 15-18 września 2019.