

Katedra i Zakład Toksykologii
Wydział Farmaceutyczny
Gdański Uniwersytet Medyczny



Dr n. farm. inż. Szymon Dziomba

Załącznik nr 2
Autoreferat w języku polskim

Gdańsk 2019

Spis treści

1. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE	3
2. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH.....	3
3. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA STANOWIĄCEGO PODSTAWĘ UBIEGANIA SIĘ O STOPIEŃ NAUKOWY DOKTORA HABILITOWANEGO	3
3.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	3
3.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	3
3.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	4
3.3.1. Wprowadzenie	4
3.3.2. Cel badań	7
3.3.3. Omówienie wyników badań	8
3.3.4. Podsumowanie.....	15
4. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWA.....	16
4.1. Działalność naukowa przed uzyskaniem tytułu doktora nauk farmaceutycznych	16
4.2. Działalność naukowa po uzyskaniu tytułu doktora nauk farmaceutycznych	17
5. DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA.....	17
6. LITERATURA.....	18

1. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

Dyplom inżyniera

Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, 2012 rok, kierunek biotechnologia, spec. biotechnologia leków. Praca inżynierska: *Metody wzbogacania analitu w kapilarze z zastosowaniem wysokosprawnych technik elektromigracyjnych*. Promotor: prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik.

Dyplom magistra farmacji

Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny, 2011 rok. Praca magisterska: *Jednoczesne oznaczanie aminokwasów biogennych przy użyciu elektroforezy kapilarnej*. Promotor: dr hab. Piotr Kowalski.

Dyplom doktora nauk farmaceutycznych

Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny, 2014 rok. Rozprawa doktorska: *Mechanizmy łączonych metod wzbogacania analitów w kapilarze przy użyciu wysokosprawnych technik elektromigracyjnych*. Promotor: dr hab. Piotr Kowalski.

2. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

2015 – 2016 – staż naukowy w Institut de Chimie et des Materiaux Paris-Est (UMR CNRS 7182) w Thiais, Francja.

2016 – analityk w przedsiębiorstwie badawczo-rozwojowym (Laboratorium Analiz Chemicznych Spark-Lab Sp. z o. o.) w Gdyni.

2016 – do chwili obecnej – adiunkt w Katedrze i Zakładzie Toksykologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku.

3. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA STANOWIĄCEGO PODSTAWĘ UBIEGANIA SIĘ O STOPIEŃ NAUKOWY DOKTORA HABILITOWANEGO

3.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Wzbogacanie substancji o charakterze hydrofilowym w technikach elektromigracyjnych

3.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

1. S. Dziomba, K. Ciura, B. Correia, B. Wielgomas, 2019, Stabilization and isotachopheresis of unmodified gold nanoparticles in capillary electrophoresis, *Analytica Chimica Acta*, 1047, 248-256.

Punktacja IF: 5,123. Punktacja MNiSW: 45.

2. S. Dziomba, K. Ciura, P. Kocialkowska, A. Prahl, B. Wielgomas, 2018, Gold nanoparticles dispersion stability under dynamic coating conditions in capillary zone electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 1550, 63-67.

Punktacja IF: 3,716. Punktacja MNiSW: 40.

3. **S. Dziomba**, K. Ciura, M. J. Markuszewski, B. Wielgomas, 2017, Migration time shift of analytes in micellar electrokinetic chromatography induced by stacking, *Electrophoresis*, 38, 1730-1735.

Punktacja IF: 2,569. Punktacja MNiSW: 25.

4. **S. Dziomba**, M. Araya-Farias, M. Taverna, M. Guerrouache, B. Carbonnier, N. Thuy Tran, 2017, Microscope-assisted UV-initiated preparation of well-defined porous polymer monolithic plugs in glass microchips for peptide preconcentration, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 2155-2162.

Punktacja IF: 3,307. Punktacja MNiSW: 35.

5. M. Araya-Farias, **S. Dziomba**, B. Carbonnier, M. Guerrouache, I. Ayed, N. Aboud, M. Taverna, N. Thuy Tran, 2017, A lab-on-a-chip for monolith-based preconcentration and electrophoresis separation of phosphopeptides, *Analyst*, 142, 485-494.

Punktacja IF: 3,864. Punktacja MNiSW: 40.

6. **S. Dziomba**, M. Araya-Farias, C. Smadja, M. Taverna, B. Carbonnier, N. Thuy Tran, 2017, Solid supports for extraction and preconcentration of proteins and peptides in microfluidic devices: A review, *Analytica Chimica Acta* 955, 1-26.

Punktacja IF: 5,123. Punktacja MNiSW: 45.

7. K. Ciura, P. Kowalski, J. Nowakowska, M. Markuszewski, T. Bączek, **S. Dziomba**, 2016, Sweeping of hydrophobic amines under inhomogeneous electric field and low surfactant concentration in micellar electrokinetic chromatography, *Electrophoresis*, 37, 1161-1165.

Punktacja IF: 2,744. Punktacja MNiSW: 25.

Sumaryczna wartość Współczynnika Oddziaływania (Impact Factor, IF) dla prac wchodzących w skład osiągnięcia wynosi: **26,446**.

Sumaryczna wartość punktów MNiSW dla prac wchodzących w skład osiągnięcia wynosi: **255**.

Oświadczenia współautorów wraz z określeniem indywidualnego wkładu każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku 5. Oświadczenie habilitanta dotyczące jego udziału w poszczególnych pracach znajduje się w Załączniku 4.

3.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

3.3.1. Wprowadzenie

Techniki rozdzielania mieszanin są obecnie podstawą funkcjonowania większości laboratoriów rutynowych i badawczych. Nie ulega wątpliwości iż dziedzina ta zdominowana jest przez techniki chromatograficzne. Z uwagi na szereg zalet takich jak doskonała powtarzalność i odtwarzalność, stosunkowo prosta obsługa i względnie niski koszt zakupu urządzeń, chromatografia jest preferowana w stosunku do alternatywnych technik elektromigracyjnych. W praktyce wykorzystanie elektroforezy kapilarnej ogranicza się zazwyczaj do substancji o charakterze silnie hydrofilowym jak cukry, białka i kwasy

nukleinowe, a także niektóre substancje czynne stosowane w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym [1]. Warto jednak zwrócić uwagę na fakt, iż wiele spośród krążących, negatywnych opinii na temat technik elektromigracyjnych uległy dezaktualizacji wraz z postępem technologicznym i rozwojem tej dziedziny nauki. Zagadnienie to zostało szczegółowo omówione w doskonałym artykule przeglądowym autorstwa *Michael'a Breadmore'a*, którego lekturę można polecić wszystkim osobom zainteresowanym tematyką rozdzielania składników mieszanin [2].

Jednym z najczęściej poruszanych zagadnień są stosunkowo wysokie wartości granic wykrywalności i oznaczalności uzyskiwanych za pomocą technik elektromigracyjnych w stosunku do technik chromatograficznych. Główną przyczyną tego zjawiska jest ogromna dysproporcja w objętości dozowanej próbki. W przypadku standardowego dozowania hydrodynamicznego w elektroforezie kapilarnej objętość ta wynosi od kilku do kilkunastu nanolitów, podczas gdy w chromatografii cieczowej jest ona zazwyczaj od 2 do 3 rzędów wielkości większa. W przypadku chromatografii nie bez znaczenia pozostaje także kilkukrotnie większa długość drogi optycznej światła detektora (detekcja spektrofotometryczna). Problem stosunkowo wysokich granic oznaczalności został zauważony stosunkowo szybko i już na początku lat 90. ubiegłego wieku opublikowanych zostało kilka przełomowych prac dotyczących zjawiska spiętrzania (ang. *stacking*) analitów w kapilarze [3,4]. W kolejnych latach tematyka ta była intensywnie rozwijana i zaowocowała opracowaniem między innymi techniki zmiatania analitu przez fazę pseudostacjonarną (ang. *sweeping*) [5], dynamicznego krzyżowania pH (ang. *dynamic pH junction*) [6], przejściowej izotachoforezy (ang. *transient isotachophoresis*) [7] czy ogniskowania analitów na drodze rozpadu miceli (ang. *analytes focusing by micelle collapse*) [8]. We wspomnianym powyżej artykule *Breadmore* wnioskuje o obaleniu „mitu” niskiej czułości technik elektromigracyjnych właśnie z uwagi na możliwość stosowania różnorodnych technik wzbogacania elektroforetycznego składników dozowanej próbki [2].

