

Autoreferat

(załącznik 2a)

dr Paweł Kubalczyk

Katedra Chemii Środowiska,
Wydział Chemii,
Uniwersytet Łódzki

ŁÓDŹ 2017

1. Imię i nazwisko:

Paweł Kubalczyk

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

- 1996, magister chemii, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Uniwersytet Łódzki, po przedstawieniu pracy na temat: „Oznaczenie i udokładnianie struktury chlorku N-(3,4-dichlorofenetylo)acetamidoizopropylamoniowego metodami rentgenowskiej analizy strukturalnej”.
Promotor Prof. dr hab. Mieczysław Grabowski
- 2003, doktor nauk chemicznych, Wydział Fizyki i Chemii, Uniwersytet Łódzki, po przedstawieniu pracy na temat: „Wysokosprawna elektroforeza kapilarna 2-S-pirydyniowych pochodnych hydrofilowych tioli”.
Promotor Prof. dr hab. Edward Bald

3. Informacje o przebiegu pracy zawodowej:

- 1996-2003, asystent w Uniwersytecie Łódzkim, na Wydziale Chemii w Katedrze Technologii Chemicznej i Ochrony Środowiska, w Zakładzie Chemii Środowiska,
- 2003-obecnie, adiunkt w Uniwersytecie Łódzkim, na Wydziale Chemii, w Katedrze Chemii Środowiska.

4. Liczbowe zestawienie dorobku naukowego

- Całkowita liczba publikacji – 31
- Liczba publikacji przed osiągnięciem stopnia doktora – 2
- Liczba publikacji po osiągnięciu stopnia doktora – 29, w tym:
 - prace oryginalne z listy Journal Citation Reports (JCR) – 21
 - prace oryginalne spoza listy JCR – 7
 - prace przeglądowe z listy JCR – 2
 - prace przeglądowe spoza listy JCR – 1
- Liczba publikacji wchodzących w skład cyklu – 10
- Sumaryczny współczynnik wpływu (Impact Factor, IF) dla wszystkich publikacji:
 - zgodnie z rokiem publikacji – 53,868

- Sumaryczny IF dla publikacji w cyklu:
 - zgodnie z rokiem publikacji – 27,158
- Liczba cytowań wszystkich publikacji wg bazy Web of Science:
 - całkowita – 245
 - bez autocytowań – 213

Indeks Hirscha – 8

- Liczba cytowań wszystkich publikacji wg bazy Scopus:
 - całkowita – 261
 - bez autocytowań – 223

Indeks Hirscha – 8

5. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

5.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Elektroforeza kapilarna próbek biologicznych z wykorzystaniem metod zateżania analitów on-line

5.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Poniższe publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego zostały uszeregowane zgodnie z kolejnością ich omawiania w autoreferacie. Gwiazdką zaznaczono autora do korespondencji.

H1 Kubalczyk P., Bald E.* (2006)

Transient pseudo-isotachophoretic stacking in analysis of plasma for homocysteine by capillary zone electrophoresis

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 384, 1181-1185. IF₍₂₀₀₆₎ 2,695

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, przeprowadzeniu wszystkich eksperymentów, opisanu wyników, dyskusji ze współautorem nad interpretacją wyników oraz współredagowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

H2 Kubalczyk P., Bald E.* (2008)

Method for determination of total cysteamine in human plasma by high performance capillary electrophoresis with acetonitrile stacking

Electrophoresis, 29, 3636-3640. IF₍₂₀₀₈₎ 3,609

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, przeprowadzeniu wszystkich eksperymentów, opisanu wyników, dyskusji ze współautorem nad interpretacją wyników oraz współredagowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

- H3 Kubalczyk P., Bald E.* (2009)**
Analysis of orange juice for total cysteine and glutathione content by CZE with UV-absorption detection
Electrophoresis, 30, 2280-2283. IF₍₂₀₀₉₎ 3,509
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, przeprowadzeniu wszystkich eksperymentów, opisanu wyników, dyskusji ze współautorem nad interpretacją wyników oraz współredagowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.
- H4 Kubalczyk P.*, Chwatko G., Bald E. (2014)**
Capillary electrophoresis determination of tiopronin in human urine after derivatization with 2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate
Current Analytical Chemistry, 10, 375-380. IF₍₂₀₁₄₎ 1,194
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, wykonaniu większości eksperymentów, opisanu i interpretacji wyników, udziale w dyskusji ze współautorami nad wynikami badań, redagowaniu manuskryptu i korespondencji z edytorem czasopisma. Mój udział procentowy szacuję na 75%.
- H5 Kubalczyk P.*, Bald E., Furmaniak P., Głowacki R. (2014)**
Simultaneous determination of total homocysteine and cysteine in human plasma by capillary zone electrophoresis with pH-mediated sample stacking
Analytical Methods, 6, 4138-4143. IF₍₂₀₁₄₎ 1,938
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, przeprowadzeniu wszystkich eksperymentów, opisanu wyników, dyskusji ze współautorami nad interpretacją wyników oraz współredagowaniu manuskryptu i korespondencji z edytorem czasopisma. Mój udział procentowy szacuję na 75%.
- H6 Furmaniak P., Kubalczyk P.*, Głowacki R. (2014)**
Determination of homocysteine thiolactone in urine by field amplified sample injection and sweeping MEKC method with UV detection
Journal of Chromatography B, 961 36-41. IF₍₂₀₁₄₎ 2,694
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, nadzorowaniu eksperymentów, dyskusji ze współautorami nad interpretacją wyników oraz współredagowaniu manuskryptu i korespondencji z edytorem czasopisma. Mój udział procentowy szacuję na 35%.
- H7 Kubalczyk P.*, Borowczyk K., Chwatko G., Głowacki P. (2015)**
Simple micellar electrokinetic chromatography method for the determination of hydrogen sulfide in hen tissues
Electrophoresis, 36 1028-1032. IF₍₂₀₁₅₎ 3,028
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, przeprowadzeniu większości eksperymentów, opisanu wyników, dyskusji ze współautorami nad interpretacją wyników oraz współredagowaniu manuskryptu i korespondencji z edytorem czasopisma. Mój udział procentowy szacuję na 70%.
- H8 Borowczyk K., Krawczyk M., Kubalczyk P., Chwatko G.* (2015)**
Determination of lipoic acid in biological samples
Bioanalysis, 7, 1785-1798. IF₍₂₀₁₅₎ 3,003
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu przeglądu literatury i współredakcji rozdziałów 1, 2, 3 i 4 oraz korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 30%.

- H9 Kubalczyk P.***, Chwatko G., Głowacki R. (2016)
Fast and simple MEKC sweeping method for determination of thiosulfate in urine
Electrophoresis, 37, 1155–1160. IF₍₂₀₁₆₎ 2,744
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, przeprowadzeniu większości eksperymentów, opisanu wyników, dyskusji ze współautorami nad interpretacją wyników oraz współredagowaniu manuskryptu i korespondencji z edytorem czasopisma. Mój udział procentowy szacuję na 75%.
- H10 Kubalczyk P.***, Głowacki R. (2017)
Determination of lipoic acid in human urine by capillary zone electrophoresis
Electrophoresis, DOI: 10.1002/elps.201700002. IF₍₂₀₁₆₎ 2,744
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, przeprowadzeniu wszystkich eksperymentów, opisanu wyników, dyskusji ze współautorem nad interpretacją wyników oraz współredagowaniu manuskryptu i korespondencji z edytorem czasopisma. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

5.3. Omówienie celu naukowego pracy i osiągniętych wyników

Najważniejsze skróty

ACN – acetonitryl

BCPB – bromek 1-benzylo-2-chloropirydyniowy

BGE – elektrolit podstawowy

CMQT – tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinowy

CASH – cysteamina

Cys – cysteina

CysGly – cysteinyloglicyna

CZE – kapilarna elektroforeza strefowa

DHLA – kwas dihydroliponowy

FASI - zateżnienie przez spiętrzanie na drodze wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola

GSH – glutation

Hcy – homocysteina

HTL – tiolakton homocysteiny

LA – kwas liponowy

LOD – granica wykrywalności

LOQ – granica oznaczalności

MEKC – micelarna elektrokinetyczna chromatografia

MTQ – 1-metylo-2-tiochinolon

TBP – tributylfosfina

TCEP – tris(2-karboksyetylo)fosfina

TP – tiopronin, (N-2-merkaptopropionyloglicyna)

tpITP – zateżnienie przez spiętrzanie według mechanizmu pseudo-przejściowej izotachoforezy

Wstęp

Techniki elektromigracyjne od wielu lat są bardzo często wykorzystywane w laboratoriach analitycznych do rozdzielania i oznaczania różnych składników próbek o skomplikowanych matrycach. Techniki te charakteryzuje duży potencjał analityczny, który wynika głównie z uzyskiwanych dobrych rozdzielczości, krótkiego czasu rozdzielania mieszanin, wysokiej selektywności, stosunkowo dobrej czułości oraz podatności na miniaturyzację. Elektroforeza definiowana jako różnicowy ruch jonów w polu elektrycznym w medium separacyjnym, została po raz pierwszy zastosowana jako technika separacyjna przez szwedzkiego uczonego Arne Tiseliusa w roku 1937. Wśród technik elektromigracyjnych na szczególną uwagę zasługują obecnie najczęściej stosowane w laboratoriach analitycznych elektroforeza żelowa oraz elektroforeza kapilarna (CE). Elektroforeza żelowa używana głównie do rozdzielania biologicznych makrocząsteczek takich jak białka czy kwasy nukleinowe, oprócz wymienionych wcześniej zalet, posiada także pewne niedogodności. Można tu wymienić np. długie czasy analizy, niską sprawność oraz czasochłonną wizualizację wyników rozdzielania. Współczesna CE jest natomiast nowoczesną techniką analityczną, która pozwala na stosunkowo szybkie oraz wydajne rozdzielanie w wąskiej kapilarze cząstek znajdujących się w próbce o bardzo małej objętości. CE łączy mechanizm separacyjny elektroforezy z podstawami instrumentalnymi i automatyzacją wysokosprawnej chromatografii ciekłej (HPLC) [1].

Jednym z najczęściej wymienianych ograniczeń CE w porównaniu do HPLC jest zdecydowanie gorsza czułość stężeniowa, zwłaszcza gdy stosowany jest detektor spektrofotometryczny UV-Vis. Rozwiązaniem tego problemu nie może być zwykłe zwiększenie objętości próbki wprowadzanej do kapilary, gdyż zazwyczaj skutkuje to znaczącym obniżeniem rozdzielczości i spadkiem sprawności. Rozwiązania aparaturowe polegające na zastosowaniu specjalnych kapilar, czy też wyrafinowanych celek detekcyjnych (tzw. celki wysokiej czułości), pomagają tylko w niewielkim stopniu zniwelować różnicę w czułości pomiędzy CE i HPLC. Niewątpliwie bardzo dobrym rozwiązaniem jest wykorzystanie charakteryzujących się w wielu przypadkach zdecydowanie wyższą czułością detektorów fluorescencyjnych, bądź spektrometrów mas, które pozwalają na znaczące obniżenie granic wykrywalności i oznaczalności. Związane jest to jednak z koniecznością przeprowadzenia dodatkowych, kosztownych inwestycji aparaturowych. Stosunkowo częstym rozwiązaniem jest także zastosowanie reakcji derywatyzacji przeprowadzanej podczas jednego z etapów przygotowania próbki. W wyniku reakcji derywatyzacji otrzymuje się pochodne o zmienionych własnościach detekcyjnych, a często też elektroforetycznych, które bezpośrednio

wynikają z wprowadzenia chromoforu, fluoroforu lub elektroforu do struktury cząsteczki analitu.

Wśród sposobów umożliwiających znaczące obniżenie granicy wykrywalności w CE bardzo dużym zainteresowaniem cieszą się techniki zateżania (wzbogacania) analitów bezpośrednio w układzie analitycznym CE. Efekt spiętrzania jest w większości przypadków uzyskiwany poprzez wprowadzenie do kapilary dużo większej niż zwykle objętości próbki o niskim przewodnictwie i wykorzystanie pewnych efektów chromatograficznych i/lub elektroforetycznych w celu skupienia analitu w bardzo wąskiej strefie. Manipulacja przewodnictwem próbki i/lub rodzajem elektrolitu nie wymaga wprowadzenia praktycznie żadnych modyfikacji w komercyjnie dostępnej aparaturze do CE. Dodatkowo, proces zateżania ma miejsce w tej samej kapilarze, w której następuje separacja składników próbki, nie istnieje więc ryzyko straty analitu [2, 3]. Do chwili obecnej zostało opracowanych wiele technik zateżania analitów bezpośrednio w układzie pomiarowym, które ogólnie można podzielić na dwie grupy, przy czym podział ten został oparty na mechanizmie rozdzielania składników próbki. Do pierwszej grupy należą techniki, stosowane do związków posiadających ładunek, wykorzystujące mechanizm kapilarnej elektroforezy strefowej (CZE), zaś do grupy drugiej stosowane głównie do cząstek obojętnych, techniki oparte o micelną elektrokinetyczną chromatografię (MEKC). O niesłabnącym zainteresowaniu technikami zateżania analitów w układzie pomiarowym CE, świadczy ciągle rosnąca liczba nowych metod analitycznych wykorzystujących liczne odmiany tych technik, a nawet ich mniej lub bardziej złożone kombinacje [3-6].

