

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY



Analiza wybranych związków hydrofobowych przy użyciu technik elektromigracyjnych

Analysis of selected hydrophobic compounds using electromigration techniques

Michał Sergiusz Pieckowski

**Rozprawa doktorska w oparciu o cykl publikacji naukowych
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne**

PROMOTOR PRACY:

dr hab. Piotr Kowalski, prof. GUMed

GDAŃSK 2023

Spis treści

Streszczenie	3
Abstract	5
1. Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	7
2. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników.....	8
2.1. Wprowadzenie.....	8
2.2. Cel pracy.....	14
2.3. Omówienie wyników badań	14
2.4. Wnioski	27
3. Literatura	29
4. Manuskrypty wchodzące w skład rozprawy doktorskiej.....	37
5. Dorobek naukowy	67
5.1. Publikacje	67
5.2. Doniesienia zjazdowe i konferencje.....	67
5.3. Stypendia	68

Streszczenie

Elektroforeza kapilarna (z *ang. capillary electrophoresis* – CE) jest konkurencyjną techniką analityczną dla szeroko stosowanej chromatografii cieczowej. Charakteryzuje się niskim zużyciem odczynników, rozpuszczalników organicznych oraz stosunkowo krótkim czasem analizy, co przekłada się na niskie koszty eksploatacji i przyjazność dla środowiska. Niestety w porównaniu z chromatografią cieczową uzyskiwane granice wykrywalności (z *ang. limit of detection* – LOD) są znacznie wyższe przy użyciu detekcji spektrofotometrycznej, jednak rozwój technik prekoncentracji *on-line* przewyciężył ten problem dla związków wykazujących charakter hydrofilowy. Jednakże, dla związków hydrofobowych, przy dynamicznie rozwijających się trybach separacji i nowych fazach pseudostacjonarnych, wciąż brakuje nowych metod wzmocnienia sygnału. Toksyczne lub farmakologicznie czynne substancje obecne w próbkach biologicznych i środowiskowych na poziomie ultra-śladowym to często związki hydrofobowe, występujące w niskich stężeniach ng mL^{-1} lub nawet pg mL^{-1} . Stąd zasadnym jest poszukiwanie nowych rozwiązań celem obniżenia granic wykrywalności, które poszerzą wiedzę z dziedziny technik elektromigracyjnych w analizie związków o charakterze hydrofobowym. Tematyka niniejszej rozprawy dotyczy opracowania składu nowych matryc próbek oraz metod pozwalających na poprawę limitów detekcji analitów hydrofobowych przy zastosowaniu niezmodyfikowanego, komercyjnego aparatu CE opartego o detekcję spektrofotometryczną.

Dysertacja oparta jest na czterech publikacjach, spójnych tematycznie.

W pierwszej publikacji opracowano parametry dozowania we wzmocnionym polu elektrycznym (z *ang. field amplified sample injection* – FASI) w połączeniu z elektrokinetyczną chromatografią oddziaływań hydrofobowych (z *ang. hydrophobic interactions electrokinetic chromatography* – HIEKC) w celu rozdzielania i wzmocnienia sygnału pięciu antybiotyków makrolidowych: spiramycyny, iwermektyny, tylozyny, josamycyny, rapamycyny oraz jednego antybiotyku ansamycynowego - ryfamycyny. Poprzez odpowiednią manipulację zarówno składem próbki jak i buforu separacyjnego osiągnięto limity detekcji na poziomie $0.08 - 0.18 \mu\text{g mL}^{-1}$, co pozwoliło na zwiększenie czułości w zakresie 17 – 63 razy dla badanych związków w porównaniu do standardowego dozowania hydrodynamicznego (5 s, 0.5 psi). Metoda została zwalidowana i potwierdzono jej przydatność do oznaczania składników aktywnych w kontroli jakości.