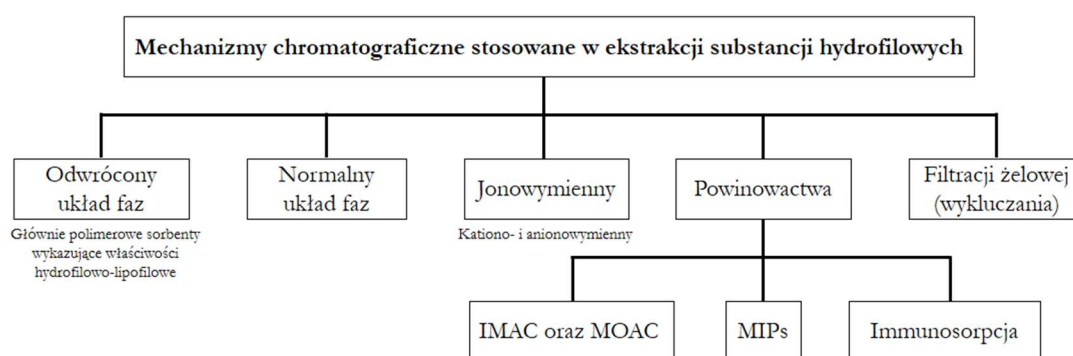
Elektroforetyczne techniki wzbogacania analitów umożliwiają uzyskiwanie wysokich tzw. współczynników wzbogacania (ang. *sensitivity enhancement factor*, SEF). Parametr ten oblicza się najczęściej ze stosunku wielkości sygnału generowanego przez analit poddany procesowi wzbogacania ($H_{preconc}$) do sygnału uzyskiwanego z wykorzystaniem standardowego dozowania próbki (H_{stand}), przy czym w obliczeniach należy uwzględnić także stężenia analitu w obu eksperymentach:

$$SEF = \frac{H_{preconc}}{H_{stand}} \frac{c_{stand}}{c_{preconc}} \quad (1)$$

gdzie: c_{stand} i $c_{preconc}$ to odpowiednio stężenie analitu w eksperymencie z wykorzystaniem dozowania standardowego i z użyciem procesu wzbogacania. Warto zaznaczyć, iż istnieją doniesienia naukowe dokumentujące osiągnięcie współczynników wzbogacania na poziomie $10^5 - 10^6$ [9,10].

Niestety, pomimo potężnego potencjału wzbogacającego, techniki te jedynie w nielicznych przypadkach znalazły zastosowanie do izolacji analitów z próbek rzeczywistych [11]. Z tego względu w przypadku próbek charakteryzujących się złożonym składem matrycy (np. próbki biologiczne) analiza elektroforetyczna w zasadzie zawsze poprzedzona jest

zmuśnym i czasochłonnym procesem ekstrakcji. Szacuje się, iż proces ten zajmuje średnio około 60% czasu całej procedury analitycznej [12]. Z tego względu przygotowanie próbki do analizy jest jednym z głównych nurtów automatyzacji, obserwowanych w chemii analitycznej na przestrzeni ostatnich lat. Ma to szczególne znaczenie w przypadku zintegrowanych systemów mikroanalitycznych (ang. *Micro Total Analysis System*), których idea polega na pełnej automatyzacji procesu analitycznego [13]. Ekstrakcja do fazy stałej stanowi wiodącą technikę stosowaną w tego typu układach [14]. Kluczowym zagadnieniem jest dobór stosownego sorbentu, co uzależnione jest przede wszystkim od właściwości fizykochemicznych analitu. Hydrofilowa natura większości substancji, których analizie dedykowana jest elektroforeza kapilarna, znacznie zawęża możliwości wyboru złoża. Na Schemacie 1 przedstawiono najczęściej stosowane mechanizmy sorpcji do ekstrakcji substancji hydrofilowych. Większość sorbentów dedykowanych izolacji związków hydrofilowych cechuje się jednak stosunkowo niską selektywnością, która w przypadku złożonych matryc (np. analiza proteomiczna płynów ustrojowych) może okazać się niewystarczająca. Co więcej, niekompatybilność niektórych eluentów stosowanych w danej technice (np. silnie hydrofobowe eluenty w normalnym układzie faz) z elektrolitami rozdzielającymi wykorzystywanymi w technikach elektromigracyjnych, wyklucza ich łączenie w trybie *on-line* oraz *in-line*. Z tego względu sporą popularnością w przypadku izolacji związków hydrofilowych z matryc o dużym stopniu złożoności cieszą się techniki, których mechanizm retencji polega na wysoce selektywnym (a nawet specyficznym) wiązaniu cząsteczki przez np. przeciwciała (immunosorbenty) [15]. Na uwagę zasługuje także wykorzystanie w tym celu syntetycznych złoży z odciskiem molekularnym (ang. *Molecularly Imprinted Polymers*, MIPs). Jest to nowa klasa materiałów, ciesząca się w ostatnich latach sporym sukcesem komercyjnym w przypadku ekstrakcji związków drobnocząsteczkowych [16]. Złotym standardem w fosfoproteomice stały się natomiast złoża selektywnie wiążące substancje fosforylowane przez jony lub tlenki niektórych metali przejściowych, immobilizowanych na powierzchni materiału ekstrakcyjnego (ang. *immobilized metal ion affinity chromatography*, IMAC, oraz ang. *metal oxide affinity chromatography*, MOAC) [15].



Schemat 1. Najczęściej stosowane mechanizmy sorpcyjne w celu ekstrakcji substancji hydrofilowych. Objasnienia: IMAC – chromatografia powinowactwa z użyciem immobilizowanego jonu metalu; MOAC – chromatografia powinowactwa z wykorzystaniem tlenku metalu; MIPs – złoża polimerowe z odciskiem molekularnym.

Nie bez znaczenia pozostaje również wybór nośnika, na którym zachodzi proces wymiany masy. Ma to kluczowe znaczenia między innymi z uwagi na sposób osadzenia złoża

we wnętrzu kapilary lub kanału czipu. Szczególnie w przypadku mikroczipów proces ten nadal stanowi niemałe wyzwanie. Z tego względu rozwijanie technologii przygotowywania i osadzania sorbentów w urządzeniach mikroprzepływowych stanowi istotne zadanie związane z rozwojem miniaturyzacji i metod wzbogacania analitów w technikach elektromigracyjnych. Szacuje się, iż obecnie każdego roku publikowanych jest ponad 150 artykułów naukowych dotyczących tej tematyki [17]. Prace opisane w następnych podrozdziałach prezentowanego referatu wpisują się w ten trend.

3.3.2. Cel badań

Podstawą ubiegania się o tytuł doktora habilitowanego stanowi cykl siedmiu publikacji dotyczących nowych strategii skutecznego obniżania granic wykrywalności i oznaczalności substancji o charakterze hydrofilowym w technikach elektromigracyjnych. Badania dotyczyły zarówno technik wzbogacania analitu w kapilarze z wykorzystaniem efektów elektrokinetycznych, jak i nośników stałych.

Celem prac przedstawionych w **Publikacjach 3 i 7** było zbadanie wpływu składu matrycy analitycznej próbki na efekt zmiatania analitów przez fazę pseudostacjonarną. Prace te dotyczyły wzbogacania substancji drobnocząsteczkowych w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii. Celem eksperymentów opisanych w **Publikacji 7** było wyjaśnienie różnic w efektywności zmiatania substancji wykazujących silną retencję w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii, dozowanych w próbkach o wysokim stopniu zasolenia. Badano także przesunięcie czasu migracji sygnału na elektroferogramie pod wpływem zmiany składu matrycy dozowanej próbki (**Publikacja 3**). W obu omawianych pracach przeprowadzono symulację komputerową z użyciem programu Simul5 dla lepszego zrozumienia mechanizmu obserwowanych zjawisk (**Publikacje 3 i 7**)[18].

Oprócz substancji drobnocząsteczkowych, obiektem badań nad technikami wzbogacania elektrokinetycznego były także nanocząstki (**Publikacje 1 i 2**). Celem tych prac było zbadanie stabilności dyspersji nanocząstek w trakcie analizy elektroforetycznej oraz podczas procesu wzbogacania. Ocenie poddano wpływ różnych czynników jak długość kapilary, wartość pola elektrycznego i efekt elektrolizy buforu rozdzielającego. Szczególną uwagę poświęcono składowi buforu rozdzielającego (**Publikacje 1 i 2**). W tym aspekcie badano wpływ nie tylko poszczególnych ko-jonów i przeciw-jonów na stabilność dyspersyjną nanocząstek złota poddanych procesowi elektroforezy w technice kapilarnej elektroforezy strefowej, ale także siłę jonową tych układów buforowych oraz wzajemny stosunek molowy ko-jonów do przeciw-jonów. Badania stabilności nanocząstek w kapilarnej elektroforezie strefowej korelowano z wynikami wzbogacania nanocząstek na drodze izotachoforezy.

Ostatnim wątkiem poruszonym w prezentowanych pracach było przygotowanie polimerowych złożów monolitycznych w kanałach mikroczipów szklanych w celu opracowania mikrouządzeń zdolnych do izolacji i wzbogacania fosfopeptydów o znaczeniu diagnostycznym (**Publikacje 4 i 5**). Z tego względu syntezowane złoża poddawano modyfikacjom z użyciem jonów cyrkonu (złoża typu IMAC). Oprócz klasycznej syntezy wolnorodnikowej prowadzonej w piecu hybrydacyjnym (**Publikacja 5**), w ramach prowadzonych badań opracowano także metodę precyzyjnej syntezy krótkich fragmentów złoża (160 – 400 μm) z użyciem odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego (**Publikacja**

4). Dokonano także szczegółowego przeglądu literatury dotyczącej wzbogacania peptydów i białek z wykorzystaniem urządzeń mikrofluidalnych (**Publikacja 6**).