W przypadku kapilarnej elektroforezy bardzo dużą rolę odgrywa także sposób przygotowania próbki. Próbki biologiczne to w większości przypadków bardzo skomplikowane matryce zawierające wiele związków, wśród których anality zazwyczaj występują w niewielkim stężeniu. Obecne w próbkach biologicznych białka również stanowią poważny problem, gdyż ich obecność może doprowadzić do modyfikacji wewnętrznej ściany kapilary i znaczącej zmiany jej własności, bądź w pewnych przypadkach nawet do zapchania samej kapilary. Wykorzystywane w metodach elektromigracyjnych techniki przygotowania próbki, takie jak np. ekstrakcja, derywatyzacja, odbiałczanie, w większości przypadków istotnie wpływają na przewodnictwo próbki. Odpowiednie dopasowanie przewodnictwa próbki oraz elektrolitu wykorzystywanego do rozdzielania (BGE) zdaje się być kluczowym czynnikiem decydującym o jakości separacji, gdyż w sposób bezpośredni wpływa na kształt oraz szerokość sygnału analitycznego, a więc na sprawność i rozdzielczość. Niewłaściwie dobrane przewodnictwo próbki, tj. zbyt wysokie w stosunku do BGE, powoduje poszerzenie

pasma analitu, co jest efektem niepożądanym mając na uwadze dość niską czułość detektora UV-Vis, znajdującego się na standardowym wyposażeniu większości aparatów do CE.

Prowadzone przeze mnie badania polegały na opracowaniu nowych, prostych, szybkich i czułych metod oznaczania związków występujących w próbkach biologicznych o złożonych matrycach, przy wykorzystaniu techniki zatężania/wzbogacania analitów bezpośrednio w układzie pomiarowym CE.

Przygotowanie próbek

Osocze krwi oraz mocz są często zaliczane do najlepiej poznanych i zbadanych próbek biologicznych. Są one również najczęściej analizowanymi płynami ustrojowymi, głównie ze względu na niezmienność składu matrycy, jak też bardzo dobrą znajomość poziomów referencyjnych wielu związków uznawanych za markery różnych chorób. Zarówno osocze jak i mocz są więc znaczącymi źródłami wartościowych informacji na temat kondycji żywych organizmów. Niestety nie są to próbki łatwe w analizie, gdyż w większości przypadków anality, zazwyczaj w niskich lub bardzo niskich (śladowych) stężeniach, występują obok dużej liczby, będących w nadmiarze innych składników matrycy [6]. Można zauważyć też pewną zależność, a mianowicie taką, że napotymane trudności z analizą próbek biologicznych są ściśle związane ze stanem jej skupienia i maleją wraz ze wzrostem płynności matrycy. Nasuwa się więc oczywisty wniosek, że najłatwiej analizować płyny biologiczne (mocz, osocze, naturalne soki, wody powierzchniowe, ścieki komunalne i przemysłowe), a zdecydowanie trudniej tkanki stałe (żołądek, wątroba, serce, mózg, włosy, paznokcie). Osocze, mocz jak i tkanki stałe to złożone próbki, które oprócz analizowanych związków mogą zawierać białka, a także znaczną ilość nieorganicznych soli. Z analitycznego punktu widzenia to obecność białka w próbce nastęrcza najwięcej problemów, gdyż utrudnia analizę i wpływa bezpośrednio na własności kapilary, często prowadząc do jej zapchania. Wszystko to sprawia, że przed elektroforetyczną analizą zawsze konieczne jest odpowiednie przygotowanie próbki. Proces przygotowania próbki jest też najbardziej czasochłonny oraz generuje najwięcej błędów [6]. Istnieje wiele sposobów usuwania białek z próbki, a do najczęściej stosowanych można zaliczyć odbiałczanie poprzez mechaniczne oddzielenie cząstek o dużej masie (ultrafiltracja) oraz wykorzystanie pewnych czynników chemicznych, takich jak np. kwasów (kwas trichlorooctowy, kwas chlorowy VII czy kwas 5-sulfosalicylowy), soli, czy też rozpuszczalników organicznych (aceton, acetonitryl, acetonitryl/amoniak) [6, 7, 8]. Czynniki chemiczne powodując zmianę właściwości białek powodują ich wytrącanie z roztworu próbki. W opracowanych przeze mnie procedurach przygotowania próbek osocza [H1, H2, H5] oraz tkanek żołądka, wątroby i serca kury [H7] konieczne było ich odbiałczanie. W tym celu jako

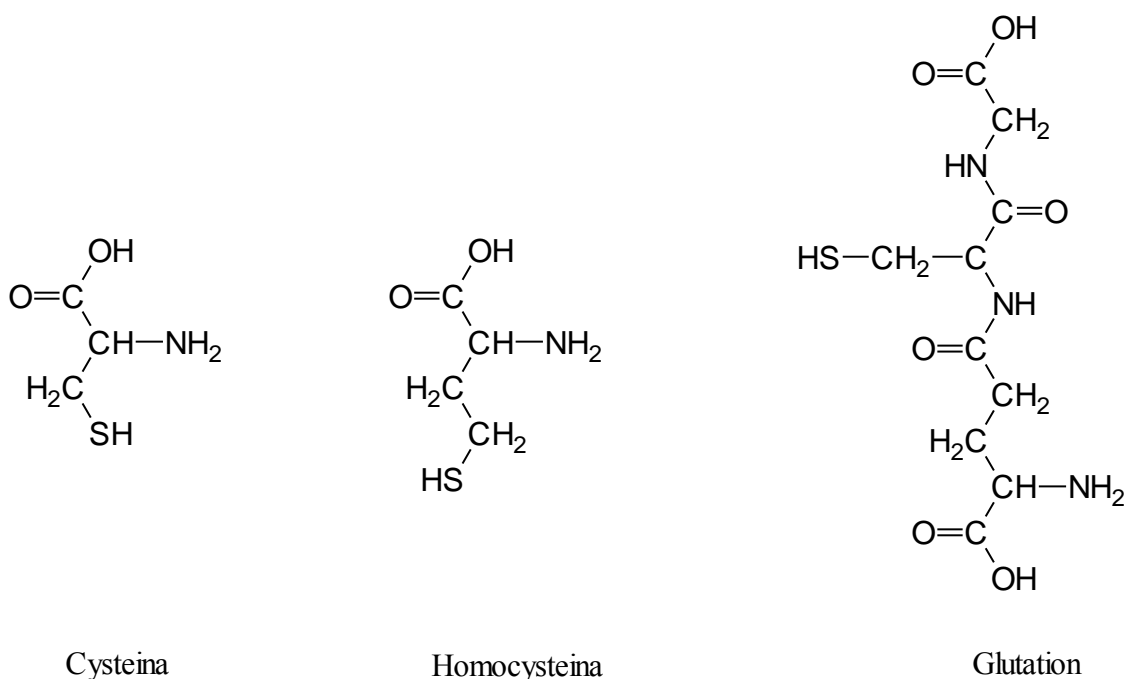
czynnik deproteinizujący stosowałem kwas chlorowy (VII), wytrącone białka usuwałem poprzez odwirowanie próbek, a dalszej analizie poddawałem otrzymany supernatant. W przypadku procedur, w których przygotowywałem próbki moczu [H4, H6, H9, H10], czy sok z pomarańczy [H3], które jak powszechnie wiadomo nie powinny zawierać białek, pomiąłem ten etap.

Jak już wspomniałem wcześniej stopień skomplikowania procedury przygotowania próbki rzeczywistej (biologicznej) maleje wraz ze stopniem płynności próbki. Jedną z opracowanych przeze mnie procedur dotyczyła oznaczania siarkowodoru w próbkach stałych pochodzenia zwierzęcego. Procedura oznaczania siarczków w tkankach stałych [H7] wymagała więc, oprócz usunięcia białka, wprowadzenia dodatkowego etapu mającego na celu wcześniejsze upłynnienie próbki. W badaniach tych optymalizowałem więc parametry homogenizacji żołądka, wątroby i serca kury. Ponieważ wiadomo, że pKa siarkowodoru w temperaturze 37°C wynosi 6,84 [9], stąd w homogenatach przygotowanych w środowisku lekko kwaśnym (pH 6) wolne siarczki powinny występować głównie w postaci siarkowodoru, który szybko się ulotni z próbki podczas jej przygotowywania. W środowisku alkalicznym (pH 9) ponad 90% siarczków powinno pozostać w roztworze w formie anionowej (HS⁻), co pozwoli na ich oznaczenie. Konsekwentnie, aby uniknąć niepożądanych strat analitu homogenaty wszystkich badanych tkanek przygotowywałem w 0,2 mol/L buforze fosforanowym o pH 9.

Osocze podobnie jak większość próbek biologicznych zawiera sole, głównie jest to chlorek sodu, w ilości przekraczającej często 1%. Obecność stosunkowo dużego stężenia soli skutkuje poszerzeniem przemieszczającej się we wnętrzu kapilary strefy próbki, a więc i pików na elektroforegramie. Poszerzenie strefy próbki jest bezpośrednio związane z jej dużym przewodnictwem względem stosowanego BGE, a co za tym idzie generowanym niskim natężeniem pola elektrycznego. Ten negatywny efekt jest szczególnie widoczny gdy do kapilary wprowadzana jest dość duża objętość próbki, której objętość stanowi ponad 1-2% całkowitej objętości kapilary. W celu dostosowania przewodnictwa próbki stosuje się różne zabiegi, które polegają często na zmieszaniu próbki z rozpuszczalnikiem organicznym lub przeprowadzeniu ekstrakcji/mikroekstrakcji typu ciecz-ciecz prowadzącej do znacznego uproszczenia matrycy z usunięciem soli włącznie. Znaczące obniżenie przewodnictwa roztworu próbki za pomocą dodatku acetonitrylu (ACN) wykorzystałem w procedurach oznaczania homocysteiny (Hcy) i cysteaminy (CASH) w osoczu [H1, H2], oznaczaniu tioproniny (TP) w moczu [H4] oraz oznaczaniu cysteiny (Cys) i glutationu (GSH) w soku pomarańczy [H3]. Podczas rozwijania powyższych metod wyznaczałem stosunek objętości ACN do objętości próbki. Zauważyłem, że optymalny stosunek ACN do próbki wynosi 2:1

(v/v), co jest zgodne z wcześniejszymi eksperymentami [10]. Podczas oznaczania tiolaktonu homocysteiny (HTL) [H6] oraz kwasu liponowego (LA) [H10] w moczu zastosowałem ekstrakcję ciecz-ciecz. Ekstrakcję HTL z próbek moczu przeprowadzałem wykorzystując mieszaninę chloroformu z metanolem w stosunku 2:1 (v/v), natomiast w metodyce stosowanej do analizy moczu na zawartość LA stosowałem ekstrakcję acetonem. HTL posiada w swojej strukturze grupę aminową, której pKa wynosi 6,67 [11]. Aby umożliwić efektywną ekstrakcję HTL do fazy organicznej dostosowywałem pH próbki buforem fosforanowym o pH 8 (brak ładunku w cząsteczce). Aby umożliwić późniejsze wprowadzenie próbki do kapilary metodą elektrokinetyczną (wymagany ładunek w cząsteczce HTL), uzyskaną po ekstrakcji warstwę chloroformową odparowywałem do sucha, a pozostałość rozpuszczałem w HCl (stężenie 0,0075 mol/L, pH 5,5).

Wśród oznaczanych przeze mnie związków największą grupę stanowią tiole, które odgrywają znaczącą rolę we wszystkich systemach biologicznych (Rys.1). Należą do związków bardzo reaktywnych, wykazujących własności antyoksydacyjne, pełnią szereg funkcji związanych z metabolizmem oraz homeostazą komórkową. Do ważnych w tym kontekście związków tiolowych, należy zaliczyć cysteinę (Cys), homocysteinę (Hcy) i glutation (GSH).



Rysunek 1. Wzory podstawowych aminokwasów tiolowych o dużym znaczeniu biologicznym.

Cząsteczki Cys i Hcy posiadają stosunkowo małe rozmiary, różnią się w budowie obecnością dodatkowej grupy metylenowej w cząsteczce homocysteiny. GSH (γ -glutamylcysteinylglycyna) jest tripeptydem zbudowanym z trzech reszt aminokwasowych:

kwasu γ -glutaminowego, glicyny i Cys, która jest źródłem grupy tiolowej. Wszystkie tiole swoją dużą reaktywność zawdzięczają grupie -SH. Podstawowe związki tiolowe, a więc Hcy, Cys i GSH, są ze sobą ściśle powiązane w szlaku metabolicznym metioniny, która jest dostarczana do organizmu wraz z pokarmem. Główną rolę w metabolizmie metioniny pełni Hcy, ponieważ determinuje syntezę innych aminokwasów i dodatkowo jest prekursorem metioniny w procesie remetylacji. Transsulfuracja prowadząca do biosyntezy Cys, a następnie GSH, konkuruje o Hcy z procesem remetylacji Hcy do metioniny [12, 13].

Innym, naturalnie występującym związkiem o biologicznym znaczeniu jest kwas liponowy (LA), znany również jako kwas 6,8-ditiooktanowy [14]. LA jest łatwo absorbowany z diety i transportowany do komórek różnych tkanek gdzie ulega redukcji do kwasu dihydroliponowego (DHLA) [15]. LA wspólnie z DHLA tworzą parę antyutleniaczy zdolną do regeneracji innych naturalnych antyoksydantów, zwłaszcza zredukowanych form witaminy C, α -tokoferolu, GSH oraz koenzymu Q10 [16]. LA jest często stosowany w zapobieganiu oraz leczeniu wielu chorób związanych ze stresem oksydacyjnym, m.in. cukrzycy, chorób sercowo-naczyniowych, zaburzeń neurodegeneracyjnych, zakażeń wirusem HIV oraz nowotworów [17]. Większość zagadnień związanych z pobieraniem, przechowywaniem i przygotowaniem próbki (m.in. odbiałczanie, ekstrakcja, derywatyzacja) oraz procedurami oznaczania zawartości LA w różnorodnych matrycach zostało, z moim współudziałem, bardzo szczegółowo opisanych w pracy przeglądowej [H8]. Warto podkreślić, iż tematyka przedstawiona w tej pracy, aczkolwiek dotycząca oznaczania LA, ma charakter uniwersalny i znajduje zastosowanie również w stosunku do oznaczania w próbkach biologicznych innych związków zawierających grupę tiolową.