W drugiej publikacji zastosowano metodę spiętrzania dużej objętości próbki (z *ang. large volume sample stacking* – LVSS) ze zmianą polaryzacji elektrod i chromatografii elektrokinetycznej cyklodekstryn (z *ang. cyclodextrin electrokinetic chromatography* – CDEKC) do separacji i wzmocnienia sygnału 8 konserwantów: metyloparabenu, etyloparabenu, propyloparabenu, butyloparabenu, izobutyloparabenu, kwasu sorbinowego, kwasu benzoowego, kwasu p-hydroksybenzoowego w preparatach farmaceutycznych. Ponadto zbadano wpływ rodzaju i stężenia cyklodekstryn jako modyfikatorów buforu separacyjnego na rozdział elektroforetyczny. Stwierdzono, że granice wykrywalności analitów dla opracowanej metody mieszczą się w zakresie $0.8-5 \text{ ng mL}^{-1}$, czyli są około 500 razy niższe niż standardowa metoda CDEKC bez techniki wzbogacania analitów w kapilarze.

Trzecia publikacja dotyczy połączenia zmiatania w odwróconej polaryzacji elektrod (z *ang. reverse polarity sweeping* – RP-sweeping) jako techniki prekoncentracji *on-line* i dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz-ciecz (z *ang. disperssive liquid-liquid microextraction* – DLLME) celem jednoczesnego oznaczania mitotanu, jego kwasowego metabolitu DDA oraz pięciu hormonów steroidowych (progesteronu, testosteronu, epitestosteronu, kortyzolu i kortykosteronu) w próbkach moczu. Ponadto opracowano nową matrycę próbki składającą się z kompleksów β -CD₂SDS₁ do solubilizacji związków o wysokiej hydrofobowości. Granice wykrywalności analitów dla opracowanej metody mieściły się w zakresie 1.5 – 3 ng mL⁻¹, czyli około 1000 razy niższe niż w standardowym dozowaniu hydrodynamicznym (5 s, 0.5 psi) bez procedury wzmocnienia sygnału.

W ostatniej publikacji wprowadzono nanoemulsję (NE) typu olej w wodzie (O/W) przygotowaną przez rozcieńczenie „na zimno” mikroemulsji O/W (ME) jako matrycę próbki w mikroemulsyjnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej (z *ang. microemulsion electrokinetic chromatography* – MEEKC) dla wysoce hydrofobowych związków. Zbadano kilka związków modelowych o wartościach log P w zakresie 4.1 – 10.9, z różnych grup chemicznych: retinol, α -tokoferol, cholekalcyferol, filochinon, menachinon-7, dichlorodifenylotrichloroetan oraz iwermektyna. Ponadto, ze względu na stosunkowo niską przewodność matrycy NE (50 – 100 razy mniejszą w porównaniu z buforem separacyjnym) oraz ujemny ładunek elektryczny dostarczany związkom hydrofobowym przez fazę rozproszoną NE, matryce NE połączono z technikami prekoncentracji *on-line* opartymi o elektrokinetyczne dozowanie: FASI oraz dozowanie elektrokinetyczne wspomagane ciśnieniowo (z *ang. pressure assisted electrokinetic injection* – PAEKI). Granice wykrywalności dla witamin K₁ i K₂-MK7 w matrycy NE w połączeniu z technikami FASI (NE-MEEKC FASI) oraz PAEKI (NE-MEEKC-PAEKI) wynosiły odpowiednio 42.9 i 12.1 ng mL⁻¹. W porównaniu do standardowego dozowania hydrodynamicznego (5 s, 0.5 psi) dla mikroemulsyjnej matrycy próbki zapewnia 45-krotne wzmocnienie sygnału.

Wyniki przeprowadzonych badań niewątpliwie potwierdziły znaczący potencjał CE w analizie związków hydrofobowych. Modyfikowanie matrycy próbki środkami powierzchniowo czynnymi, kompleksami lub nanoemulsjami umożliwiającymi całkowite rozpuszczenie analitów, przy jednoczesnym wykorzystaniu technik prekoncentracji *on-line*, zapewnia konkurencyjne LOD w stosunku do metod chromatograficznych.