3.3.3. Omówienie wyników badań

Technika zmiatania stanowi jedną z najbardziej rozwiniętych technik wzbogacania analitów w kapilarze. Jej mechanizm po raz pierwszy został opisany przez *Quirino* i *Terabe* w 1998 roku na łamach prestiżowego czasopisma *Science* [5]. Artykuł ten w chwili pisania poniższego referatu cytowany był ponad 700-krotnie, co najlepiej świadczy o zainteresowaniu, jakim cieszy się ten temat. Zależności między retencją analitu w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii, a efektem wzbogacenia analitu opisane przez *Quirino* i *Terabe* w stosunkowo krótkim czasie okazały się niewystarczające w przypadku próbek, których skład matrycy znacząco odbiegał od składu buforu rozdzielającego (przede wszystkim pod względem wartości pH i siły jonowej). Z tego względu kolejne lata zaowocowały wieloma doniesieniami naukowymi, próbującymi wyjaśnić wpływ matrycy analitycznej próbki na efektywność zmiatania analitów przez fazę pseudostacjonarną [19–23]. Spośród wymienionych prac na uwagę zasługują publikacje zespołu prof. Ute Pyell, które podsumowują dotychczasową wiedzę dotyczącą techniki zmiatania [22,23]. Zaznacza się w nich wieloetapowość procesu zmiatania polegającą na spiętrzaniu i rozmyciu miceli na początkowym i końcowym etapie penetracji strefy próbki przez fazę pseudostacjonarną, a także spiętrzanie i rozmycie analitów przez fazę micelarną. Jak zaznaczają autorzy tych prac, to właśnie różnice w przewodności matrycy próbki i buforu rozdzielającego, a także retencja analitu przez fazę micelarną w obu tych ośrodkach, są bezpośrednio odpowiedzialne za różnice pomiędzy spodziewanymi, a eksperymentalnymi współczynnikami wzbogacenia w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii. Wpływ wymienionych parametrów można uwzględnić w obliczeniach matematycznych poprzez wprowadzenie współczynnika zmiany stosunku faz (ang. *phase ratio shift factor*, θ) oraz uwzględniając stosunek przewodności matrycy próbki do buforu rozdzielającego (γ):

$$l_{focus} = \frac{1}{\gamma\theta(1 + k_{BGE})} l_{inj} \quad (2)$$

gdzie k_{BGE} – retencja analitu przez fazę pseudostacjonarną w strefie buforu rozdzielającego; l_{focus} – długość strefy próbki po procesie zmiatania; l_{inj} – długość strefy próbki przed procesem zmiatania.

Z równania (2) wynika, iż w przypadku braku różnic w składzie rozpuszczalnikowym buforu rozdzielającego i matrycy próbki, efekt wzbogacenia zależny jest przede wszystkim od retencji analitu w buforze rozdzielającym i stosunku przewodności obu ośrodków. Ponieważ uważa się, iż siłą napędową procesu zmiatania jest spiętrzanie miceli na granicy bufor rozdzielający – próbka, zwiększanie stężenia surfaktantu w buforze rozdzielający pozwala zazwyczaj uzyskać wyższe co do wartości współczynniki wzbogacenia próbki (wzrost k_{BGE} i wyższe stężenie miceli w spiętrzonej strefie). W praktyce jednak, stosowanie próbek dla których $\gamma > 1,5$ prowadzi do poszerzenia sygnałów i obniżenia ich intensywności, ponieważ spiętrzaniu miceli zawsze towarzyszy ich rozmycie po opuszczeniu strefy próbki o wyższej przewodności w stosunku do buforu rozdzielającego. Teoria ta zakłada również brak różnic w efekcie wzbogacania na drodze zmiatania w przypadku analitów wykazujących

identyczną retencję. Autorzy zaznaczają jednocześnie, iż wyższe liczbowo współczynniki wzbogacenia analitów są możliwe w przypadku mechanizmów towarzyszących zmiataniu, np. w przypadku przejściowej izotachoforezy [23–25].

Wyniki przedstawione w **Publikacji 7** wskazują na możliwość efektywnego zmiatania analitów przez fazę pseudostacjonarną nawet przy bardzo wysokim zasoleniu próbki (dla siły jonowej ≈ 700 mM). W pracy wykazano, iż stosowanie matrycy próbki o stosunkowo niskiej przewodności ($\gamma < 1$) skutkowało uzyskiwaniem sygnałów o bardzo niskiej sprawności ($N < 50\,000$ pól/m). Zaobserwowano natomiast, iż wzrost stężenia soli w strefie próbki prowadził do poprawy symetryczności sygnału i sprawności układu. Odnotowano także wzrost intensywności sygnałów dla strychniny, chininy i emetyny, które osiągały *plateau* w zakresie siły jonowej od około 400 do 700 mM ($9,2 < \gamma < 16,5$), w wyniku czego uzyskano współczynniki wzbogacenia w zakresie od 200 do 300 w stosunku do standardowego dozowania ciśnieniowego (5 sekund; 3,45 kPa). Bazując na dostępnej literaturze naukowej stwierdzono, iż żadna praca opublikowana do tej pory nie udokumentowała efektywnego procesu zmiatania analitów przy tak wysokiej różnicy przewodności pomiędzy próbką i buforem rozdzielającym (i tak wysokiej sile jonowej matrycy próbki). Co ciekawe, w eksperymentach tych stosowano bufony rozdzielające o stosunkowo niskiej zawartości surfaktantu (10 mM SDS). W pracy badano wpływ stężenia tego związku na efektywność zmiatania. Okazało się, iż wyższe stężenie tenzydu prowadzi do spadku intensywności sygnału i sprawności układu. Jest to wynik zaskakujący z uwagi na dotychczasowe doniesienia literaturowe wskazujące na poprawę retencji analitów przy wyższym stężeniu fazy pseudostacjonarnej [26]. Obserwacje te poczyniono dla trzech analitów: strychniny, chininy i emetyny, które w stosowanych warunkach wykazywały identyczną retencję (k). Należy zaznaczyć, iż z uwagi na stosunkowo wysoką lipofilowość w stanie niezdysocjowanym ($\log P = 3,4$) i podwójny ładunek dodatki w kwaśnym pH (w którym $\log D$ tego związku wynosi około -2,0), chinina jest jednym z najczęściej stosowanych markerów migracji miceli w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii [23]. Podobne parametry fizykochemiczne wykazuje emetyna (dwie grupy aminowe; $\log P = 4,8$; w warunkach prowadzenia eksperymentu $\log D = -2,2$), co mogłoby tłumaczyć wyniki uzyskiwane dla tych substancji gdyby nie fakt, iż strychnina, dla której także uzyskano zbliżone rezultaty, posiada w swojej strukturze jedną grupę aminową ($\log P = 1,7$; $\log D = -2,6$). Co więcej, efektu wzbogacenia nie uzyskano dla pięciu innych alkaloidów (atropina, arekolina, nikotyna, kodeina i papaweryna), posiadających w swojej cząsteczce zarówno pojedynczą grupę protonoakceptorową (atropina, arekolina, kodeina i papaweryna), jak i podwójną (nikotyna), a których $\log P$ mieści się w zakresie od 0,7 do 3,7 ($\log D$ wynosił od -2,6 do 1,6). Dla tych związków, w warunkach prowadzenia eksperymentu, zaobserwowano zbliżoną lub identyczną retencję jak w przypadku strychniny, emetyny i chininy. Udział przejściowej izotachoforezy mógłby tłumaczyć obserwowane [23]. W celu weryfikacji tego założenia przeprowadzono symulację komputerową z użyciem programu Simul5 [18]. W symulacji nie zaobserwowano jednak obecności samoorganizującej się strefy granicznej pomiędzy profilami stężeń składników jednoimiennych układu, co wskazywałoby na proces izotachoforezy. Wyniki te wskazują na istotny wpływ określonych właściwości fizykochemicznych cząsteczek poddawanych zmiataniu przy użyciu fazy pseudostacjonarnej na efektywność tego procesu, przy jednoczesnym braku różnic w retencji tych analitów

w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii. Hipoteza ta poddawana jest obecnie weryfikacji z wykorzystaniem podejścia Ilościowej Zależności Struktura – Właściwości (ang. *Quantitative Structure-Properties Relationship*, QSPR).

W praktyce, występowanie zjawiska przejściowej izotachoforezy w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii zostało udowodnione jedynie w nielicznych pracach naukowych [27–29], między innymi w **Publikacji 3**. W pracy tej zaobserwowano przesunięcie czasu migracji analitu (kwas askorbowy) w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii. Z uwagi na silnie hydrofilowy charakter analitu ($\log P = -1.9$), przesunięcie to w żadnej mierze nie mogło wynikać z jego oddziaływania z fazą pseudostacjonarną. Zmiany czasu migracji spowodowane lokalnymi fluktuacjami przepływu elektroosmotycznego lub niewłaściwym kondycjonowaniem kapilary także zostały wykluczone na podstawie migracji neutralnego znacznika przepływu. Z uwagi na fakt, iż kwas askorbowy mógł podlegać reakcji kompleksowania z jonami boranowymi obecnymi w matrycy próbki (obecność ugrupowania cis-diolowego w strukturze związku), w eksperymencie wykorzystano także cysteinę. Podobnie do kwasu askorbowego, substancja ta wykazuje charakter silnie hydrofilowy ($\log P = -2,5$), a w warunkach prowadzenia eksperymentu (bufor rozdzielający złożony z 80 mM SDS, 100 mM Tris/HCl, pH 9,7) obserwowano zbliżoną ruchliwość elektroforetyczną obu związków. Z uwagi na podobne przesunięcie czasów migracji cysteiny, hipoteza o wpływie kompleksowania kwasu askorbowego na efekt wzbogacenia próbki i przesunięcia czasu migracji została odrzucona.