Wśród ważnych związków tiolowych należy również wymienić te, które są wykorzystywane jako leki w różnorodnych terapiach. Do ważniejszych zaliczyć możemy N-2-merkaptopropionylglicynę (TP) stosowaną w leczeniu i zapobieganiu kamicy nerkowej, czy też CASH używaną w leczeniu cystynozy i cystynurii. CASH poprzez rozrywanie wiązania disarczkowego w cząsteczce cystyny pomaga w usunięciu Cys z komórek i dlatego znalazła zastosowanie w leczeniu m.in. cystynozy nefropatycznej u dzieci [18], rzadkiej choroby autosomalnej charakteryzującej się nadmiernym gromadzeniem cystyny w narządach (np. rogówka oka, nerki, mięśnie). Choroba ta wywołuje również odleglejsze komplikacje takie jak niedoczynność tarczycy, retinopatię, schorzenia trzustki oraz demencję [19]. Występująca w CASH grupa tiolowa czyni ten związek potencjalnym antyutleniaczem m.in. w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego radioterapią [20]. TP należy do syntetycznych leków tiolowych wykorzystywanych do kontrolowania tempa wytrącania i wydalania Cys w cystynurii poprzez tworzenie łatwo rozpuszczalnych kompleksów TP-Cys. Ponadto TP jest

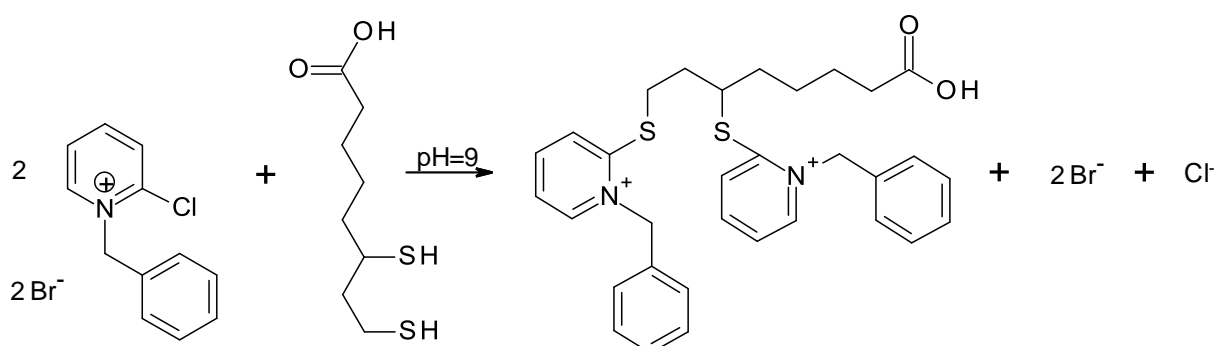
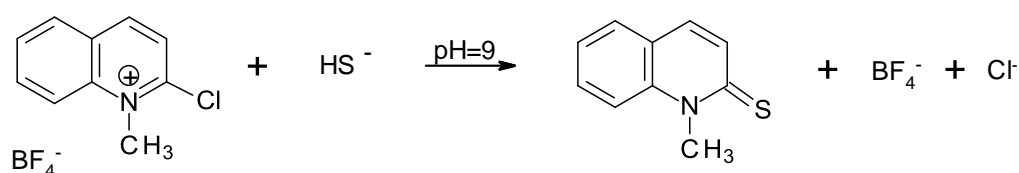
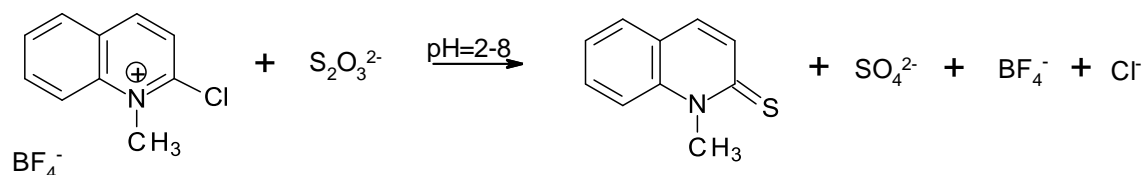
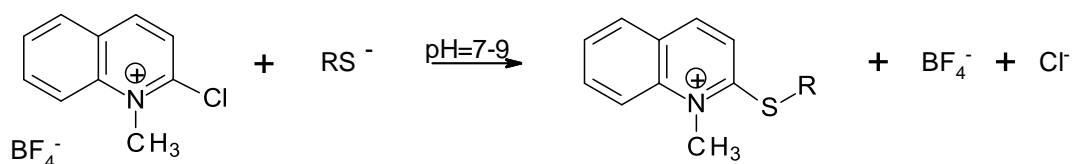
stosowany w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów, chorób wątroby i jako lek mukolityczny w zaburzeniach oddechowych [21].

Tiole ze względu na to, że posiadają grupy funkcyjne (karboksylowa i aminowa), które łatwo ulegają jonizacji, mogą być efektywnie rozdzielane i oznaczane przy zastosowaniu technik elektromigracyjnych, zazwyczaj CZE lub MEKC [6]. Obecna w ich cząsteczce grupa sulfhydrylowa jest główną przyczyną bardzo dużej reaktywności tioli. Z biologicznego punktu widzenia bardzo ważna jest reakcja redox tiol-disiarczek. Tiole w próbkach biologicznych występują głównie w dwóch formach: wolnej oraz związanej z białkami. W obrębie formy wolnej można je podzielić na zredukowane i utlenione. Jednakże najczęściej wyznaczanym parametrem jest tzw. pula tioli całkowitych, czyli kombinacja form wolnej zredukowanej, wolnej utlenionej oraz tioli związanych z białkami. Zawartość tioli całkowitych jest mierzona w odpowiednio przygotowanej próbce, do której na samym początku jest dodawany odczynnik redukujący w celu uwolnienia tioli związanych z białkami oraz zredukowania form wolnych utlenionych. W opracowanych procedurach zawsze oznaczałem całkowitą pulę związków. Podczas przygotowania próbek stosowałem dwa dobrze znane odczynniki redukujące, tributylfosfinę (TBP) do redukcji CASH w osoczu [H2] oraz tris(2-karboksyetylo)fosfinę (TCEP) w celu redukcji Hcy w osoczu [H1, H5], TP oraz LA w moczu [H4, H10] oraz Cys i GSH soku pomarańczy [H3].

Tiole, tiosiarczany oraz siarczki nie posiadają niestety strukturalnych własności (silnych chromoforów) pozwalających na ich detekcję z wystarczającą czułością, przy użyciu nadal najpopularniejszego w aparatach do CE komercyjnie dostępnego detektora spektrofotometrycznego UV-Vis. W praktyce, w takiej sytuacji można zastosować dwa rozwiązania, albo wykorzystać detekcję bezpośrednią przy bardzo krótkich analitycznych długościach fali albo zastosować reakcję derywatyzacji. W przypadku związków zawierających grupę -SH w przeważającej większości procedur stosuje się drugie z rozwiązań. Wyjątek stanowią tutaj tiole aromatyczne, które absorbują promieniowanie UV w zakresie 250-280 nm [22, 23]. Detekcję bezpośrednią, z ledwie zadowalającą czułością można zastosować do oznaczania GSH ponieważ zawiera on w cząsteczce dwa wiązania peptydowe wykazujące absorpcję promieniowania UV w przedziale 190-220 nm. Oznaczanie prostszych w budowie tioli wykazujących bardzo niewielką absorpcję poniżej 200 nm prowadzi się w zasadzie tylko po przeprowadzeniu reakcji derywatyzacji [8]. Otrzymana pochodna wykazuje często batochromowe przesunięcie maksimum absorpcji względem maksimum absorpcji odczynnika derywatyzującego, co jest zjawiskiem korzystnym gdyż generalnie wraz ze wzrostem długości fali maleje liczba potencjalnie przeszkadzających w analizie związków. Jest też możliwość zastosowania dużego nadmiaru odczynnika derywatyzującego, bez zaistnienia

niebezpieczeństwa, że jego sygnał będzie widoczny na elektroforegramie i znacząco utrudni jego interpretację. Dodatkowo, w wyniku reakcji derywatywacji powstaje pochodna, która często charakteryzuje się większą trwałością niż analit w swojej niezmienionej formie. W przypadku tioli, derywatywacja również zabezpiecza bardzo reaktywną grupę tiolową przed niepożądanymi reakcjami, najczęściej utlenianiem do disiarczków, które mogą zachodzić w czasie oczekiwania próbki jak i podczas jej analizy. Poza tym derywatywacja ma niejednokrotnie na celu nadać cząsteczce analitu odpowiedni stosunek masy do ładunku [24]. W końcowym etapie uzyskujemy zmodyfikowany analit, którego właściwości fizykochemiczne czynią go kompatybilnym z aktualnie stosowaną techniką analityczną. Warto również zwrócić uwagę na fakt, że podawana przez autorów granica wykrywalności (LOD) często nie jest najmniejszym możliwym do poddania derywatywacji stężeniem, lecz została otrzymana poprzez ekstrapolację obserwowanego sygnału dla wyższego stężenia, albo poprzez silne rozcieńczenie już powstałych pochodnych. Prezentując w ten sposób LOD pomija się fakt, że wydajności reakcji derywatywacji zmniejsza się wraz z malejącym stężeniem analitu. Zgodnie z obecną wiedzą nie jest możliwa derywatywacja subnanomolowych ilości analitu za pomocą większości znanych odczynników derywatywujących.

Halogenosulfonylobenzofurazany, bromobimany oraz sole oniove to powszechnie używane odczynniki derywatywujące, które należą do grupy związków posiadających aktywny halogen. Oprócz nich do derywatywacji tioli często stosuje się związki chemiczne z grupy maleimidów, dialdehydów, chinonów, enonów czy aziridin [25, 26]. W prowadzonych badaniach korzystałem z dwóch odczynników derywatywujących, należących do soli oniowych z aktywnym atomem halogenu, bromku 1-benzyl-2-chloropirydyniowego (BCPB) oraz tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholininiowego (CMQT). Oba odczynniki zostały zsyntezowane w naszym laboratorium zgodnie z wcześniej opracowanymi procedurami, BCPB poprzez czwartorzędowanie 2-chloropirydyny bromkiem benzylu [27], natomiast CMQT w wyniku czwartorzędowania 2-chlorochinoliny tetrafluoroboranem trimetylooksoniowym [28]. Odczynniki te nadają się znakomicie do tworzenia pochodnych ze związkami o silnym charakterze nukleofilowym, które zawierają grupę sulfhydrylową. Większość ze związków, które znalazły się w centrum mojego zainteresowania oprócz grupy -SH posiada grupy aminową i karboksylową. Selektywność tych odczynników polega na tym, że w wodnym środowisku reagują tylko z grupą tiolową, kiedy to następuje podstawienie atomu halogenu atomem siarki w pozycji 2 pierścienia (Rys.2). Dodatkowo w wyniku reakcji derywatywacji z CMQT i BCPB powstaje tylko po jednej pochodnej.



Rysunek 2. Schematy reakcji tioli, tiosiarczanów i siarczków z CMQT oraz kwasu dihydroliponowego z BCPB.

Celem prowadzonej reakcji derywatywacji było nie tylko wprowadzenie do cząsteczki ugrupowania absorbującego promieniowanie UV-Vis [**H1-H5**, **H7-H10**], lecz także stabilnego ładunku dodatniego na atomie azotu w pierścieniu pirydyniowym lub chinoliniowym [**H1-H5**, **H10**]. Wypadkowy ładunek pochodnej w przypadku analizowanych przeze mnie związków w zależności od obecności w strukturze cząsteczki jonizowalnych grup karboksylowej i aminowej, zmienia się wraz ze zmianą pH środowiska (Tabela 1). Przykładowo, chinoliniowe pochodne Hcy oraz Cys, w środowisku silnie kwaśnym, posiadają ładunek netto +2, ze względu na protonowanie grupy aminowej oraz supresję jonową grupy karboksylowej. Wraz ze wzrostem pH następuje natomiast spadek ładunku, praktycznie aż do 0. Należy dodatkowo

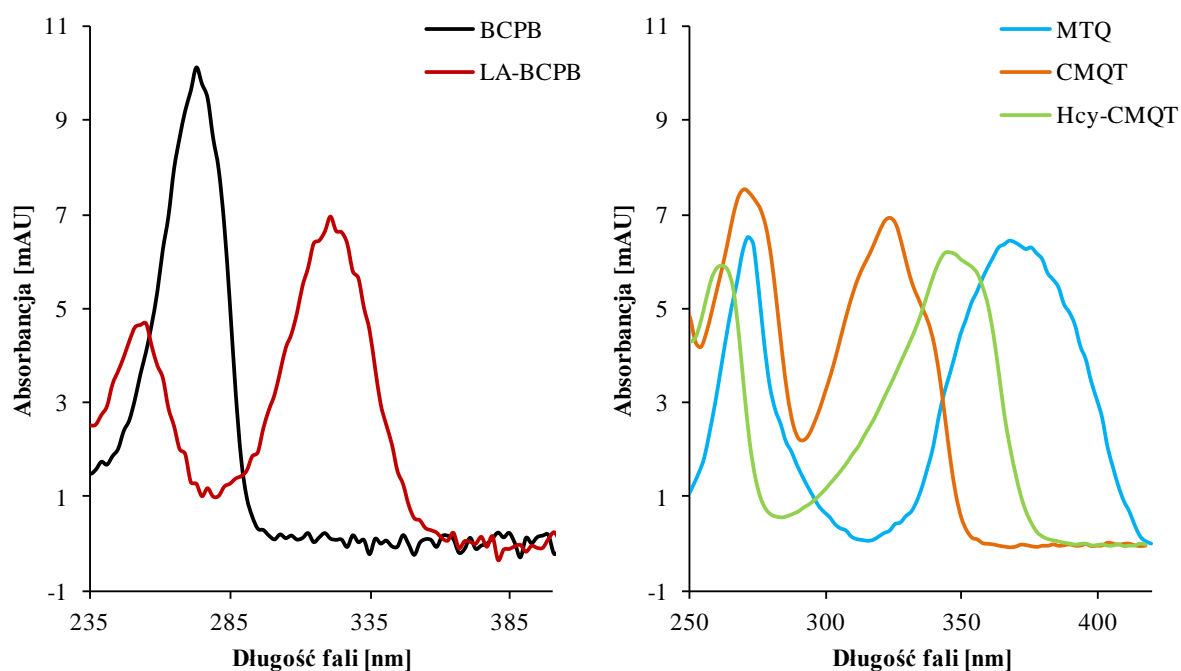
podkreślić, że w wyniku derywatywacji tioli z zastosowaniem CMQT czy BCPB, reaktywna grupa tiolowa przechodzi w stabilną grupę tioeterową, przez co zostaje zabezpieczona przed niepożądanymi reakcjami.

