

**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ**



Wojciech Grochocki

**Metody zwiększenia czułości elektroforezy kapilarnej
w analizie próbek biologicznych**

Praca wykonana
w Zakładzie Biofarmacji i Farmakokinetyki
Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
w celu uzyskania stopnia doktora nauk
farmaceutycznych

Promotor pracy:

Prof. dr hab. Michał Jan Markuszewski

Gdańsk 2019

Streszczenie w języku polskim

Elektroforeza kapilarna (ang. *capillary electrophoresis*, CE) jest techniką separacyjną, w której mechanizm rozdzielania opiera się na różnicach w prędkościach elektroforetycznych analitów pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego. Główną zaletą CE jest jej wysoka zdolność rozdzielcza oraz małe zapotrzebowanie na odczynniki chemiczne, dzięki czemu doskonale wpisuje się ona w nurt 'zielonej chemii analitycznej'. Najczęściej wymienianą wadą CE jest z kolei stosunkowo niska czułość, szczególnie w przypadku wykorzystania detektora spektrofotometrii UV-Vis. Dlatego też, tematyka niniejszej rozprawy dotyczy opracowania narzędzi pozwalających na poprawę czułości CE bez konieczności modyfikowania dostępnych na rynku systemów do CE. Ponadto, przedstawione prace skupiały się uproszczeniu procedury przygotowania próbek do analiz CE ze szczególnym uwzględnieniem znacznego ograniczenia lub całkowitej eliminacji wykorzystania toksycznych odczynników chemicznych.

Pierwszym sposobem, umożliwiającym obniżenie granic wykrywalności i oznaczalności (ang. *limit of detection and quantification*, LOD and LOQ) w CE, było opracowanie dwóch nowych technik wzbogacania analitów bezpośrednio w kapilarze. Połączenie spiętrzania we wzmocnionym polu elektrycznym ze zmiataniem i spiętrzaniem na drodze destabilizacji za pomocą modyfikatora organicznego w trzy-etapową procedurę spiętrzania pozwoliło na poprawę czułości o trzy rzędy wielkości w porównaniu do konwencjonalnej CE wyposażonej w detektor spektrofotometrii UV-Vis. Drugą opracowaną techniką było spiętrzanie analitów na drodze destabilizacji miceli za pomocą cyklodekstryn (ang. *micelle to cyclodextrin stacking*, MCDS), dzięki której czułość została zwiększona o dwa rzędy wielkości. W obu przypadkach, mechanizm wzbogacania analitów o budowie jonowej został dokładnie opisany i potwierdzony eksperymentalnie. Ponadto, aplikacyjność nowych technik została zademonstrowana na przykładzie próbek biologicznych.

Kolejnym podejściem, pozwalającym na oznaczanie analitów występujących na niskim poziomie stężeń, było sprzężenie CE z detektorem fluorescencji wzbudzanej za pomocą diod elektroluminescencyjnych (ang. *light-emitting diode induced fluorescence*, LEDIF). Metoda CE-LEDIF, po wcześniejszej optymalizacji i walidacji, została wykorzystana do analizy związków o budowie pterynowej w próbkach moczu. W porównaniu do wcześniejszych doniesień literaturowych, uzyskane wartości LOD i LOQ były 10-krotnie niższe w odniesieniu do analizy przy użyciu CE z detektorem spektrofotometrii UV-Vis

oraz 400-krotnie wyższe od analizy CE z detektorem fluorescencji wzbudzonej laserowo (ang. *laser-induced fluorescence*, LIF) skonstruowanym w laboratorium.

Ostatnią opracowaną techniką było sprzężenie CE z detektorem konduktometrii bezprzewodowej (C4D) w celu jednoczesnego oznaczania kreatyniny i octanów w próbkach moczu. Zastosowanie CE-C4D pozwoliło na zastosowanie bardzo prostej procedury przygotowania próbki moczu, czyli rozcieńczenia jej metanolem w celu wytrącenia białek, zaś otrzymany supernatant wprowadzano bezpośrednio do kapilary.