W toku prac eksperymentalnych zbadano wpływ szeregu czynników na wielkość przesunięcia czasu migracji, a także na zmianę parametrów sygnału (intensywność i sprawność). Zaobserwowano między innymi liniową zależność między stężeniem jonów boranowych w matrycy próbki, a przesunięciem sygnału na elektroferogramie. W tym przypadku dłuższa migracja analitu skutkowała wyższą sprawnością i większą intensywnością sygnału. Efekt analogiczny do wpływu stężenia jonów boranowych na parametry sygnału odnotowano podczas zwiększania czasu dozowania próbki. Poprawa sprawności i wzrost intensywności piku przy jednocześnie dłuższym czasie migracji związku wskazywał na udział izotachoforezy w mechanizmie wzbogacania analitu, jako że efektywność tego procesu zależy od czasu jego prowadzenia [30]. Zaobserwowano także zależność pomiędzy przesunięciem czasu migracji sygnału na elektroferogramie od wartości pH buforu rozdzielającego. Wyniki te uzasadniono zmianą mobilności jonów boranowych w badanym zakresie pH (badanie przeprowadzono w zakresie pH od 8,1 do 9,7, podczas gdy pK_a kwasu bornego wynosi 9,3). Hipotezę o udziale izotachoforezy potwierdzono także poprzez przeprowadzenie symulacji komputerowej z użyciem programu Simul5 [18]. Symulacja wykazała tworzenie się wyraźnej, migrującej granicy pomiędzy składnikami buforu rozdzielającego (jony laurylosiarczanowe), a matrycą próbki (jony boranowe). Na granicy tej obserwowano jednocześnie proces wzbogacania analitu. Na podstawie przedstawionych wyników jonom laurylosiarczanowym przypisano rolę elektrolitu wiodącego, a jonom boranowym – elektrolitu terminującego.

Zoptymalizowane warunki metody pozwoliły na uzyskanie stosunkowo wysokiego współczynnika wzbogacenia kwasu askorbowego (>100). Pomimo tego uzyskano jednocześnie stosunkowo wysoką granicę oznaczalności tego związku (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Wynikało to z faktu, iż analit w części dozowanej próbki nie ulegał spiętrzaniu, lecz był widoczny w postaci „ogonującego” pasma ko-migrującego z jonami boranowymi. Wyeliminowanie

tego efektu pozwoliłoby na wykorzystanie procesu przejściowej izotachoforezy w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii do jednoczesnego wzbogacania substancji hydrofilowych, nieulegających zmiataniu przez fazę pseudostacjonarną, z substancjami ulegającymi retencji i procesowi zmiatania.

Kolejnym zagadnieniem poruszonym w ramach prowadzonych badań była kapilarna elektroforeza strefowa i wzbogacanie nanocząstek złota. Z uwagi na swoje unikalne właściwości nanocząstki są obecnie obiektem zainteresowania naukowców z różnych dziedzin nauki. Nanocząstki złota, których dotyczyły prowadzone prace, znalazły zastosowanie między innymi w terapii fototermicznej, jako nośniki leków, a także czujniki [31,32]. Z uwagi na fakt, iż właściwości nanocząstek zależą od ich wielkości i kształtu, niezwykle istotnym zagadnieniem jest szczegółowa charakterystyka fizykochemiczna i kontrola jakości uzyskiwanych cząstek. Techniki obecnie stosowane w tym celu cechują się pewnymi ograniczeniami jak np. bardzo wysoki koszt aparatury, ograniczenie lub brak automatyzacji pomiarów czy niska przepustowość [33]. Z tego względu w ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania elektroforezą kapilarną i jej zastosowaniem do analizy próbek zawierających nanocząstki zarówno syntetyczne, jak i biologiczne [34–36].

Obok typowych problemów napotykanym podczas rozdzielania elektroforetycznego indywiduów chemicznych, w przypadku nanocząstek częstą niedogodnością jest niedostateczna stabilność dyspersji podczas analizy elektroforetycznej [37]. Wysoka częstotliwość zderzeń pomiędzy cząstkami, a także pomiędzy cząstkami a wewnętrzną ścianą kapilary może prowadzić do zjawiska agregacji i adsorpcji do ściany kapilary [37,38]. Z tego względu przyjęło się stosowanie buforów rozdzielających o stosunkowo niskiej sile jonowej, zapewniających wysoki potencjał zeta na powierzchni rozdzielanych nanocząstek i ściany kapilary [39]. Dla przykładu *Pyell* i współ. rekomendują stosowanie tetraboranu disodowego do rozdzielania elektroforetycznego nanocząstek złota, uzasadniając to stosunkowo niską ruchliwością jonów boranowych (zbliżoną do ruchliwości nanocząstek złota stosowanych w ich pracy) i obecnością przeciw-jonów sodowych, które stosunkowo słabo ekranują potencjał na powierzchni analitów [40].

W **Publikacji 2** zaobserwowano sytuację odwrotną do dotychczas opisywanej w literaturze naukowej. Elektroforeza nanocząstek złota z użyciem 5 mM buforu fosforanowego (pH 6.8) skutkowała niesymetrycznym sygnałem na elektroferogramie (tzw. *fronting*), co w przypadku elektroforezy substancji anionowych można przypisać oddziaływaniu analitu ze ścianą kapilary. Efekt ten nasilał się wraz ze wzrostem siły jonowej by ostatecznie skutkować całkowitym zniekształceniem sygnału („rozcłonkowanie” sygnału na kilka mniejszych o niespotykanej wysokiej sprawności i stosunkowo wysokiej intensywności), które na podstawie przeglądu literatury przypisano agregacji nanocząstek [41,42]. Proces agregacji zaobserwowano także w przypadku stosowania buforu rozdzielającego złożonego z 50 mM BTP i 40 mM AMPPO (pH 9,2) z tą różnicą, iż w tym przypadku proces agregacji przypisano elektrolizie buforu rozdzielającego. W toku badań wyeliminowano efekt samoistnej agregacji nanocząstek w stosowanym buforze rozdzielającym, agregację cząstek w próbce (przed analizą) i agregację na skutek adsorpcji cząstek do ściany kapilary. Wykazano natomiast, iż każdorazowa wymiana buforu rozdzielającego przeciwdziałała agregacji i zapewnia stosowną stabilność dyspersyjną nanocząstkom złota w trakcie analizy elektroforetycznej. Co więcej, wymiana buforu rozdzielającego po serii analiz, podczas których zaobserwowano agregację

nanocząstek, prowadzi do przywrócenia początkowej stabilności układu. Wniosek dotyczący agregacji nanocząstek na skutek elektrolizy buforu rozdzielającego wydaje się kontrowersyjny, jako że nie obserwowano w tym czasie zmian wartości pH buforu rozdzielającego, ani zmian wartości przepływu elektroosmotycznego. Zjawisko to występowało jednak także podczas stosowania innych buforów rozdzielających, co zostało omówione w **Publikacji 1**. Pomimo starań i licznych eksperymentów prowadzonych między innymi z użyciem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas (dane nieopublikowane), nie udało się ostatecznie wyjaśnić mechanizmu tego zjawiska. Aczkolwiek, prezentowana praca stanowi pierwsze doniesienie naukowe wykazujące stabilizujący wpływ stosunkowo dużych przeciw-jonów buforujących (BTP) na nanocząstki poddawane procesowi elektroforezy. Wątek ten kontynuowano w **Publikacji 1**.