Tabela 1. Zestawienie optymalizowanych parametrów w procedurach przygotowania próbeki.

Pochodna	Procedura przygotowania próbki	Ładunek pochodnej	Literatura
Hcy-CMQT	0,2 mol/L bufor fosforanowy o pH 7,6; redukcja: 0,5 mol/L TCEP w temp. 25°C; czas 30 min; derywatywacja: 0,1 mol/L CMQT, czas 4 min	od +2 do 0	[H1, H5]
Cys-CMQT	2 mol/L Tris/HCl o pH 7,6; redukcja: 0,5 mol/L TCEP w temp. 25°C; czas 15 min; derywatywacja: 0,1 mol/L CMQT, czas 5 min 0,2 mol/L bufor fosforanowy o pH 7,6; redukcja: 0,5 mol/L TCEP w temp. 25°C; czas 30 min; derywatywacja: 0,1 mol/L CMQT, czas 4 min	od +2 do 0	[H3] [H5]
GSH-CMQT	2 mol/L Tris/HCl o pH 7,6; redukcja: 0,5 mol/L TCEP w temp. 25°C; czas 15 min; derywatywacja: 0,1 mol/L CMQT, czas 5 min	od +2 do -1	[H3]
CASH-CMQT	2 mol/L Tris/HCl o pH 7,6; redukcja: 2 mol/L TBP w temp. 60°C; czas 30 min; derywatywacja: 0,1 mol/L CMQT, czas 4 min	od +2 do +1	[H2]
TP-CMQT	0,2 mol/L bufor fosforanowy o pH 7,6; redukcja: 0,1 mol/L TCEP w temp. 25°C; czas 5 min; derywatywacja: 0,1 mol/L CMQT, czas 4 min	od +1 do 0	[H4]
MTQ (H ₂ S + CMQT)	0,2 mol/L roztwór fosforanów o pH 9; homogenizacja: mechaniczna (6000 obr), czas 3 min; derywatywacja: 0,1 mol/L CMQT, czas 3 min	0	[H7]
MTQ (S ₂ O ₃ ²⁻ + CMQT)	0,2 mol/L bufor fosforanowy o pH 2; derywatywacja: 0,1 mol/L CMQT, czas 3 min	0	[H9]
LA-BCPB	ekstrakcja: wytrząsanie próbki z acetonem (1:9, v/v), czas 2 min; 0,025 mol/L bufor boranowy o pH 9; redukcja: 0,25 mol/L TCEP w temp. 25°C; czas 5 min, derywatywacja: 0,1 mol/L BCPB, czas 15 min	od +2 do +1	[H10]

W przypadku metod elektroforetycznych derywatywacja może być realizowana albo przed rozdzielaniem składników próbki (przedseparacyjna), albo bezpośrednio po ich separacji (poseparacyjna). Można zastosować także inny podział na derywatywację przed kapilarą, w kapilarze i za kapilarą. Derywatywację wykonywaną w kapilarze możemy natomiast podzielić na tą, która zachodzi przy wlocie kapilary (at-inlet), w przenikających się strefach (zone-passing) i w całej długości kapilary (throughout-capillary) [23]. W przypadku prezentowanych przeze mnie procedur [H1-H5, H7, H9, H10] wykorzystałem derywatywację przedseparacyjną

wykonywaną poza układem pomiarowym. Otrzymane 2-S-chinoliniowe [**H1-H5**, **H7**, **H9**] oraz 2-S-pirydyniowe [**H10**] pochodne badanych przeze mnie związków charakteryzowały się korzystniejszymi z analitycznego punktu widzenia właściwościami, zarówno spektroskopowymi jak i elektroforetycznymi. Pochodne wykazywały batochromowe przesunięcia maksimum absorpcji względem maksimum absorpcji odpowiedniego odczynnika derywatyżującego (Rys.3). Wartości przesunięć zmieniały się (ok. 20-40 nm) w zależności od zastosowanego odczynnika derywatyżującego oraz analitu. Fakt ten umożliwił mi stosowanie podczas reakcji derywatyżacji, koniecznego w przypadku próbek biologicznych, dużego nadmiaru odczynnika derywatyżującego. Możliwość rejestracji analizy przy znacząco większej analitycznej długości fali niż maksimum absorpcji odczynnika, skutkowało praktycznie brakiem sygnału odczynnika na elektroforegramie, który mógłby utrudniać jego interpretację.



Rysunek 3. Widma UV odczynników derywatyżujących CMQT i BCPB oraz ich pochodnych.

W celu optymalizacji warunków derywatyżacji sprawdziłem wpływ na jej wydajność takich czynników jak temperatura, pH środowiska reakcji, nadmiar zastosowanego odczynnika derywatyżującego oraz czas prowadzenia reakcji. W przypadku 2-S-chinoliniowych pochodnych Hcy, Cys, GSH, CASH oraz TP reakcja przebiegała z największą wydajnością w środowisku zbliżonym do obojętnego (pH 7,6) [**H1-H5**], dla pochodnej siarkowodoru w środowisku alkalicznym (pH 9) [**H7**], natomiast dla tiosiarczanów w szerokim zakresie pH środowiska (pH 2-8) [**H9**]. W przypadku tiosiarczanów i siarkowodoru w reakcji z CMQT otrzymujemy tą samą pochodną MTQ. Pomimo tego, że w moczu człowieka nie powinien być obecny siarkowodór, ustaliłem iż optymalne dla reakcji derywatyżacji tiosiarczanów będzie

środowisko kwaśne (pH 2). Dla 2-S-pirydyniowej pochodnej LA [H10] optymalne okazało się alkaliczne środowisko reakcji (pH 9). Potwierdziłem, że w temperaturze pokojowej reakcja derywatywacji Hcy, Cys, GSH, CASH, TP, siarkowodoru oraz tiosiarczanów z CMQT, praktycznie bez względu na analit, przy 5-cio krotnym nadmiarze odczynnika przebiegała w czasie kilku minut (3-5 min, 25°C), w przypadku reakcji derywatywacji LA z BCPB (5-cio krotny nadmiar) reakcja trwała zdecydowanie dłużej (15 min, 25°C).

Optymalizacja warunków rozdzielania elektroforetycznego oraz zateżenia w kapilarze

Techniki elektromigracyjne, w tym CE, wykazują wiele zalet w stosunku do powszechnie stosowanej wśród technik separacyjnych HPLC. Niewątpliwymi zaletami są bardzo duża rozdzielczość oraz sprawność, stosunkowo krótki czas analizy i niewielkie zużycie odczynników chemicznych. Obok tych zalet, należy wymienić niestety największą wadę technik elektromigracyjnych, którą jest niska czułość stężeniowa. Podczas opracowywania nowych metod wykorzystywałem aparat do CE wyposażony w detektor spektrofotometryczny UV-Vis z matrycą diodową (DAD), a więc charakteryzujący się niezbyt dużą czułością. Większość oznaczanych przeze mnie związków występuje w płynach biologicznych w małym, bądź bardzo małym stężeniu. W celu poprawienia czułości postanowiłem, oprócz reakcji derywatywacji, zastosować cieszące się dużym zainteresowaniem techniki zateżenia analitów bezpośrednio w układzie pomiarowym. Efekt spiętrzania/skupienia analitu w bardzo wąskiej strefie uzyskałem wprowadzając do kapilary dużo większe objętości próbki w porównaniu do metod nie korzystających ze zjawiska zateżenia. Należy podkreślić, że zastosowanie tego rozwiązania nie wymagało ode mnie wprowadzenia praktycznie żadnych modyfikacji w posiadanej aparaturze do CE. Podczas opracowywania nowych metod wykorzystałem różne mechanizmy zateżenia analitów w układzie pomiarowym CE, takie jak spiętrzanie według mechanizmu pseudo-prześciowej izotachoforezy (*tpITP*) [H1-H4], spiętrzanie ze wzmocnieniem pola na drodze manipulacji pH [H5], spiętrzanie na drodze wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola (FASI) [H10], zateżanie przez zmiatanie w MEKC [H7, H9] oraz zateżanie przez połączone mechanizmy FASI oraz zmiatania w MEKC [H6].

Procesy zateżenia oraz separacji są ze sobą bezpośrednio powiązane, zachodzą w tym samym miejscu i czasie lub bezpośrednio jeden po drugim, dlatego optymalizowałem zarówno warunki zateżenia analitów w kapilarze, jak i warunki rozdzielania składników próbki. W tym celu przetestowałem przede wszystkim rodzaj elektrolitu podstawowego, jego stężenie oraz pH, dodatek modyfikatora organicznego, a także temperaturę prowadzenia rozdzielania. Stężenie (siła jonowa) BGE jest ograniczona wymiarami kapilary (długość, średnica wewnętrzna), wydajnością układu termostatującego kapilarę jak i zastosowanym napięciem.

Dobór odpowiedniego stężenia BGE nie był prosty również z tego względu, że miał bezpośredni wpływ także na stopień zażęczenia analitów. Zawsze korzystne było utrzymanie odpowiedniego stosunku przewodnictwa BGE i roztworu próbki, tak aby generowane pole elektryczne było wyższe w strefie próbki i w efekcie promowało zażęczenie na granicy próbka-BGE. Przy doborze pH miałem na celu uzyskanie jak najbardziej korzystnego stosunku ładunku do masy pochodnej. Ze względu na powyższe, podczas oznaczania, w formie chinoliniowych pochodnych, Hcy, Cys i CASH w osoczu [**H1**, **H2**, **H5**], Cys i GSH w sokach owocowych [**H3**] oraz TP w moczu [**H4**], rozdzielanie elektroforetyczne prowadziłem w BGE o niskim pH (0,2-0,25 mol/L roztwory Tris/HCl o pH 2,0-2,1 lub 0,1 mol/L octan litu o pH 4,75). Oznaczanie LA w moczu, w formie pirydyniowej pochodnej, prowadziłem natomiast w 0,05 mol/L buforze boranowym o pH 9 [**H10**]. Powyższe BGE stosowałem bez dodatku modyfikatorów organicznych, które niestety pogarszały rozdzielczość oraz wpływały negatywnie na stopień zażęczenia próbki. W przypadku siarkowodoru oraz tiosiarczanów w wyniku reakcji derywatywacji z CMQT otrzymujemy tą samą pochodną, 1-metylo-2-tiochinolon (MTQ), która nie posiada ładunku w cząsteczce i między innymi z tego powodu w procedurach oznaczania tiosiarczanów w moczu [**H9**] oraz siarkowodoru w tkankach kury [**H8**] wykorzystałem technikę MEKC, opracowaną w założeniu do rozdzielania związków nieposiadających ładunku. W tych przypadkach aby rozdzielanie było jak najbardziej efektywne stosowałem jako BGE alkaliczne roztwory fosforanów o pH 8 i stężeniu 0,05-0,055 mol/L z dodatkiem 0,035-0,040 mol/L SDS oraz 25-26% ACN.

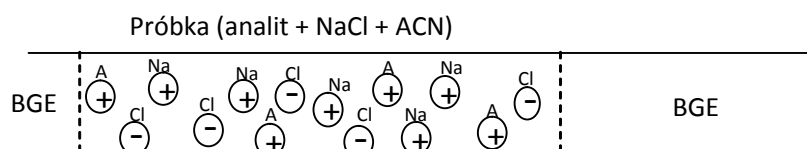
Nie bez znaczenia był także odpowiedni dobór kapilary separacyjnej. W doświadczeniach stosowałem tylko niepowlekanie kapilary krzemionkowe o długościach od 52 cm do 64,5 cm i różnych średnicach wewnętrznych 50 μm - 100 μm . W wyborze rozmiaru kapilary kierowałem się przede wszystkim generowanym natężeniem prądu, a więc ilością wytwarzanego ciepła Joule'a. Odpowiednio wysoki stosunek powierzchni kapilary do jej objętości pozwala na bardzo efektywne odprowadzanie ciepła, a dzięki temu umożliwia stosowanie wysokiego napięcia, zwiększa rozdzielczość oraz skraca czas analizy.