Wszystkie opisane powyżej techniki charakteryzowały się minimalnym zapotrzebowaniem na rozpuszczalniki organiczne, rzędu mikrolitrów na próbkę, dzięki czemu z zachowaniem wysokiej czułości analizy znacznie zredukowano ilość toksycznych odpadów. Ponadto, w przypadku MCDS, dzięki wykorzystaniu cyklodekstryn całkowicie wyeliminowano konieczność zastosowania rozpuszczalników organicznych, zachowując efekt wzbogacenia próbki na takim samym poziomie.

Wyniki przeprowadzonych badań jednoznacznie dowiodły wysokiego potencjału CE jako wysokosprawnej, czulej i przyjaznej środowisku techniki analitycznej. Znaczne obniżenie wartości LOD i LOQ można uzyskać w prosty, niewymagający modyfikacji komercyjnie dostępnych systemów do CE, sposób. Dzięki temu, szeroka grupa odbiorców zyskuje dostęp do narzędzi pozwalających na oznaczanie analitów występujących na niskim poziomie stężeń.

Streszczenie w języku angielskim

Capillary electrophoresis (CE) is an analytical technique where analytes are separated based on the differences in their electrophoretic mobilities under application of electric field. The main advantage of CE is high resolution and low chemicals consumption and thus, CE is considered as 'green analytical technique'. On the other hand, low sensitivity is the most cited drawback of CE, especially when UV-Vis detector is used. Therefore, the research presented in this thesis was focused on developing new analytical tools that allow enhance the sensitivity of CE without necessity of any modifications of commercially available CE systems. In addition, emphasis was on simplifying sample preparation for CE analysis, particularly on reduction or elimination of usage of organic solvents.

The first solution which allows to lower limit of detection and quantification (LOD and LOQ) was development of two new on-line preconcentration techniques. Coupling field-amplified sample injection, sweeping and micelle to solvent stacking into clearly defined, three-step stacking procedure improved the sensitivity about three-orders of magnitude compare to conventional sample injection in CE analysis with UV detection. Another technique was 'micelle to cyclodextrin stacking (MCDS)' where two-orders of magnitude sensitivity improvement was achieved. In both cases, the mechanism of analytes focusing was studied thoughtfully and confirmed experimentally. In addition, the applicability of the developed techniques was demonstrated in the analysis of biological samples.

The second approach that enhanced the sensitivity in analysis of metabolites present in a sample at low concentration levels was coupling CE with light-emitting diode induced fluorescence (LEDIF) detector. After optimisation and validation, the developed CE-LEDIF method was used to determine pterin compounds in human urine samples. Compare to the previously reported studies, the LOD and LOQ values obtained by using CE-LEDIF method were 10 times lower than CE-UV approach and 400 times higher than CE coupled with house-built laser-induced fluorescence (LIF) detector.

The last technique presented in this thesis was combining CE with capacitively-coupled contactless conductivity detector (C4D) for the simultaneous determination of creatinine and acetate in human urine samples. CE-C4D method allowed to simplify sample preparation that that required dilution of urine with methanol only. Afterwards, the supernatant was injected directly into the capillary.

All discussed above approaches are characterised by minimum organic solvent requirement, in microliters per sample. Thus, the total amount of toxic waste generated was significantly

reduced whereas, the high sensitivity of analysis was preserved. In addition, the usage of organic modifiers was completely eliminated in MCDS technique by employing native cyclodextrin as mobility reversal agent that provided the same sensitivity enhancement effect. The research presented in this thesis has proven the potential of CE as a high-performance, sensitive, and environment-friendly analytical technique. The sensitivity improvement can be simply achieved by using CE instruments available on the market without any further modifications. Therefore, a broad scientific community can access the analytical tools that allow for determination of analytes present in a sample at low concentration levels.