Publikacja 1 dotyczy badania wpływu poszczególnych składników buforu rozdzielającego (ko- i przeciw-jonów) na stabilność dyspersji nanocząstek w trakcie analizy elektroforetycznej. W eksperymentach wykorzystano między innymi trzy substancje buforujące o charakterze słabych zasad ($\text{NH}_{3(\text{aq})}$, Tris, BTP – przeciw-jony) oraz dwa kwasy organiczne (kwas cytrynowy, kwas mrówkowy) i dwie substancje amfoteryczne (AMPSO, MOPS). W pracy przetestowano 72 buforu złożone z wymienionych substancji, różniące się siłą jonową (10 i 20 mM) i stosunkiem molowym przeciw-jonu do ko-jonu (5:1, 2:1 i 5:4), a tym samym wartością pH. W pracy wykazano, iż przeważająca większość buforów (>60%) zawierających BTP w stosunku molowym 5:1 w stosunku do ko-jonów zapewniała stabilność dyspersjom nanocząstek złota w trakcie analizy elektroforetycznej. Ta sama substancja obecna w buforze rozdzielającym w stosunku molowym 5:4 w stosunku do ko-jonów w 75% testowanych buforów inicjowała agregację cząstek. Efekt ten wytłumaczono dysocjacją BTP, który w swojej strukturze posiada dwie grupy aminowe ($\text{pK}_{\text{a}1} = 6,8$; $\text{pK}_{\text{a}2} = 9,0$). Bufory, w których BTP występował w nadmiarze w stosunku do ko-jonów (stosunek molowy 5:1), wykazywały pH w zakresie od 9,6 do 9,8. W tych warunkach BTP posiada jedynie jedną, częściowo sprotonowaną grupę aminową, dzięki której może ulegać adsorpcji na powierzchni kapilary i nanocząstek złota. Z uwagi na swoje stosunkowo duże rozmiary, w tych warunkach zaadsorbowany BTP pełni funkcję stabilizacyjną nanocząstki na drodze sterycznej (stabilizacja steryczna). Jest to mechanizm stabilizacji koloidów alternatywny do stabilizacji z wykorzystaniem oddziaływań elektrostatycznych [43–45]. Zastosowanie buforów zawierających BTP w stężeniu zbliżonym do ko-jonu (stosunek molowy 5:4) skutkowało uzyskaniem pH w zakresie od 7,8 do 9,2. W tym pH druga grupa aminowa BTP ulega częściowej dysocjacji, co stawia ten związek w roli łącznika pomiędzy cząsteczkami lub cząsteczką i ścianą kapilary. W efekcie obserwowano adsorpcję analitów do ścianek kapilary i agregację cząstek. Potwierdzeniem powyższej hipotezy była efektywniejsza stabilizacja nanocząstek z użyciem bardziej stężonych buforów (siła jonowa 20 mM) zawierających BTP w stosunku molowym 5:1 do ko-jonów, czego nie obserwowano w przypadku amoniaku i Tris. Należy zaznaczyć, iż odporność na efekt wysalania jest cechą charakterystyczną układów dyspersyjnych stabilizowanych sterycznie [43,44]. Przeprowadzone doświadczenia wykazały również, iż buforu zawierające BTP i kwas cytrynowy cechowały się największym potencjałem stabilizacyjnym. Fakt ten nie jest zaskakujący z uwagi na liczne doniesienia literaturowe na ten temat [46,47]. Zaobserwowano natomiast, iż stosowanie MOPS jako ko-jonu zapewniało większą stabilność aniżeli

w przypadku AMPSO, pomimo stosunkowo zbliżonej struktury chemicznej obu związków. Zaproponowane wyjaśnienie tego zagadnienia było analogiczne jak w przypadku BTP. Ponieważ pK_a związków MOPS i AMPSO wynosi odpowiednio 7,2 i 9,0, w warunkach prowadzenia eksperymentów grupa aminowa w strukturze AMPSO była zawsze przynajmniej częściowo zdysocjowana, podczas gdy grupa aminowa w cząsteczce MOPS w przeważającej części eksperymentów posiadała całkowity ładunek ujemny. Założono więc, iż substancje posiadające jednoczesny ładunek dodatni i ujemny mogą inicjować agregację i adsorpcję nanocząstek do ściany kapilary (chemisorpcja grupy kwasowej do powierzchni nanocząstki i jednoczesne przyciąganie elektrostatyczne do kolejnej nanocząstki lub ściany kapilary poprzez sprotonowaną grupę aminową).

Uzyskane wyniki stabilności w kapilarnej elektroforezie strefowej korelowano następnie z rezultatami izotachoforezy nanocząstek złota. Porównanie wykazało, iż stosowanie elektrolitów wiodących i terminujących, zawierających BTP w stosunku molowym 5:1 do kojonów, skutkowało najwyższymi co do wartości współczynnikami wzbogacenia analitów (SEF w zakresie od 140 do 590) w porównaniu do standardowego dozowania ciśnieniowego (5 sekund; 3,45 kPa). Sygnały te cechowały się również wyższą sprawnością i symetrycznością w porównaniu do pozostałych elektrolitów. Szczególnie w przypadku elektrolitów zawierających zbliżone stężenia molowe BTP i kojonów (stosunek molowy 5:4) odnotowano silną asymetrię i „rozwarstwienie” sygnału, wskazujące na proces agregacji cząstek w trakcie analizy elektroforetycznej. Prezentowana **Publikacja 1** stanowi pierwszą pracę naukową wykazującą stabilizujący wpływ prostych związków buforujących, będących składnikami elektrolitu rozdzielającego

Niewątpliwym przełomem technologicznym w technikach elektromigracyjnych było wprowadzenie urządzeń mikroczipowych [48,49]. W szczególności idea zintegrowanych systemów mikroanalizy (ang. *Micro Total Analysis System*) stanowi atrakcyjną alternatywę do klasycznego podejścia u podstaw którego leży żmudny i czasochłonny proces przygotowania próbki do analizy [13]. Koncept ten zapoczątkował trend miniaturyzacyjny urządzeń analitycznych na niespotykaną dotąd skalę. Niestety, szybko okazało się, iż stosowanie elektroforezy mikroczipowej wiąże się z licznymi problemami. Jednym z bardziej dotkliwych stanowiły stosunkowo wysokie granice wykrywalności i oznaczalności substancji poddawanych procesowi elektroforezy. Z tego względu w stosunkowo krótkim czasie od publikacji pierwszych doniesień dotyczących elektroforezy mikroczipowej zaczęto rozwijać temat wzbogacania analitu z użyciem technik elektroforetycznych [50], jak i nośników stałych [51–53]. Wykorzystanie nośników stałych posiada pewną istotną przewagę nad technikami elektroforetycznymi. Zastosowanie odpowiedniego złoża pozwala nie tylko na uzyskanie efektu wzbogacenia analitu, ale również jego ekstrakcję ze złożonych matryc. Z drugiej strony, opracowanie powtarzalnej procedury przygotowania tego typu struktur w kanale mikroczipu nie jest łatwym zadaniem.

Publikacja 6 stanowi przegląd literatury technik wzbogacania peptydów i białek z użyciem nośników stałych w urządzeniach mikroprzepływowych. Artykuł został podzielony na trzy główne podrozdziały dotyczące mikrocząstek, membran i złożów monolitycznych. Na podstawie dokonanego przeglądu prac wyciągnięto kilka istotnych wniosków:

- przygotowanie złoża pakowanych mikrocząsteczkami w kanale mikroczipu wydaje się być rozwiązaniem niepraktycznym. W wielu publikacjach konieczne było przygotowywanie złoża każdorazowo przed dokonaniem pomiaru [54,55]. W efekcie czas całej procedury pomiarowej był bardzo długi (nawet kilka godzin!).

- w związku z powyższym, wykorzystanie magnetycznych mikrocząstek stanowi znacznie bardziej praktyczne rozwiązanie. Zastosowanie odpowiednio zlokalizowanych magnesów umożliwia kontrolowanie formowania złoża ekstrakcyjnego w urządzeniu [56–58]. Wadą tego typu rozwiązania jest stosunkowo wysoki koszt zakupu tego typu złoża.

- wykorzystanie membran pozwala na uzyskanie najwyższych liczbowo współczynników wzbogacenia próbki [59,60]. Jest to również jedna z najbardziej rozwiniętych form wzbogacania peptydów i białek w urządzeniach mikroprzepływowych, o czym świadczy liczba publikacji dotyczących tego zagadnienia. Dużym ograniczeniem w badaniu próbek biologicznych jest niewielka selektywność tej techniki, przez co w przypadku złożonych matryc konieczne jest zastosowanie dodatkowego etapu ekstrakcji analitu [56].

- zastosowanie złoża monolitycznych jest niewątpliwie jednym z najciekawszych rozwiązań. Przygotowanie tego typu struktur w kanale mikroczipu jest stosunkowo proste i szybkie. Monolity charakteryzują się także dużą powierzchnią wymiany masy, co pozwala na uzyskiwanie zadowalającego efektu wzbogacenia próbki. Z kolei wprowadzenie do szkieletu monolitu reaktywnych grup funkcyjnych pozwala na proste i szybkie definiowanie właściwości sorpcyjnych złoża poprzez modyfikację chemiczną jego szkieletu. Z uwagi na fakt, iż złoże to po procesie syntezy nie może ulec wymianie, istnieje ryzyko zafalszowania wyników (efekt przeniesienia), dlatego też to rozwiązanie idealnie nadaje się do mikroprzepływowych urządzeń dedykowanych pojedynczemu użyciu. Wyzwanie stanowi także opracowanie składu mieszaniny polimeryzacyjnej i warunków prowadzenia tego procesu. Niemniej jednak w pracy eksperymentalnej przedstawionej w **Publikacjach 4 i 5** skupiono się właśnie na złożach monolitycznych.

W **Publikacji 5** opisano proces przygotowania złoża monolitycznego w kanale szklanego mikroczipu. Polimeryzację wolnorodnikową prowadzono poprzez naświetlanie fragmentu kanału mikroczipu, wypełnionego mieszaniną polimeryzacyjną zawierającą między innymi fosforan 2-(metakryloksy)etylu i akrylamid (monomery) oraz bisakrylamid (czynnik sieciujący). W tym celu stosowano tzw. maskę, by ograniczyć obszar czipu poddanego ekspozycji na promieniowanie UV. Uzyskany polimer charakteryzowano z użyciem mikroskopii elektronowej i porozymetrii rtęciowej. Badanie wykazało homogeną strukturę monolitu, a także zadowalającą powierzchnię właściwą ($34,1 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). Dzięki wbudowanemu w strukturę monolitu monomeru zawierającego grupę fosforanową, możliwa była modyfikacja utworzonego złoża z użyciem jonów Zr^{4+} . Prowadzono ją poprzez przemywanie złoża roztworem soli cyrkonu, uzyskując w ten sposób sorbent typu IMAC do selektywnej izolacji substancji fosforylowanych. Tak przygotowane urządzenie testowano z użyciem mieszaniny czterech peptydów znakowanych fluorescencyjnie. Substancje te charakteryzowały się tą samą strukturą pierwszorzędową, a różnice dotyczyły liczby i miejsc fosforylacji. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, iż przygotowane złoże charakteryzuje się selektywnością w stosunku do peptydów fosforylowanych (nie obserwowano retencji peptydu niefosforylowanego). Co więcej, opracowane warunki

przewodzenia procesu umożliwiły zintegrowane rozdzielanie elektroforetyczne eluowanych peptydów. Oceniono, iż uzyskane współczynniki wzbogacenia mieściły się w zakresie od 340 do 910.