Spiętrzanie według mechanizmu pseudo-przejsiowej izotachoforezy (*tpITP*)

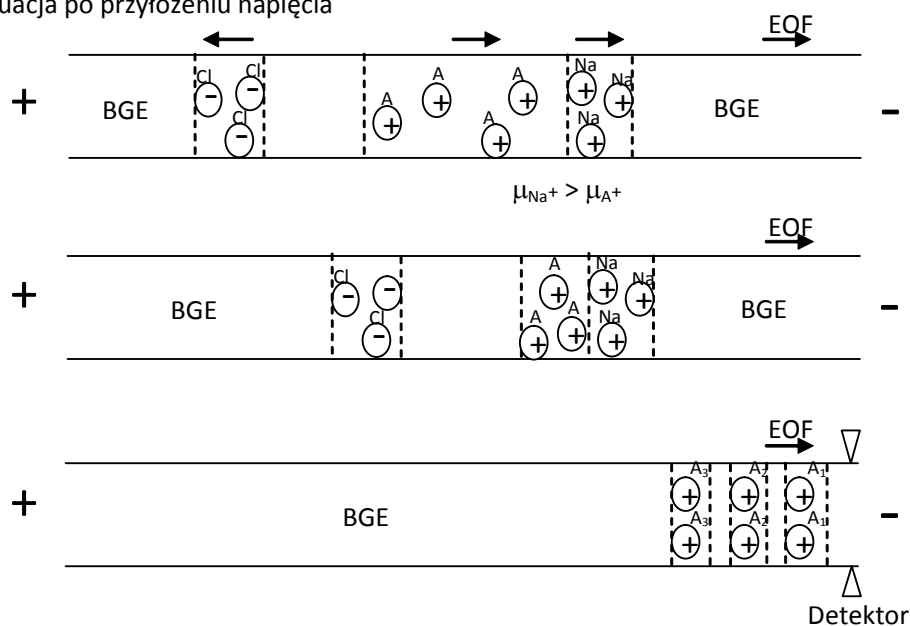
Ten rodzaj zażęczenia bezpośrednio w kapilarze, nazywany także spiętrzaniem z dużą ilością ACN oraz soli, został po raz pierwszy zastosowany do próbek biologicznych przez Shihabi'ego [10, 29, 30]. Próbki tego typu zawierają duże stężenie soli, głównie chlorku sodu w ilości często przekraczającej 1%. Z historycznego punktu widzenia ITP jest jedną z najstarszych odmian technik elektromigracyjnych, w praktyce pozwala na skuteczne zażęczenie związków występujących w próbce w niskim stężeniu obok dużego stężenia jej innych

składników [31]. Shihabi zauważył, że duże zasolenie próbki odbiałczanej poprzez dodatek organicznego rozpuszczalnika nie wpływa negatywnie na wydajność separacji i rozdzielczość, a wręcz przeciwnie duża ilość NaCl efektywnie zwiększa stopień zatężenia analitu. Technika oparta jest na zmieszaniu, w odpowiednim stosunku objętościowym, roztworu próbki zawierającej dużo soli (np. osocze) z rozpuszczalnikiem organicznym. Następnie do kapilary wprowadzana jest duża, w stosunku do klasycznej CZE, objętość próbki (aż do 30% pojemności kapilary). Prawdopodobny mechanizm spiętrzania polega na pseudo-przejściowej izotachoforezie (Rys.4). W ITP po osiągnięciu stanu równowagi wszystkie anality poruszają się z jednakową prędkością, jednakże prędkość jest dyktowana przez ruchliwość jonu wiodącego oraz jego stężenie. Jon kończący zapewnia wysokie natężenie pola elektrycznego oraz zapobiega rozmywaniu pasma analitu. ACN pełni w tym przypadku rolę kończącego pseudo-jonu (stąd nazwa techniki), gdyż podwyższa natężenie pola, nie będąc jonem samym w sobie.

Warunki początkowe



Sytuacja po przyłożeniu napięcia

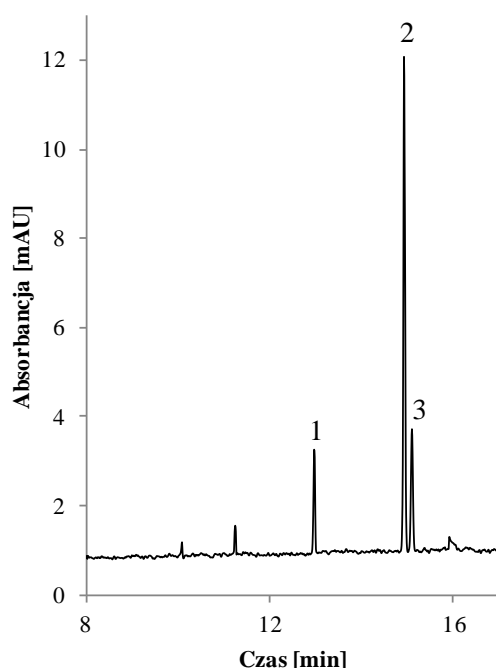


Rysunek 4. Zatężenie przez spiętrzanie według mechanizmu pseudo-przejściowej izotachoforezy [32].

Po włączeniu napięcia małe kationy w próbce (jony soli), ze względu na swoją dużą ruchliwość oraz obecność rozpuszczalnika o niskim przewodnictwie, poruszają się gwałtownie

w kierunku katody, a następnie równie gwałtownie hamują na granicy strefy próbki i BGE. Powstają zatem dwa regiony o różnym natężeniu pola, wysokim w ACN i niskim w soli. W tym samym czasie anality zaczynają również poruszać się szybko w kierunku odpowiedniej elektrody i ulegają spiętrzeniu po dotarciu do strefy o niskim natężeniu pola (strefa jonów soli). Chociaż procesy powodujące zateżanie w *tp*ITP nie są do końca jasne, to nazwanie tego typu spiętrzenia pseudo-przejsciową izotachoforezą jest racjonalne, gdyż małe nieorganiczne kationy pełnią funkcję jonów wiodących, natomiast ACN staje się pseudo-jonem kończącym.

Mechanizm *tp*ITP zastosowałem w kilku przedstawianych procedurach, w celu zateżenia Hcy i CASH w osoczu [H1, H2], TP w moczu [H4] oraz Cys i GSH w soku pomarańczy [H3].



Rysunek 5. Przykładowy elektroforegram próbki moczu analizowanej z wykorzystaniem zateżenia wg mechanizmu pseudo-przejsciowej izotachoforezy. Piki: 1 - CMQT, 2 - Cys-CMQT, 3 - TP-CMQT (40 μ mol/L). Warunki elektroforetyczne: kapilara niepowlekana ($l=56$ cm, 50 μ m), BGE (0,25 mol/L bufor Tris/HCl, pH 2), napięcie 30 kV, analityczna długość fali $\lambda=350$ nm, temperatura 25°C, objętość próbki (20 nl). Zmodyfikowany Rys.2 w pracy [H4].

W toku badań jako rozpuszczalnik organiczny obniżający przewodnictwo próbki wykorzystałem ACN. Konieczne było sprawdzenie dla każdej analizowanej próbki (różne matryce) stosunku objętości próbki do objętości ACN. Potwierdziłem, że optymalny stosunek próbka - ACN wynosi 1:2 (v/v). Sprawdziłem także czy ilość soli obecnych w próbce jest wystarczająca w celu osiągnięcia efektywnego stopnia zateżenia. Ustaliłem iż dodatkowe zwiększenie stężenia soli w próbce nie powodowało zwiększenia powierzchni czy wysokości piku, skutkowało jedynie zwiększeniem natężenia prądu. Następnie wprowadzałem próbkę do kapilary sposobem hydrodynamicznym, zachowując zasadę, iż objętość próbki powinna być

większa niż 1% pojemności kapilary. Objętość wprowadzanej próbki badałem dla każdej z czterech metod osobno, ponieważ analizowane matryce różniły się znacząco swoim składem (osocze, mocz, naturalny sok owocowy). W efekcie optymalizacji ustalona objętość próbki wahała się od 40 nl do 60 nl, co odpowiadało 4% - 6% pojemności kapilary. Główny wpływ na optymalną objętość miały przede wszystkim rodzaj matrycy oraz długość kapilary, które to czynniki wpływały na natężenie prądu płynącego w kapilarze i generowanie ciepła Joule'a. Większe objętości wprowadzonej próbki miały negatywny wpływ na rozdzielanie, powodowały duże poszerzenie sygnałów analitycznych, skutkowały niestabilnym przepływem prądu lub całkowitym jego brakiem.

Zoptymalizowana metoda wykorzystująca omawiany mechanizm zatężania (*tpITP*) umożliwiła mi zmierzenie zawartości Cys oraz GSH w próbkach świeżego soku pomarańczy oraz komercyjnie dostępnych napojów owocowych [H3]. Warto nadmienić, iż oprócz prezentowanej procedury istniały tylko dwie [33, 34] inne metody (w tym jedna dostępna tylko w języku chińskim) oznaczania Cys i GSH w sokach. Uzyskane wyniki zestawilem w Tabeli 2.

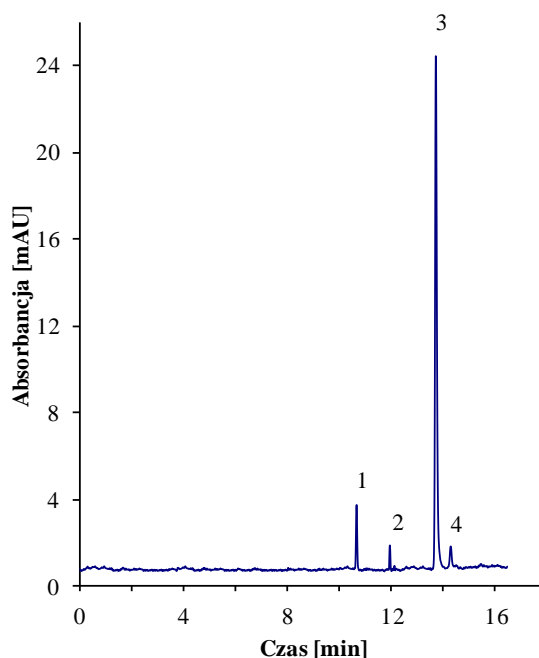
Tabela 2. Zawartości Cys i GSH w sokach owocowych. Na podstawie Tabeli 2 w pracy [H3].

Rodzaj soku	Zawartość \pm SD [$\mu\text{mol/L}$]	
	Cysteina	Glutation
<i>Soki pomarańczowe</i>		
Garden	1,8 \pm 0,1	11,6 \pm 0,2
Tymbark	1,6 \pm 0,1	16,6 \pm 0,1
Fortuna	2,1 \pm 0,1	22,7 \pm 0,3
Cappy	2,1 \pm 0,1	23,4 \pm 0,3
Świeży sok z pomarańczy	6,5 \pm 0,2	44,8 \pm 0,2
<i>Sok winogronowy</i>		
Garden	Nie wykryto	Nie wykryto
<i>Sok jabłkowy</i>		
Fortuna	Nie wykryto	Nie wykryto

Spiętrzanie ze wzmocnieniem pola na drodze manipulacji pH

Próbka biologiczna jest często roztworem o bardzo dużym przewodnictwie, stanowi z tego powodu obiekt trudny do analizy technikami elektromigracyjnymi. Jednym z rozwiązań tego problemu jest obniżenie przewodnictwa próbki podczas jej wprowadzeniu do kapilary poprzez umiejętną manipulację pH kolejno wprowadzanych roztworów. Metodę zatężania poprzez spiętrzanie ze wzmocnieniem pola na drodze manipulacji pH zastosowałem w oznaczaniu Hcy i Cys w próbkach osocza [H5]. W efekcie optymalizacji warunków zatężania, aby można było wprowadzić do kapilary odpowiednio dużą strefę próbki oraz mieć możliwość zastosowania jak największego napięcia, wybrałem kapilarę krzemionkową o stosunkowo dużej długości i średnicy wewnętrznej ($l=91,5$ cm, $L=100$ cm, 75 μm) oraz BGE składający się

z 0,1 mol/L octanu litu o pH 4,75. W sposobie zatężania pierwotnie opracowanym przez Lunte'go [35], w przypadku oznaczania związków o ładunku dodatnim (w moim przypadku 2-S-chinoliniowe pochodne Hcy i Cys), duża objętość próbki zostaje w sposób elektrokinetyczny wprowadzona do kapilary (stosowałem napięcie 20 kV i czas 60 s). W tym samym czasie aniony z BGE (octany), migrują w kierunku przeciwnym niż kationy zamieniając obecne w próbce aniony silnego kwasu. W takich warunkach po zakończeniu procesu wprowadzania, strefa próbki złożona jest prawie wyłącznie z 2-S-chinoliniowych pochodnych Hcy i Cys oraz octanów z BGE. Następnie do kapilary również sposobem elektrokinetycznym wprowadziłem bardzo dużą objętość (20 kV, 96 s) roztworu mocnego kwasu (0,1 mol/L HCl), którego jony H^+ miareczkując octany w strefie próbki powodują gwałtowne obniżenie jej przewodnictwa i w efekcie wzrost natężenia pola elektrycznego. W silnym polu elektrycznym kationowe anality poruszają się szybko do momentu osiągnięcia granicy próbka - BGE, gdzie natężenie pola elektrycznego gwałtownie spada, a 2-S-chinoliniowe pochodne ulegają spiętrzeniu. W późniejszym etapie składniki próbki rozdzielane są na zasadach CZE. Opracowana przeze mnie metoda pozwala na proste, szybkie i dokładne oznaczanie Hcy i Cys, jak również cysteinyloglicyny (CysGly) w osoczu człowieka, co przedstawia elektroforegram na Rys.6.



Rysunek 6. Przykładowy elektroforegram próbki osocza analizowanej z wykorzystaniem zatężania przez spiętrzenie ze wzmocnieniem pola na drodze manipulacji pH. Piki: 1 - CMQT, 2 - Hcy-CMQT (6,48 $\mu\text{mol/L}$), 3 - Cys-CMQT (159,7 $\mu\text{mol/L}$), 4 - CysGly-CMQT. Warunki elektroforetyczne: kapilara niepowlekana ($l=91,5$ cm, 75 μm), BGE (0,1 mol/L octanu litu, pH 4,75), napięcie 30 kV, analityczna długość fali $\lambda=355$ nm, temperatura 25°C, wprowadzanie próbki (20 kV, 60 s). Zmodyfikowany Rys.2 w pracy [H5].

Muszę podkreślić, że według mojej ówczesnej wiedzy była to pierwsza procedura CE wykorzystująca zateżanie przez spiętrzanie ze wzmocnieniem pola na drodze manipulacji pH do jednoczesnego oznaczania Hcy i Cys w płynach biologicznych. Metoda ta umożliwiła mi zmierzenie zawartości Hcy w próbkach osocza pięciu pozornie zdrowych ochotników (trzech mężczyzn i dwóch kobiet) [H5]. Uzyskane wyniki bardzo dobrze korelują z danymi literaturowymi oraz zawartościami otrzymanymi w mojej innej pracy wykorzystującej mechanizm zateżania (*tpITP*) [H1]. Wyniki obu prac [H1 i H5] zestawilem w Tabeli 3.

Tabela 3. Porównanie zawartości Hcy w osoczu człowieka otrzymanych dwoma metodami CE [H1, H5] wykorzystującymi różne mechanizmy zateżania w kapilarze.