W ramach przedstawionych badań opracowano także proces syntezy złoża monolitycznego z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego, co zostało opisane w **Publikacji 4**. Zastosowanie mikroskopu do tego celu pozwala na skrócenie czasu przygotowania złoża i prowadzenie procesu polimeryzacji bez konieczności stosowania masek w celu ograniczenia naświetlanego fragmentu kanału. Z kolei wielkość naświetlanego obszaru można dogodnie kontrolować poprzez dobór powiększenia obiektywu. Wprawdzie doniesienia o wykorzystaniu laserów i mikroskopów do tego celu zostały uprzednio odnotowane w literaturze naukowej [61–65], jednakże żadna z dotychczasowych publikacji nie skupiła się na technicznych aspektach tego procesu. W **Publikacji 4** zwrócono uwagę na efektywność procesu usuwania tlenu z mieszaniny polimeryzacyjnej, jako że związek ten jest znanym inhibitorem procesu wolnorodnikowego. Wykazano również, iż zbyt krótkie prowadzenie deoksygenacji mieszaniny polimeryzacyjnej poprzez przepuszczanie przez nią azotu skutkowało syntezą polimeru o niezadowalającej homogenności. Zauważono także, iż synteza polimeru z użyciem mieszaniny poddanej wyczerpującemu procesowi deoksygenacji skutkowało powstawaniem złoża poza naświetlanym fragmentem kanału. Na tej podstawie wywnioskowano, iż obecność znanego i ściśle kontrolowanego, niskiego stężenia inhibitora polimeryzacji jest konieczna dla powtarzalnej syntezy złóż o określonej wielkości. W tym celu stosowano dodatek hydrochinonu do mieszaniny polimeryzacyjnej. Funkcjonalność uzyskanego monolitu wykazano na przykładzie ekstrakcji jonowymiennej peptydu znakowanego fluorescencyjnie. Przeprowadzone pomiary wykazały ponad 700-krotny wzrost intensywności fluorescencji w warunkach wysycenia złoża w stosunku do kanału wypełnionego roztworem analitu. W trakcie poszczególnych etapów ekstrakcji (kondycjonowanie złoża, dozowanie próbki, przemywanie i elucja) nie zaobserwowano odkształcenia złoża na skutek przykładanego ciśnienia, co wskazywało na zadowalające właściwości mechaniczne, a także silne związanie złoża z wewnętrzną ścianą kanału, co została także potwierdzona z użyciem mikroskopii elektronowej.

3.3.4. Podsumowanie

Wynikiem przeprowadzonych prac jest kilka wniosków, mogących stanowić podstawę do dalszych badań i rozwoju poruszanych zagadnień:

1. Wzbogacanie analitów na drodze zmiatania przez fazę pseudostacjonarną w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii możliwe jest w przypadku próbek o wysokim stopniu zasolenia. Uzyskane wyniki wskazują na wpływ niezidentyfikowanych do tej pory parametrów fizykochemicznych analitu na efektywność procesu zmiatania.
2. Zastosowanie przejściowej izotachoforezy pozwala na efektywne wzbogacanie substancji silnie hydrofilowych, nie ulegających retencji w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii. Wykorzystanie tego zjawiska stanowi potencjalne rozwiązanie problemu jednoczesnego wzbogacania substancji hydrofilowych i hydrofobowych w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii.

3. Stabilność koloidu poddawanego rozdzielaniu elektroforetycznemu jest istotnym problemem analitycznym, warunkowanym wieloma czynnikami, spośród których przeważające znaczenie ma skład buforu rozdzielającego. Zastosowanie stosunkowo dużych przeciw-jonów buforujących jako składników elektrolitu rozdzielającego zapewnia stabilizację steryczną nanocząstek poddawanych procesowi elektroforezy. Omawiany efekt stabilizacji nanocząstek w kapilarnej elektroforezie strefowej koreluje z wynikami wzbogacania tych indywiduów przy użyciu izotachoforezy. Dobór rodzaju przeciw-jonu nie umniejsza jednak stabilizującej roli ko-jonów, będących składnikami buforu rozdzielającego i ulegających chemisorpcji na powierzchni nanocząstek.
4. Na podstawie przeprowadzonego przeglądu literatury stwierdza się, iż złoża pakowane mikrocząstkami nie stanowią dogodnego rozwiązania w technologii mikrocząstkowej. Synteza złoża monolitycznych cieszy się znacznie większym zainteresowaniem, zarówno w kontekście formowania materiałów sorpcyjnych, jak i membran wzbogacających na drodze polaryzacji stężeniowej.
5. Zintegrowanie procesu ekstrakcji, wzbogacania i rozdzielania fosfopeptydów w mikroczipie stanowi kolejny krok w procesie miniaturyzacji technik analitycznych. Na uwagę zasługuje stosunkowo prosta procedura przygotowania złoża do selektywnej izolacji tych związków, polegająca na immobilizacji jonów metalu z użyciem grup fosforanowych obecnych na powierzchni polimerowego szkieletu monolitycznego.
6. Wykorzystanie mikroskopu fluorescencyjnego do syntezy złoża polimerowych w kanale mikroczipu stanowi interesującą alternatywę dla klasycznego podejścia polegającego na wykorzystaniu w tym celu masek. W toku prac eksperymentalnych wykazano, iż podejście to pozwala na precyzyjne formowanie stosunku krótkich (160 – 400 μm) złoża monolitycznych, co byłoby bardzo trudne z użyciem zwykle stosowanego w tym celu pieca hybrydacyjnego. Udowodniono również, iż stosowanie stałego, niskiego stężenia inhibitora polimeryzacji zapewnia lepszą powtarzalność i odtwarzalność procesu.

4. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWA

4.1. Działalność naukowa przed uzyskaniem tytułu doktora nauk farmaceutycznych

W maju 2011 roku habilitant rozpoczął Stacjonarne Studia Doktoranckie w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Gdańskie Uniwersytetu Medycznego pod opieką dr hab. Piotra Kowalskiego (obecnie prof. nadzw.). Praca naukowa habilitanta w trakcie studiów doktoranckich skupiona była na technikach elektromigracyjnych, a w szczególności na metodach wzbogacania analitu w kapilarze. Efektem tych prac było siedem publikacji naukowych w czasopismach indeksowanych na tzw. Liście Filadelfijskiej oraz dwa artykuły poglądowe w czasopismach krajowych. Był on także współautorem 15 doniesień konferencyjnych, w tym dwóch wystąpień ustnych między innymi na prestiżowej konferencji *Microscale Separations and Bioanalysis* w 2014 roku (MSB 2014). W grudniu 2014 roku habilitant obronił z wyróżnieniem pracę doktorską pod tytułem *Mechanizmy łączonych metod wzbogacania analitów w kapilarze przy użyciu wysokosprawnych technik elektromigracyjnych*.

W trakcie studiów doktoranckich habilitant odbył dwa tygodniowe pobyty w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku w zespole prof. Elżbieta Skrzydlewskiej oraz trzymiesięczny staż naukowy w *Martin-Luther Universität Haale-Wittenberg* w Halle (Niemcy) w zespole prof. Reinhardta Neuberta. Współpracował także z Katedrą Chemii Organicznej Uniwersytetu Gdańskiego oraz Wydziałem Elektroniki i Telekomunikacji Politechniki Gdańskiej. Efektem wszystkich wymienionych pobytów naukowych i współpracy były publikacje w renomowanych czasopismach naukowych [66–68]. Udało mu się także pozyskać finansowanie prowadzonych badań ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach programu *Preludium*. Był także laureatem trzech nagród I-stopnia Rektora GUMed oraz stypendium „InnoDoktorant – stypendia dla doktorantów, VI edycja” przyznawanego przez Samorząd Województwa Pomorskiego.

4.2. Działalność naukowa po uzyskaniu tytułu doktora nauk farmaceutycznych

W lutym 2015 roku habilitant rozpoczął roczny staż podoktorski w *Institut de Chimie et des Materiaux Paris-Est (UMR CNRS 7182)* w Thiais (Francja), gdzie we współpracy z *Institut Galien Paris Sud* w Chatenay-Malabry (Francja) pracował nad projektem *New microsystems based on nanostructured monoliths for preconcentration and analysis of phosphorylated proteins: towards a discriminating diagnosis of neurodegenerative diseases*. W trakcie pobytu we Francji brał on również udział w badaniach prowadzonych we współpracy z między innymi *NASA Ames Research Center* i Japońską Agencją Badań Kosmicznych nad wykorzystaniem technik elektromigracyjnych do wykrywania związków chemicznych, będących indykatorami życia pozaziemskiego (publikacja w recenzji). Po powrocie do kraju w 2016 roku habilitant pracował w przedsiębiorstwie badawczo-rozwojowym (Laboratorium Analiz Chemicznych Spark-Lab Sp. z o. o.) w Gdyni. W tym samym roku podjął także pracę w Katedrze i Zakładzie Toksykologii GUMed, gdzie obecnie pracuje jako adiunkt. Od 2017 roku habilitant jest także kierownikiem grantu Sonata finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Badania te dotyczą wykorzystania elektroforezy kapilarnej jako narzędzia do izolacji i analizy nanostruktur komórkowych na przykładzie pęcherzyków pozakomórkowych. W ramach prowadzonych badań habilitant nawiązał współpracę z Katedrą Histologii i Embriologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, a także z *Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare* w Mediolanie (Włochy).

Od czasu uzyskania stopnia doktora nauk farmaceutycznych habilitant został autorem lub współautorem 12 publikacji naukowych w czasopismach indeksowanych w bazie *Journal Citations Report* oraz 13 doniesień konferencyjnych, w tym głównym autorem 6 wystąpień ustnych (z czego czterech na konferencjach międzynarodowych). Od 2016 roku recenzował on łącznie 12 artykułów w renomowanych czasopismach naukowych: *Analytical Chemistry*, *Journal of Chromatography A* i *Electrophoresis*.

5. DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA

Od dwóch lat habilitant jest zatrudniony w Katedrze i Zakładzie Toksykologii GUMed w pełnym wymiarze godzin na stanowisku adiunkta. W związku z zajmowanym stanowiskiem co roku odbywa 220 godzin dydaktycznych zajęć ze studentami kierunków farmacja i analityka medyczna. Zajęcia te dotyczą przede wszystkim przedmiotu *Toksykologia*.

Habilitant prowadzi także fakultet *Elektroforeza kapilarna – kurs podstawowy* w wymiarze co najmniej 30 godzin rocznie dla kierunków farmacja, analityka medyczna, przemysł farmaceutyczny i kosmetyczny, a także dla studentów Stacjonarnych Studiów Doktoranckich. Od 2017 roku do chwili obecnej jest on także opiekunem praktyki zawodowej kierunku Przemysł Farmaceutyczny i Kosmetyczny prowadzonych w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym. W latach 2017 – 2018 był on opiekunem czterech prac magisterskich i jednego stażu w ramach programu Erasmus. Bierze on także czynny udział w prowadzeniu zajęć dla członków Studenckiego Koła Naukowego przy Katedrze i Zakładzie Toksykologii GUMed. Studenci pod opieką habilitanta angażowani są w działalność naukową, efektem czego są liczne publikacje i doniesienia konferencyjne (Załącznik nr 4; podpunkty III.J i III.K).

Jest on także koordynatorem programu Zdolni z Pomorza z ramienia Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego na lata 2016 – 2020. Program jest inicjatywą Urzędu Marszałkowskiego Województwa Pomorskiego współfinansowaną ze środków Unii Europejskiej. Ma on na celu popularyzację nauki i poszerzanie wiedzy wśród zdolnej młodzieży z województwa pomorskiego. W ramach projektu habilitant w latach 2016 – 2018 był odpowiedzialny za organizację 8 spotkań akademickich w których łącznie wzięło udział ponad 300 uczniów szkół ponadgimnazjalnych.

6. LITERATURA

- [1] J.P. Landers, Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques, 2007.
- [2] M.C. Breadmore, Capillary and microchip electrophoresis: Challenging the common conceptions, J. Chromatogr. A. 1221 (2012) 42–55.
- [3] D.S. Burgi, R.L. Chen, Optimization in sample stacking for high-performance capillary electrophoresis, Anal. Chem. 63 (1991) 2042–2047.
- [4] C. Schwer, F. Lottspeich, Analytical and micropreparative separation of peptides by capillary zone electrophoresis using discontinuous buffer systems, J. Chromatogr. A. 623 (1992) 345–355.
- [5] J.P. Quirino, S. Terabe, Exceeding 5000-Fold Concentration of Dilute Analytes in Micellar Electrokinetic Chromatography, Science. 282 (1998) 465–468.
- [6] P. Britz-Mckibbin, A.R. Kranack, A. Paprica, D.D.Y. Chen, Quantitative assay for epinephrine in dental anesthetic solutions by capillary electrophoresis, Analyst. 123 (1998) 1461–1463.
- [7] F. Foret, E. Szoko, B. Karger, On-column transient and coupled column isotachophoretic preconcentration of protein samples in capillary zone electrophoresis, J. Chromatogr. A. 608 (1992) 3–12.
- [8] J.P. Quirino, P.R. Haddad, Online Sample Preconcentration in Capillary Electrophoresis using Analyte Focusing by Micelle Collapse, 80 (2008) 6824–6829.
- [9] B. Jung, R. Bharadwaj, J.G. Santiago, On-chip millionfold sample stacking using transient isotachophoresis, Anal. Chem. 78 (2006) 2319–2327.
- [10] J.P. Quirino, S. Terabe, Approaching a Million-Fold Sensitivity Increase in Capillary Electrophoresis with Direct Ultraviolet Detection: Cation-Selective Exhaustive Injection and Sweeping, Anal. Chem. 72 (2000) 1023–1030.
- [11] A. Rogacs, L.A. Marshall, J.G. Santiago, Purification of nucleic acids using isotachophoresis, J. Chromatogr. A. 1335 (2014) 105–120.

- [12] A. Andrade-eiroa, M. Canle, V. Leroy-cancellieri, V. Cerdà, Trends in Analytical Chemistry Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I), Trends Anal. Chem. 80 (2016) 641–654.
- [13] A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, Miniaturized Total Chemical Analysis Systems: a Novel Concept for Chemical Sensing, Sensors Actuators B. B1 (1990) 244–248.
- [14] B.C. Giordano, D.S. Burgi, S. Hart, A. Terray, On-line sample pre-concentration in microfluidic devices: a review, Anal. Chim. Acta. 718 (2012) 11–24.
- [15] C. Zhang, E. Rodriguez, C. Bi, X. Zheng, D. Suresh, K. Suh, Z. Li, F. Elsebaei, D.S. Hage, High Performance Affinity Chromatography and Related Separation Methods for the Analysis of Biological and Pharmaceutical Agents, Analyst. 143 (2018) 374–391.
- [16] E. Turiel, A. Martín-esteban, Analytica Chimica Acta Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review, Anal. Chim. Acta. 668 (2010) 87–99.
- [17] M.C. Breadmore, R.M. Tubaon, A.I. Shallan, S.C. Phung, A.S.A. Keyon, D. Gstoettenmayr, P. Prapatpong, A.A. Alhusban, L. Ranjbar, H.H. See, M. Dawod, Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips (2012 – 2014), Electrophoresis. 36 (2015) 36–61.
- [18] V. Hruška, M. Jaroš, B. Gaš, Simul 5 – Free dynamic simulator of electrophoresis, Electrophoresis. 27 (2006) 984–991.
- [19] J.P. Quirino, S. Terabe, P. Bocek, Sweeping of Neutral Analytes in Electrokinetic Chromatography with High-Salt-Containing Matrixes, Anal. Chem. 72 (2000) 1934–1940.
- [20] J. Palmer, J.P. Landers, Stacking Neutral Analytes in Capillary Electrokinetic Chromatography with High-Salt Sample Matrixes in electrokinetic chromatography dependent upon using, Anal. Chem. 72 (2000) 1941–1943.
- [21] B.C. Giordano, C.I.D. Newman, P.M. Federowicz, G.E. Collins, D.S. Burgi, Micelle Stacking in Micellar Electrokinetic Chromatography, Anal. Chem. 79 (2007) 6287–6294.
- [22] M. El-awady, C. Huhn, U. Pyell, Processes involved in sweeping under inhomogeneous electric field conditions as sample enrichment procedure in micellar electrokinetic chromatography, J. Chromatogr. A. 1264 (2012) 124–136.
- [23] M. El-awady, U. Pyell, Sweeping as a multistep enrichment process in micellar electrokinetic chromatography: The retention factor gradient effect, J. Chromatogr. A. 1297 (2013) 213–225.
- [24] J.P. Quirino, Neutral analyte focusing by micelle collapse in micellar electrokinetic chromatography, J. Chromatogr. A. 1214 (2008) 171–177.
- [25] P. Anres, N. Delaunay, W. Thormann, P. Gareil, Influence of high-conductivity buffer composition on field-enhanced sample injection coupled to sweeping in CE, Electrophoresis. 34 (2013) 353–362.
- [26] P. Anres, N. Delaunay, P. Gareil, A chemometric approach for the elucidation of the parameter impact in the hyphenation of field-enhanced sample injection and sweeping in capillary electrophoresis, Electrophoresis. 33 (2012) 1169–1181.
- [27] L. Foteeva, Z. Huang, A.R. Timerbaev, T. Hirokawa, Focusing of anionic micelles using sample- induced transient isotachopheresis: Computer simulation and experimental verification in MEKC, J. Sep. Sci. 33 (2010) 637–642.
- [28] M. Matczuk, L.S. Foteeva, M. Jarosz, M. Galanski, B.K. Keppler, T. Hirokawa, A.R. Timerbaev, Can neutral analytes be concentrated by transient isotachopheresis