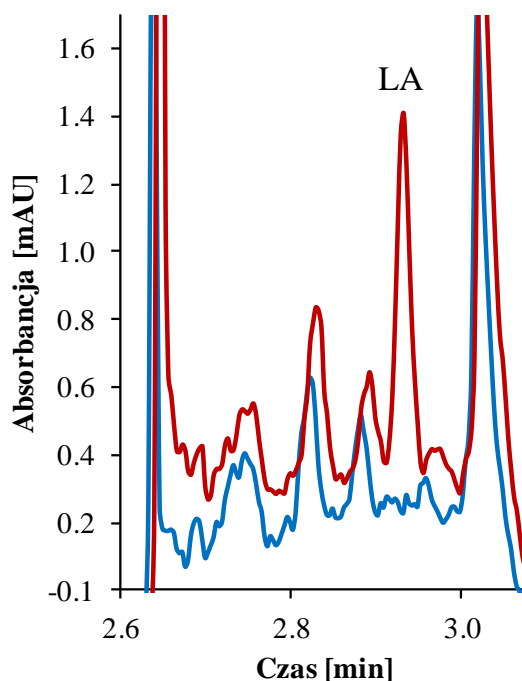
Nr próbki	Płeć (M, K)	Zawartość Hcy ± SD [μmol/L]	Precyzja RSD ^a [%]
<i>Spiętrzanie wg mechanizmu pseudo-przejęciowej izotachoforezy [H1]</i>			
1	K	5,87 ± 0,23	3,4
2	M	6,83 ± 0,21	2,8
3	M	7,90 ± 0,22	2,6
4	M	9,88 ± 0,30	2,8
<i>Spiętrzanie ze wzmocnieniem pola na drodze manipulacji pH [H5]</i>			
1	M	4,95 ± 0,18	3,6
2	M	5,62 ± 0,24	4,2
3	M	6,48 ± 0,19	2,9
4	K	7,95 ± 0,28	3,5
5	K	8,56 ± 0,24	2,8

a) n = 4

Spiętrzanie na drodze wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola (FASI)

Jednym z bardzo prostych w realizacji sposobów zateżania próbki w układzie pomiarowym CE jest wykorzystanie elektrokinetycznego wprowadzenia próbki ze wzmocnieniem pola. Sposób ten wykorzystałem podczas opracowywania metody oznaczania LA w moczu [H10]. FASI posiada pewną zaletę, a mianowicie zastosowanie elektrokinetycznego sposobu wprowadzenia próbki powoduje, że jony są wprowadzane do kapilary na skutek dwóch zjawisk, elektroforezy oraz elektroosmozy. Dzięki temu do kapilary wnikają w większości tylko kationy obecne w próbce, w tym 2-S-pirydyniowa pochodna LA, które migrują w kierunku zgodnym z EOF. Do chwili obecnej są znane tylko trzy inne metody oznaczania LA w różnych matrycach [36-38], niestety nie ma żadnej metody oprócz mojej, która umożliwia analizę moczu na zawartość LA. Zawartość LA mierzyłem w próbkach moczu otrzymanych od ochotników, którzy godzinę wcześniej przyjęli jednorazową dawkę leku zawierającego 100 mg LA. Zmierzone wartości znacznie się różniły i oscylowały od 6,53

$\mu\text{mol/L}$ aż do $73,66 \mu\text{mol/L}$ moczu. Otrzymane wyniki, w celu uwzględnienia różnego rozcieńczenia próbek, przeliczyłem dodatkowo względem zawartości kreatyniny, która będąc produktem ubocznym metabolizmu mięśniowego jest produkowana ze stałą prędkością i wydalana z moczem, można więc na jej podstawie określić "rozcieńczenie" moczu. Zoptymalizowane warunki elektroforetyczne pozwoliły na skuteczne rozdzielanie składników skomplikowanej matrycy jaką jest mocz i oznaczenie LA w formie 2-S-pirydyniowej pochodnej, która jak jest to widoczne na Rys.7 migruje po 2,9 minuty.

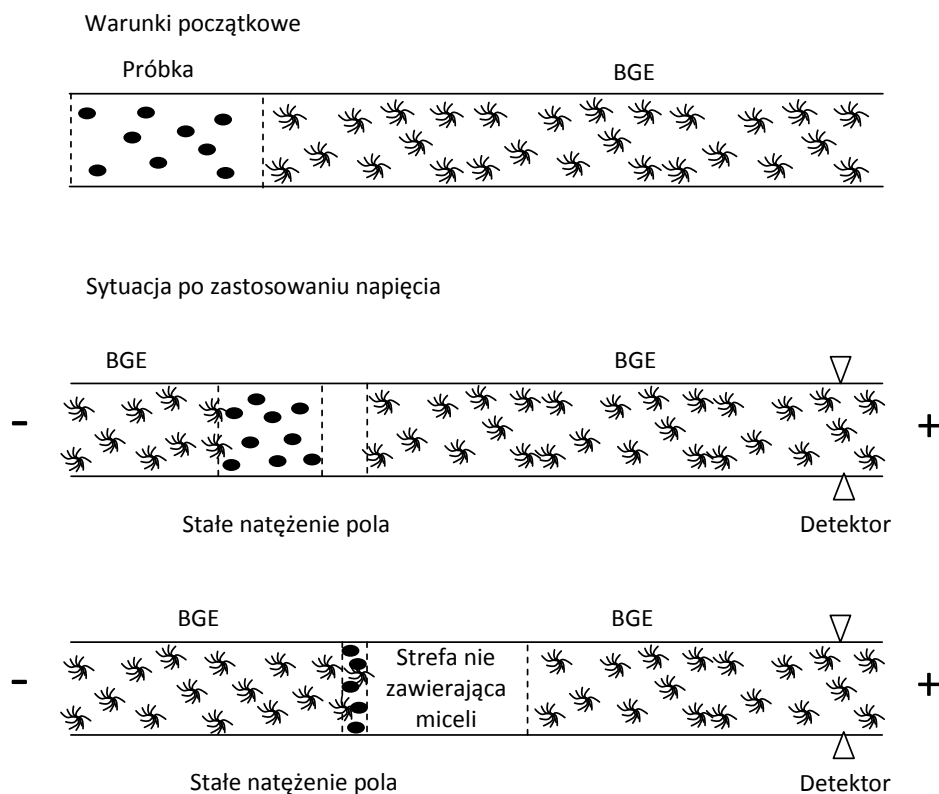


Rysunek 7. Przykładowe elektroforegramy moczu (linia niebieska) oraz moczu od dawcy po doustnym zażyciu LA (linia czerwona). Warunki elektroforetyczne: kapilara niepowlekania ($l=51,5 \text{ cm}$, $75 \mu\text{m}$), BGE ($0,05 \text{ mol/L}$ bufor boranowy, $\text{pH } 9$), napięcie 20 kV , analityczna długość fali $\lambda=322 \text{ nm}$, temperatura 20°C , wprowadzanie próbki (5 kV , 25 s). Zmodyfikowany Rys.2 w pracy [H10].

Zmiatanie w MEKC

Wśród oznaczanych przeze mnie związków znalazły się siarkowodór oraz tiosiarczany. Związki te podobnie jak tiole nie posiadają strukturalnych własności umożliwiających ich efektywną detekcję za pomocą detektora UV-Vis. W związku z powyższym zastosowałem reakcję derywatywacji za pomocą CMQT (Rys.2), w efekcie otrzymując pochodną (MTQ) nie posiadającą ładunku w całym zakresie pH. Odmianą elektromigracyjną z wyboru stała się więc MEKC zaprojektowana właśnie do rozdzielania w polu elektrycznym związków nieposiadających ładunku, lub których efektywny ładunek netto jest równy zero [39]. Jedną z wielu technik zateżania analitów w MEKC jest tzw. zmiatanie, w którym wydajność zateżania zależy od powinowactwa analitu do fazy micelarnej. Im większe powinowactwo tym wyższy

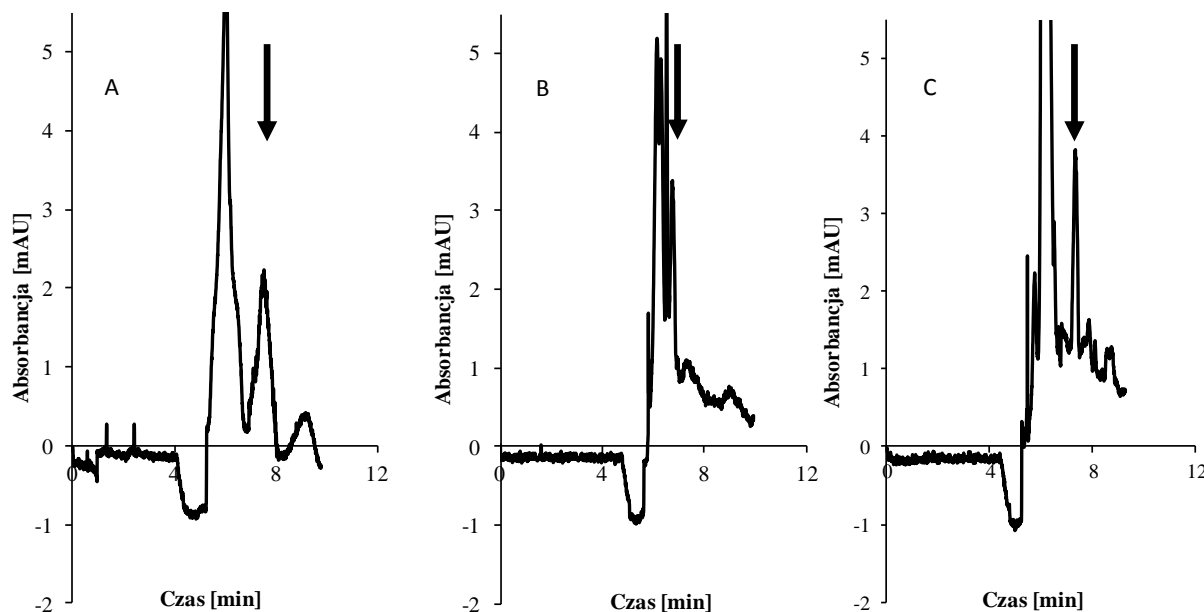
stopień zateżenia [40]. W zjawisku zmiatania miceli, które migrują przez strefę próbki pod wpływem przyłożonego napięcia, zgarniają i spiętrzają anality w wąską strefę (Rys.8). Technika zmiatania w MEKC wykorzystana w opracowanych metodach oznaczania siarkowodoru w tkankach kury [H7] oraz tiosiarczanów w moczu [H9].



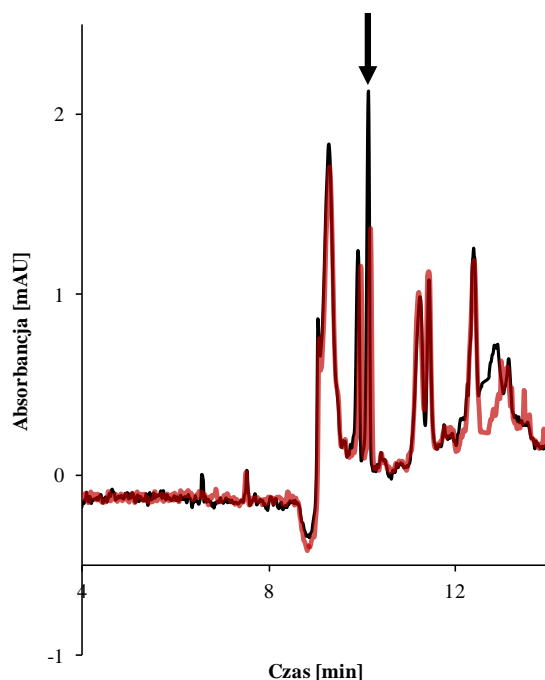
Rysunek 8. Zateżenie przez zmiatanie [41].

Zoptymalizowana przeze mnie procedura zateżenia analitów w kapilarze składała się z czterech głównych kroków: (1) wypełnienia kapilary odpowiednio dobranym elektrolitem (oznaczanie siarkowodoru: 0,05 mol/L bufor fosforanowy o pH 8 z dodatkiem 0,04 mol/L SDS oraz 26% ACN; oznaczanie tiosiarczanów: 0,055 mol/L bufor fosforanowy o pH 8 z dodatkiem 0,035 mol/L SDS oraz 25% ACN); (2) wprowadzenia próbki sposobem hydrodynamicznym od anodowej strony kapilary (oznaczanie siarkowodoru: 50 mbar, 50 s; oznaczanie tiosiarczanów: 50 mbar, 30 s); (3) wywołania pod wpływem przyłożonego napięcia (oznaczanie siarkowodoru: 18 kV; oznaczanie tiosiarczanów: 20,5 kV) zjawiska zmiatania analitów w wąską strefę na granicy BGE i strefy próbki; (4) rozdzielania analitów zgodnie z mechanizmem MEKC. Zastosowanie opisanych warunków pozwoliło efektywnie rozdzielić składniki próbek (tkanki kury, mocz) i oznaczyć siarkowodór oraz tiosiarczany w formie pochodnej MTQ po odpowiednio 7,56 minuty i 10,1 minuty (Rys.9 i Rys.10). Wyznaczona zawartość siarkowodoru w tkankach kury była zależna od rodzaju tkanki i wynosiła od 0,129

do 0,292 $\mu\text{mol/g}$. Zawartość tiosiarczanów w moczu wynosiła natomiast od 3,10 do 39,15 $\mu\text{mol/L}$, a po normalizacji na kreatyninę od 0,45 do 1,92 mmol/mol Crn .



Rysunek 9. Przykładowe elektroforegramy homogenizowanych tkanek kury: A: wątroba (0,22 $\mu\text{mol/g}$); B: żołądek (0,19 $\mu\text{mol/g}$); C: serce (0,29 $\mu\text{mol/g}$). Warunki elektroforetyczne: kapilara niepowlekania ($l=41,5$ cm, 75 μm), BGE (0,05 mol/L bufor fosforanowy, pH 8 z dodatkiem 0,04 mol/L SDS i 26% ACN), napięcie 18 kV, analityczna długość fali $\lambda=375$ nm, temperatura 30°C , wprowadzanie próbki (50 mbar, 50 s). Zmodyfikowany Rys.3 w pracy [H7].