- in micellar electrokinetic chromatography and how much?, *J. Chromatogr. A.* 1345 (2014) 212–218.
- [29] S. Dziomba, K. Ciura, M.J. Markuszewski, B. Wielgomas, Migration time shift of analytes in micellar electrokinetic chromatography induced by stacking, *Electrophoresis.* 38 (2017).
- [30] P. Pantuckova, P. Kubá, P. Bocek, Sensitivity enhancement in direct coupling of supported liquid membrane extractions to capillary electrophoresis by means of transient isotachopheresis and large electrokinetic injections, *J. Chromatogr. A.* 1389 (2015) 1–7.
- [31] S. Eustis, M.A. El-Sayed, Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes, *Chem. Soc. Rev.* 35 (2006) 209–217.
- [32] N. Elahi, M. Kamali, M.H. Baghersad, Talanta Recent biomedical applications of gold nanoparticles : A review, *Talanta.* 184 (2018) 537–556.
- [33] L. Calzolari, D. Gilliland, F. Rossi, Measuring nanoparticles size distribution in food and consumer products: a review, *Food Addit. Contam. Part A.* 29 (2012) 37–41.
- [34] X. Subirats, D. Blaas, E. Kenndler, Recent developments in capillary and chip electrophoresis of bioparticles: Viruses, organelles, and cells, *Electrophoresis.* 32 (2011) 1579–1590.
- [35] A. Chetwynd, E. Guggenheim, S. Briffa, J. Thorn, I. Lynch, E. Valsami-Jones, Current Application of Capillary Electrophoresis in Nanomaterial Characterisation and Its Potential to Characterise the Protein and Small Molecule Corona, *Nanomaterials.* 8 (2018) 99.
- [36] N. Surugau, P.L. Urban, Electrophoretic methods for separation of nanoparticles, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1889–1906.
- [37] S. Nichols, Electrophoretic Particle Aggregation, *J. Colloid Interface Sci.* 176 (1995) 342–351.
- [38] V. Kašička, Z. Prusík, B. Gaš, M. Štědrý, Contribution of capillary coiling to zone dispersion in capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis.* 16 (1995) 2034–2038.
- [39] U. Pyell, Characterization of nanoparticles by capillary electromigration separation techniques, *Electrophoresis.* 31 (2010) 814–831.
- [40] U. Pyell, A.H. Jalil, C. Pfeiffer, B. Pelaz, W.J. Parak, Characterization of gold nanoparticles with different hydrophilic coatings via capillary electrophoresis and Taylor dispersion analysis. Part I: Determination of the zeta potential employing a modified analytic approximation, *J. Colloid Interface Sci.* 450 (2015) 288–300.
- [41] S.L. Petersen, N.E. Ballou, Separation of micrometer-size oxide particles by capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 834 (1999) 445–452.
- [42] C. Quang, S.L. Petersen, G.R. Ducatte, N.E. Ballou, Characterization and separation of inorganic fine particles by capillary electrophoresis with an indifferent electrolyte system, *J. Chromatogr. A.* 732 (1996) 377–384.
- [43] J. Polte, Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective, *CrystEngComm.* 17 (2015) 6809–6830.
- [44] R.J. Hunter, *Foundations of Colloid Science*, Second, Oxford University Press, 2001.
- [45] D.H. Napper, Colloid Stability, *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 9 (1970) 467–477.
- [46] J.W. Park, J.S. Shumaker-Parry, Structural study of citrate layers on gold nanoparticles: Role of intermolecular interactions in stabilizing nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 136

- (2014) 1907–1921.
- [47] H. Al-Johani, E. Abou-Hamad, A. Jedidi, C.M. Widdifield, J. Viger-Gravel, S.S. Sangaru, D. Gajan, D.H. Anjum, S. Ould-Chikh, M.N. Hedhili, A. Gurinov, M.J. Kelly, M. El Eter, L. Cavallo, L. Emsley, J.M. Basset, The structure and binding mode of citrate in the stabilization of gold nanoparticles, *Nat. Chem.* 9 (2017) 890–895.
- [48] D.J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, H. Ludi, H.M. Widmers, Capillary Electrophoresis and Sample Injection Systems Integrated on a Planar Glass Chip, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1926–1932.
- [49] D.J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. Fan, C.S. Effenhauser, A. Manz, Micromachining a Miniaturized Capillary Electrophoresis-Based Chemical Analysis System on a Chip, *Science*. 261 (1993) 895–897.
- [50] S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, Microchip electrophoresis with sample stacking, *Electrophoresis*. 16 (1995) 481–486.
- [51] J. Khandurina, S.C. Jacobson, L.C. Waters, R.S. Foote, J.M. Ramsey, Microfabricated Porous Membrane Structure for Sample Concentration and Electrophoretic Analysis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1815–1819.
- [52] C. Yu, M.H. Davey, F. Svec, J.M.J. Fre, E.O.L. Berkeley, Monolithic Porous Polymer for On-Chip Solid-Phase Extraction and Preconcentration Prepared by Photoinitiated in Situ Polymerization within a Microfluidic Device, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5088–5096.
- [53] R.D. Oleschuk, L.L. Shultz-lockyear, Y. Ning, D.J. Harrison, Trapping of Bead-Based Reagents within Microfluidic Systems: On-Chip Solid-Phase Extraction and Electrochromatography, *Anal. Chem.* 72 (2000) 585–590.
- [54] A.J. Haes, A. Terray, G.E. Collins, Bead-Assisted Displacement Immunoassay for Staphylococcal Enterotoxin B on a Microchip, *Anal. Chem.* 78 (2006) 8412–8420.
- [55] Y. Koh, B. Lee, H. Yoon, Y. Jang, Y. Lee, Y. Kim, B. Kim, Bead affinity chromatography in a temperature-controllable microsystem for biomarker detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 2267–2275.
- [56] R.M. Mohamadi, Z. Svobodova, Z. Bilkova, M. Otto, M. Taverna, S. Descroix, J. Viovy, An integrated microfluidic chip for immunocapture , preconcentration and separation of b-amyloid peptides, *Biomicrofluidics*. 9 (2015) 5.
- [57] A. Ali-cherif, S. Begolo, S. Descroix, J. Viovy, L. Malaquin, Programmable Magnetic Tweezers and Droplet Microfluidic Device for High-Throughput Nanoliter Multi-Step Assays, *Ange.* 51 (2012) 1–6.
- [58] A.H.C. Ng, K. Choi, R.P. Luoma, J.M. Robinson, A.R. Wheeler, A. Diagnostics, A.P. Road, A. Park, U. States, Digital Microfluidic Magnetic Separation for Particle-Based Immunoassays, *Anal. Chem.* 84 (2012) 8805–8812.
- [59] Y. Wang, A.L. Stevens, J. Han, Million-fold Preconcentration of Proteins and Peptides by Nanofluidic Filter, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4293–4299.
- [60] D. Wu, A.J. Steckl, High speed nanofluidic protein accumulator †, *Lab Chip*. 9 (2009) 1890–1896.
- [61] S. Song, A.K. Singh, B.J. Kirby, Electrophoretic Concentration of Proteins at Laser-Patterned Nanoporous Membranes in Microchips, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4589–4592.
- [62] A. V Hatch, A.E. Herr, D.J. Throckmorton, J.S. Brennan, A.K. Singh, Integrated Preconcentration SDS - PAGE of Proteins in Microchips Using Photopatterned Cross-Linked Polyacrylamide Gels, *Anal. Chem.* 78 (2006) 4976–4984.
- [63] A.H. Hecht, G.J. Sommer, R.H. Durland, X. Yang, A.K. Singh, A. V Hatch, Aptamers

- as Affinity Reagents in an Integrated Electrophoretic Lab-on-a-Chip Platform, *Anal. Chem.* 82 (2010) 8813–8820.
- [64] S. Thurmman, L. Mauritz, C. Heck, D. Belder, High-performance liquid chromatography on glass chips using precisely defined porous polymer monoliths as particle retaining elements, *J. Chromatogr. A.* 1370 (2014) 33–39.
- [65] S. Yamamoto, S. Hirakawa, S. Suzuki, In Situ Fabrication of Ionic Polyacrylamide-Based Preconcentrator on a Simple Poly (methyl methacrylate) Microfluidic Chip for Capillary Electrophoresis of Anionic Compounds, *Anal. Chem.* 80 (2008) 8224–8230.
- [66] S. Dziomba, M. Biernacki, I. Olędzka, E. Skrzydlewska, T. Baćzek, P. Kowalski, Repetitive injection field-amplified sample stacking for cationic compounds determination, *Talanta.* 125 (2014).
- [67] C.E.H. Schmelzer, M.B.M. Nagel, S. Dziomba, Y. Merkher, S.S. Sivan, A. Heinz, Prolyl hydroxylation in elastin is not random, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1860 (2016).
- [68] S. Dziomba, A. Bekasiewicz, A. Prah, T. Baćzek, P. Kowalski, Improvement of derivatized amino acid detection sensitivity in micellar electrokinetic capillary chromatography by means of acid-induced pH-mediated stacking technique, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014).

Simon Dziomba