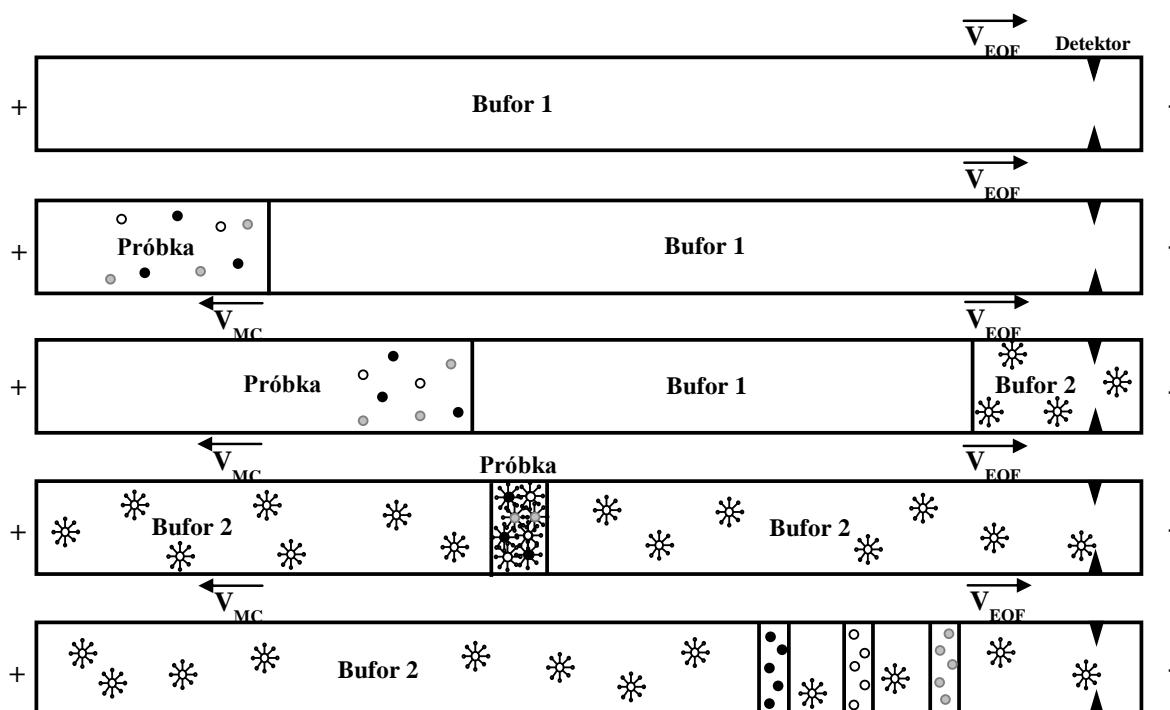


Rysunek 10. Przykładowe elektroforegramy próbek moczu (linia czerwona) oraz moczu doszczepionego 8 $\mu\text{mol/L}$ tiosiarczanu (linia czarna). Warunki elektroforetyczne: kapilara niepowlekania ($l=51,5$ cm, 75 μm), BGE (0,055 mol/L bufor fosforanowy, pH 8 z dodatkiem 0,035 mol/L SDS i 25% ACN), napięcie 20,5 kV, analityczna długość fali $\lambda=375$ nm, temperatura 25°C , wprowadzanie próbki (50 mbar, 30 s). Zmodyfikowany Rys.3 w pracy [H9].

Zaproponowana przeze mnie metodyka [H7] była pierwszą procedurą CE wykorzystującą detekcję UV pozwalającą na oznaczanie siarkowodoru w homogenizowanych tkankach zwierzęcych. Oprócz mojej drugiej procedury [H9], w literaturze dostępna była jeszcze tylko jedna elektroforetyczna metoda z detekcją UV służąca do oznaczania tiosiarczanów w moczu [42].

Spiętrzanie na drodze wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola i zmiatania w MEKC

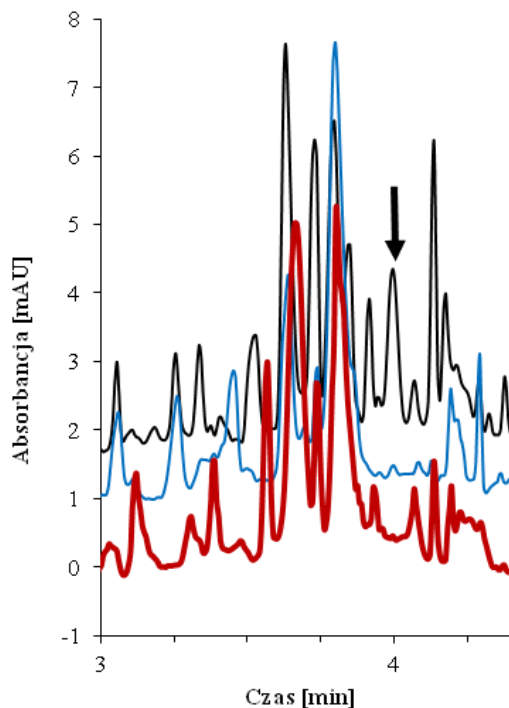
Kolejna metoda, którą opracowałem w toku badań jest bardziej złożona, ponieważ wykorzystuje dwa różne mechanizmy zateżenia wewnątrz kapilary, zachodzące bezpośrednio jeden po drugim. Wykorzystanymi mechanizmami zateżenia są FASI oraz zmiatanie w MEKC, które zastosowane jednocześnie dają zdecydowanie większy wzrost czułości niż spiętrzanie uzyskane przy wykorzystaniu tylko jednego z wspomnianych mechanizmów (Rys.11). Częsteczka HTL w odróżnieniu od opisywanych wcześniej związków w pH poniżej 6,67 posiada ładunek dodatni na grupie aminowej, wykazuje także absorpcję promieniowania UV i może być bezpośrednio wykrywana przy analitycznej długości fali równej 240 nm. Prezentowana metoda znalazła praktyczne zastosowanie w oznaczaniu HTL w moczu [H6].



Rysunek 11. Proponowany mechanizm zateżenia HTL poprzez spiętrzanie na drodze wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola i zmiatania w MEKC. Zmodyfikowany Rys.2 w pracy [H6].

Proponowana procedura zakłada wykorzystanie dwóch różnych systemów buforowych. Początkowo kapilara jest przepłukiwana Buforem 1, w którego skład wchodzi 0,1 mol/L bufor fosforanowy o pH 6. W kolejnym kroku do kapilary jest wprowadzana sposobem elektrokinetycznym (15 kV, 20 s) próbka przygotowana w 0,0075 mol/L roztworze HCl, tak

aby jej pH wynosiło 5,5. Obniżenie pH próbki jest korzystne dla FASI, ponieważ HTL wykazuje w strefie próbki wyższą ruchliwość niż w Buforze 1 (pH 6). Gdy HTL dociera do granicy próbka-Bufor 1 spada jego prędkość migracji, w efekcie czego ulega on spiętrzeniu. Następnie Bufor 1 w fiolkach na obu końcach kapilary jest zamieniany na Bufor 2 (0,1 mol/L bufor fosforanowy o pH 4,75 zawierający dodatkowo 0,1 mol/L SDS i 15% ACN). Wartość pH elektrolitu została dobrana tak, aby przy uwzględnieniu zjawiska elektroosmozy prędkość migracji HTL nieznacznie przewyższała prędkość z jaką w kierunku przeciwnym poruszają się micelle. Po przyłożeniu napięcia 20 kV przy praktycznie wyeliminowanym EOF, micelle wnikając w strefę próbki zmiatają analit i powodują jego zateżenie. Na koniec składniki próbki po wniknięciu w Bufor 2 ulegają rozdzieleniu na zasadach MEKC. Opracowaną procedurę [H6] zastosowałem do analizy próbek moczu na zawartość HTL pobranych od 15 zdrowych ochotników (Rys.12). Zmierzone zawartości HTL w moczu wahały się od 0,129 $\mu\text{mol/L}$ do 0,229 $\mu\text{mol/L}$, a wartość średnia wyniosła $0,170 \pm 0,029 \mu\text{mol/L}$. Otrzymane zawartości są zgodne z wartościami otrzymanymi wcześniej za pomocą metod HPLC, wykorzystujących derywatyzację z aldehydem *o*-ftalowym [43, 44]. Sygnał HTL został zidentyfikowany na podstawie porównania z czasem migracji standardu HTL, na podstawie widma UV oraz na podstawie zaniku sygnału w moczu z dodatkiem NaOH (hydroliza HTL do Hcy).



Rysunek 12. Przykładowe elektroforegramy próbki moczu (linia niebieska), moczu doszczepionego 1 $\mu\text{mol/L}$ HTL (linia czarna) oraz moczu, do którego dodano 0,1 mol/L NaOH (linia czerwona). Warunki elektroforetyczne: kapilara niepowlekaną ($l=51,5 \text{ cm}$, $50 \mu\text{m}$), BGE1 (0,1 mol/L bufor fosforanowy, pH 6), BGE2 (0,1 mol/L bufor fosforanowy, pH 4,75 z dodatkiem 0,1 mol/L SDS i 15% ACN), napięcie 20 kV, analityczna długość fali $\lambda=240 \text{ nm}$, temperatura 25°C , wprowadzanie próbki (15 kV, 20 s). Zmodyfikowany Rys.3 w pracy [H6].

Metoda jest szybka (czas migracji HTL poniżej 4 min), prosta i powtarzalna, nie wymaga derywatywacji analitu, natomiast wykorzystuje jego załężanie w układzie pomiarowym CE oraz prostą, bezpośrednią detekcję UV. Przedstawiona metodyka była pierwszą aplikacją CE do oznaczania HTL w moczu.

Walidacja oraz porównanie współczynników wzmocnienia czułości metody

Wszystkie przedstawione metody podlegały skróconej walidacji zgodnie z kryteriami podawanymi dla metod analizy próbek biologicznych [45]. Podczas walidacji zawsze sprawdzałem takie parametry metody jak zakres liniowości, granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ), precyzję wyrażoną względnym odchyleniem standardowym (RSD), dokładność wyrażoną odzyskiem oraz specyficzność. Poza tym, ponieważ w przypadku każdej z procedur stosowałem załężanie analitów w kapilarze, zależało mi na określeniu o ile udało mi się poprawić czułość metody i obniżyć granicę wykrywalności. LOD i LOQ wyznaczałem poprzez porównanie wysokości sygnału analitycznego względem szumów linii podstawowej. Zestawienie otrzymanych parametrów walidacyjnych dla poszczególnych metod przedstawiłem w Tabeli 4.

Tabela 4. Zestawienie parametrów skróconej walidacji dla opracowanych metod.

Matryca	Analit	Zakres liniowości [μmol/L]	RSD [%]	Odzysk [%]	LOD [μmol/L]	LOQ [μmol/L]	Literatura
Osocze	Hcy	5,0 - 80	1,7 - 6,7	99,4 - 103,2	1,0	3,0	[H1]
Osocze	CASH	2,5 - 20	2,8 - 5,4	95,0 - 99,7	0,8	2,5	[H2]
Soki owocowe	Cys GSH	2,5 - 30	3,8 - 6,7 1,1 - 3,6	94,4 - 105,2 94,7 - 107,7	1,0	2,5	[H3]
Mocz	TP	5,0 - 160	1,2 - 7,1	96,8 - 101,2	1,5	5,0	[H4]
Osocze	Hcy Cys	2,0 - 20 20 - 300	2,5 - 8,0 1,1 - 1,8	98,8 - 103,7 99,0 - 100,6	0,7	2,0	[H5]
Mocz	HTL	0,1 - 1,0	3,2 - 6,1	94,7 - 101,8	0,09	0,1	[H6]
Tkanki	H ₂ S	0,15 - 2,0 ^{a)}	2,4 - 6,3	95,7 - 110,8	0,05 ^{a)}	0,12 ^{a)}	[H7]
Mocz	S ₂ O ₃ ²⁻	4,0 - 64	1,6 - 5,4	98,1 - 102,7	2,0	4,0	[H9]
Mocz	LA	2,5 - 80	1,1 - 8,4	95,4 - 100,3	1,2	2,5	[H10]

a) stężenie wyrażone w [μmol/g]

Istnieje przynajmniej kilka sposobów określania stopnia załężenia analitu, jednak najprostszym, wiarygodnym i dość powszechnie stosowanym jest wyznaczenie dla danej

procedury tzw. współczynnika zwiększenia czułości metody (ang. sensitivity enhancement factor, SEF). Wydajność zateżenia analitu w próbce można wyznaczyć poprzez porównanie powierzchni lub ewentualnie wysokości sygnału analitycznego otrzymanego w procedurze przeprowadzonej z konwencjonalnym sposobem wprowadzania próbki (mała objętość próbki) z powierzchnią piku otrzymanego w metodzie drugiej, wykorzystującej etap zateżenia analitu. Podawane w literaturze wartości SEF są bardzo różne, przeważnie wahają się od kilkunastu do kilkuset, chociaż zdarzają się opracowania podające SEF liczone w tysiącach i więcej. Takie duże różnice w wartościach SEF zależą przede wszystkim od rodzaju próbki, którą się analizuje, sposobu jej przygotowania do analizy oraz wykorzystywanej techniki zateżenia. Otrzymane w opracowanych przeze mnie metodach współczynniki SEF oczywiście różnią się od siebie, ale różnice te nie są bardzo duże (od 21,1 do 69,6). Wynika to z faktu, iż analizowałem próbki biologiczne o podobnym skomplikowaniu matrycy oraz stosowałem składające się z podobnych etapów procedury przygotowania tych próbek. Odpowiednie porównanie przedstawiłem w Tabeli 5.

Tabela 5. Zestawienie uzyskanych współczynników wzmocnienia czułości metody (SEF).

Metoda	Technika zateżenia	SEF
Oznaczenie Hcy w osoczu [H1]	Spiętrzanie według mechanizmu pseudo przejściowej izotachoforezy (<i>tpITP</i>)	50,5
Oznaczenie CASH w osoczu [H2]	Spiętrzanie według mechanizmu pseudo przejściowej izotachoforezy (<i>tpITP</i>)	43,3
Oznaczenie Cys i GSH w soku pomarańczy [H3]	Spiętrzanie według mechanizmu pseudo przejściowej izotachoforezy (<i>tpITP</i>)	45,1
Oznaczenie TP w moczu [H4]	Spiętrzanie według mechanizmu pseudo przejściowej izotachoforezy (<i>tpITP</i>)	39,6
Oznaczenie Hcy i Cys w osoczu [H5]	Spiętrzanie ze wzmocnieniem pola na drodze manipulacji pH	55,8
Oznaczenie HTL w moczu [H6]	Spiętrzanie na drodze wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola (FASI) i zmiatania w MEKC	69,6
Oznaczenie siarkowodoru w tkankach kury [H7]	Zmiatanie w MEKC	51,3
Oznaczenie tiosiarczanów w moczu [H9]	Zmiatanie w MEKC	59,5
Oznaczenie LA w moczu [H10]	Spiętrzanie na drodze wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola (FASI)	21,1

Główne osiągnięcia

Opracowałem, walidowałem i aplikowałem nowe elektroforetyczne metody analizy biologicznych próbek z wykorzystaniem zateżania analitów on-line:

- metoda oznaczania homocysteiny w osoczu oparta na CZE z zateżaniem przez *tpITP* [H1],
- metoda oznaczania cysteaminy w osoczu oparta na CZE z zateżaniem przez *tpITP* [H2],
- metoda oznaczania cysteiny i glutationu w soku pomarańczy oparta na CZE z zateżaniem przez *tpITP* [H3],
- metoda oznaczania tioproniny w moczu oparta na CZE z zateżaniem przez *tpITP* [H4],
- metoda oznaczania homocysteiny i cysteiny w osoczu oparta na CZE z zateżaniem przez spiętrzanie ze wzmocnieniem pola na drodze manipulacji pH [H5],
- metoda oznaczania tiolaktonu homocysteiny w moczu oparta na MEKC z zateżaniem przez połączone mechanizmy FASI oraz zmiatania [H6],
- metoda oznaczania siarkowodoru w tkankach kury oparta na MEKC z zateżaniem przez zmiatanie [H7],
- metoda oznaczania tiosiarczanów w moczu oparta na MEKC z zateżaniem przez zmiatanie [H9],
- metoda oznaczania kwasu liponowego w moczu oparta na kapilarnej elektroforezie strefowej z zateżaniem przez FASI [H10].


Mając na względzie wykorzystanie do analizy techniki kapilarnej elektroforezy, optymalizowałem procedury przygotowania próbek biologicznych o różnym stopniu skomplikowania:

- osocza w celu oznaczania homocysteiny [H1, H5], cysteiny [H5] oraz cysteaminy [H2],
- moczu na zawartość tioproniny [H4], tiolaktonu homocysteiny [H6], tiosiarczanów [H9] oraz kwasu liponowego [H10],
- tkanek stałych do oznaczania siarkowodoru [H7],
- soku pomarańczy w celu wyznaczenia stężeń cysteiny i glutationu [H3].

6. Krótkie omówienie pozostałych osiągnięć

Moje pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze zostały opublikowane w 11 oryginalnych i 2 przeglądowych artykułach naukowych oraz 6 rozdziałach w monografiach (3

w języku angielskim i 3 w języku polskim). Jestem również jednym ze współautorów słownika pięcioletniego p.t. "Chromatografia i techniki elektromigracyjne", przygotowanego pod redakcją prof. Z. Witkiewicza oraz dr E. Śliwki. Większość moich osiągnięć naukowo-badawczych została również zaprezentowana w formie 54 prezentacji na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych. Tematyka większości prac z mojego pozostałego dorobku naukowo-badawczego dotyczy opracowywania nowych elektroforetycznych lub chromatograficznych metod analizy próbek biologicznych na zawartość związków posiadających w swojej budowie grupę -SH, z zastosowaniem różnych technik zateżenia analitów. Osiągnięcia naukowe, których byłem współautorem zaowocowały siedmioma Nagrodami zespołowymi I stopnia Rektora UŁ w latach 1998, 1999, 2007, 2009, 2011, 2012, 2015. W roku 2013 oraz 2016 byłem członkiem komitetu organizacyjnego krajowej konferencji chromatograficznej "Zastosowanie technik chromatograficznych w analizie środowiskowej i klinicznej". W latach 2012-2016 pełniłem funkcję sekretarza Wydziałowej Komisji Wyborczej, a od roku 2008 do chwili obecnej jestem członkiem Wydziałowej Komisji ds. Egzaminów Dyplomowych. Brałem również czynny udział w popularyzacji nauki poprzez m.in. wykład dla uczniów szkół ponadgimnazjalnych w ramach *Akademii Ciekawej Chemii*, inicjatywy edukacyjnej organizowanej corocznie przez Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Szczegółowy wykaz innych osiągnięć znajduje się w załączniku 3 wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.



Literatura

- [1] Buszewski B., Dziubakiewicz E., Szumski M., (Eds.), Electromigration Techniques - Theory and Practice, Springer Series in Chemical Physics 105, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013, ISBN 978-3-642-35042-9.
- [2] Witkiewicz Z., Śliwka E., (Red.), Chromatografia i techniki elektromigracyjne - słownik pięcioletni, Wydawnictwo Naukowe WNT, Warszawa, 2016, ISBN 978-83-7926-308-0.
- [3] Grochocki W., Markuszewski M.J., Quirino J.P., Different detection and stacking techniques in capillary electrophoresis for metabolomics, *Analytical Methods* 8 (2016) 1216-1221.
- [4] Slampowa A., Mala Z., Gebauer P., Bocek P., Recent progress of sample stacking in capillary electrophoresis (2014-2016), *Electrophoresis* 38 (2017) 20-32.
- [5] Breadmore M.C., Wuethrich A., Li F., Phung S.C., Kalsoom U., Cabot J.M., Tehranirokh M., Shallan A.I., Keyon A.S.A., See H.H., Dawod M., Quirino J.P., Recent advances in

enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips (2014–2016), *Electrophoresis* 38 (2017) 33-59.

[6] Lacna J., Foret F., Kuban P., Capillary electrophoresis in the analysis of biologically important thiols, *Electrophoresis* 38 (2017) 203-222.

[7] Polson C., Sarkar P., Incledon B., Raguvaran V., Grant R., Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 785 (2003) 263-275.

[8] Denoroy L., Parrot S., Analysis of amino acids and related compounds by capillary electrophoresis, *Sep. Purif. Rev.* 46 (2017) 108-151.

[9] Furne J., Springfield J., Koenig T., DeMaster E., Levitt M.D., Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa, *Biochem. Pharmacol.* 62 (2001) 255–259.

[10] Shihabi Z.K., Stacking and discontinuous buffers in capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis* 21 (2000) 2872–2878.

[11] Jakubowski H., Mechanism of the condensation of homocysteine thiolactone with aldehydes, *Chem. Eur. J.* 12 (2006) 8039–8043.

[12] Carlucci F., Tabucchi A., Capillary electrophoresis in the evaluation of aminothiols in body fluids. *J. Chromatogr. B*, 877 (2009) 3347-3357.

[13] Packer J.E., [in] Patai S. [Ed.], *The chemistry of thiol group*, Wiley & Sons, New York, 1974.

[14] Miranda M.P., del Rio R., del Valle M.A., Faundez M., Armijo F., Use of fluorine-doped tin oxide electrodes for lipoic acid determination in dietary supplements, *J. Electroanal. Chem.* 668 (2012) 1-6.

[15] Rochette L., Ghibu S., Richard C., Zeller M., Cottin Y., Vergely C., Direct and indirect antioxidant properties of α -lipoic acid and therapeutic potential, *Mol. Nutr. Food Res.* 57 (2013) 114-125.

[16] Kumar S., Budhwar R., Nigam A., Priya S., Cytoprotection against Cr(6+)-induced DNA damage by alpha-lipoic acid: implications in reducing occupational cancer risk, *Mutagenesis* 24 (2009) 495-500.

[17] Diesel B., Kulhanek-Heinze S., Holtje M., Brandt B., Holtje H.D., Vollmar A.M., Kiemer A.K., Alpha-lipoic acid as a directly binding activator of the insulin receptor: protection from hepatocyte apoptosis, *Biochemistry* 46 (2007) 2146-2155.

[18] Gahl W.A., Cystinosis, *Pediatr. Nephrol.* 6 (2009) 1019-1038.

[19] Van't Hoff W.G., Baker T., Dalton R.N., Duke L.C. et al., Effects of oral phosphocysteamine and rectal cyseamine in cystinosis, *Arch. Dis. Child.* 66 (1991) 1434-1437.

- [20] Ricci G., Nardini M., Chiaraluce R., Dupre S., Cavallini D., Detection and determination of cysteamine at the nanomole level. *J. Appl. Biochem.* 5 (1983) 320-329.
- [21] Gillet P., Gavriloff C., Hercelin B., Salles M.F., Nicolas A., Netter P., Pharmacokinetics of tiopronin after repeated oral administration in rheumatoid arthritis, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 9 (1995) 205-206.
- [22] Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W., *Biochemia Harpera*, PZWL, Warszawa, 1994.
- [23] Hagan R.L., Determination of plasma homocysteine by HPLC with fluorescence detection: A survey of current methods, *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993) 2701-2714.
- [24] Waterval J.C.M., Lingeman H., Bult A., Underberg W.J.M, Derivatization trends in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 21 (2000) 4029-4095.
- [25] Furmaniak P., Wyszczelska-Rokiel M., Kubalczyk P., Głowacki R., Zastosowanie soli chinoliniowych i pirydyniowych do oznaczania wybranych związków siarki w próbkach biologicznych, *Wiad. Chem.* 68 (2014) 211-232.
- [26] Głowacki R., Wykorzystanie derywatywacji w analizie próbek biologicznych na zawartość aminotioili techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV-VIS, *Wiad. Chem.* 63 (2009) 1049-1071.
- [27] Bald, E., Sypniewski, S., Drzewoski, J., Stępień, M., Application of 2-halopyridinium salts as ultraviolet derivatization reagents and solid-phase extraction for determination of captopril in human plasma by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 681 (1996) 283-289.
- [28] Bald, E., Głowacki, R., 2-Chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate as an effective and thiol specific UV tagging reagent for liquid chromatography, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 24 (2001) 1323-1339.
- [29] Shihabi Z.K., Hinsdale M.E., Cheng C.P., Analysis of glutathione by capillary electrophoresis based on sample stacking, *Electrophoresis* 22 (2001) 2351-2354.
- [30] Shihabi Z.K., Transient pseudo-isotachophoresis for sample concentration in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 23 (2002) 1612-1617.
- [31] Breadmore, M. C., Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips, *Electrophoresis* 28 (2007) 254-281.
- [32] Kubalczyk P., Bald E., Methods of Analyte Concentration in a Capillary, in: Buszewski B., Dziubakiewicz E., Szumski M. (Eds.), *Electromigration Techniques - Theory and Practice*, Springer Series in Chemical Physics 105, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013, pp. 215-235.

- [33] Treilhou M., Arellano M., Bras M.H., Simeon N., Bayle C., Poinot V., Couderc F., Application of capillary electrophoresis and UV detection or laser-induced fluorescence detection to beverages, *LC-GC Europe* 14 (2001) 752-759.
- [34] Huang Y., Duan J., Yang M., Liu L., Chen G., Determination of glutathione in tomatoes and cucumbers by capillary electrophoresis, *Chin. J. Chromatogr. (Se Pu)* 21 (2003) 510-512.
- [35] Hadwiger M.E., Torchia S.R., Park S., Biggin M.E., Lunte C.E., Optimization of the separation and detection of the enantiomers of isoproterenol in microdialysis samples by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis using electrochemical detection, *J. Chromatogr. B* 681 (1996) 241-249.
- [36] Li H., Kong Y., Chang L., Feng Z., Chang N., Liu J., Long J., Determination of lipoic acid in biological samples with acetonitrile-salt stacking method in CE, *Chromatographia* 77 (2014) 145-150.
- [37] Sitton A., Schmid M.G., Gubitz G., Aboul-Enein H.Y., Determination of lipoic acid in dietary supplement preparations by capillary electrophoresis, *J. Biochem. Biophys. Methods* 61 (2004) 119-124.
- [38] Panak, K.C., Ruiz O.A., Giorgier S.A., Dioz L.E., Direct determination of glutathione in human blood by micellar electrokinetic chromatography: Simultaneous determination of lipoamide and lipoic acid, *Electrophoresis* 17 (1996) 1613-1616.
- [39] Bald E., Kubalczyk P., Micellar electrokinetic chromatography, in: Buszewski B., Dziubakiewicz E., Szumski M. (Eds.), *Electromigration Techniques - Theory and Practice*, Springer Series in Chemical Physics 105, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013, pp. 77-92.
- [40] Burgi D.S., Giordano B.C., w: Landers J.P. (Ed.), *Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques*. 3rd edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA 2008, p. 413.
- [41] Aranas A.T., Guidote Jr. A.M., Quirino J.P., Sweeping and new on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 175-185.
- [42] Rhemrev-Boom M.M., Determination of anions with capillary electrophoresis and indirect ultraviolet detection, *J. Chromatogr. A*, 680 (1994) 675-684.
- [43] Chwatko G., Jakubowski H., Urinary excretion of homocysteine-thiolactone in humans, *Clin. Chem.* 51 (2005) 408-415.
- [44] Głowacki R., Bald E., Jakubowski H., An on-column derivatization method for the determination of homocysteine-thiolactone and protein N-linked homocysteine, *Amino Acids* 41 (2011) 187-194.

[45] Braggio S., Barnaby R.J., Grossi P., Cugola M., A strategy for validation of bioanalytical methods, J. Pharm. Biomed. Anal. 14 (1996) 375-388.