Abstract

Capillary electrophoresis (CE) is a competitive analytical technique for widely used liquid chromatography. It is characterized by low consumption of reagents, organic solvents and fast analysis time, which turns into low operating costs and environmental friendliness. Unfortunately, compared to liquid chromatography, detection limits (LOD) are significantly higher when using spectrophotometric detection, however, the development of on-line preconcentration techniques has overcome this problem for ionic compounds. Nevertheless, for compounds of a hydrophobic nature, with dynamically developing separation modes and new pseudostationary phases, there is still insufficient research on on-line preconcentration techniques. Toxic or pharmacologically active substances in biological and environmental samples at the ultra-trace level are often hydrophobic compounds, present in low concentrations of ng mL^{-1} or even pg mL^{-1} . Therefore, it is reasonable to look for new solutions to lower the limits of detection, which will expand the knowledge in the field of electromigration techniques in the analysis of hydrophobic compounds. The subject of this dissertation concerns the development of the composition of new sample matrices and methods to improve the limits of the detection of hydrophobic analytes using an unmodified, commercial CE apparatus based on spectrophotometric detection.

The dissertation is based on four publications, thematically coherent.

The first publication developed field amplified sample injection (FASI) in combination with hydrophobic interactions electrokinetic chromatography (HIEKC) to separate and enhance the signal of five macrolide antibiotics: spiramycin, ivermectin, tylosin, josamycin, rapamycin and rifamycin. By manipulating both the composition of the sample and the separation buffer, LOD of 0.08 - 0.18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were achieved, which allowed to increase the sensitivity in the range of 17 - 63 times for test compounds compared to standard hydrodynamic injection (HDI) (5 s, 0.5 psi). The method has been validated and its suitability for the determination of active ingredients in quality control analysis has been confirmed.

In the second publication, the method of large volume sample stacking (LVSS) with polarity switching and cyclodextrin electrokinetic chromatography (CDEKC) was used to separate and amplify the signal of 8 preservatives: methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, isobutylparaben, sorbic acid, benzoic acid, p-hydroxybenzoic acid in pharmaceutical preparations. In addition, the influence of the type and concentration of cyclodextrins as separation buffer modifiers on the electrophoretic separation was investigated. It was found that the detection limits of the analytes for the developed method are in the range of 0.8–5 ng mL^{-1} , which is about 500 times lower than the standard CDEKC method without any on-line preconcentration techniques.

The third publication concerns the combination of reverse polarity sweeping (RP-sweeping) as an on-line preconcentration technique and dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) for the simultaneous determination of mitotane, its acid metabolite DDA and five steroid hormones (progesterone, testosterone, epitestosterone, cortisol and

corticosterone) in urine samples. In addition, a new sample matrix consisting of β -CD₂SDS₁ complexes was developed to solubilize compounds with high hydrophobicity. Detection limits of analytes for the developed method were in the range of 1.5 - 3 ng mL⁻¹, which is about 1000 times lower than in standard HDI (5 s, 0.5 psi) without the signal amplification procedure.

The latest publication introduced an oil-in-water (O/W) nanoemulsion (NE) prepared by cold dilution of an O/W microemulsion (ME) as a sample matrix in microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) for highly hydrophobic compounds. Several model compounds with logP values in the range of 4.1-10.9 from different chemical groups were tested: retinol, α -tocopherol, cholecalciferol, phylloquinone, menaquinone-7, dichlorodiphenyltrichloroethane and ivermectin. In addition, due to the relatively low conductivity of the NE matrix (50-100 times lower compared to the separation buffer) and the negative electric charge provided to the hydrophobic compounds by the NE dispersed phase, the NE matrixes were combined with on-line preconcentration techniques based on electrokinetic dosing: FASI and pressure assisted electrokinetic injection (PAEKI). Detection limits for vitamins K₁ and K₂-MK7 in the NE matrix in combination with FASI (NE-MEEKC FASI) and PAEKI (NE-MEEKC-PAEKI) were 42.9 and 12.1 ng mL⁻¹, respectively. Compared to standard HDI (5 s, 0.5 psi) for a microemulsion sample matrix, it provides a 45-fold signal amplification.

The results of the conducted research undoubtedly confirmed the significant potential of CE in the analysis of hydrophobic compounds. Modification of the sample matrix with surfactants, complexes or nanoemulsions enabling complete dissolution of the analytes, while using on-line pre-concentration techniques, provides a competitive LOD compared to chromatographic methods.

1. Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

- D1 Kowalski, P., Olędzka, I., Plenis, A., Miękus, N., Pieckowski, M., & Bączek, T. (2019). Combination of field amplified sample injection and hydrophobic interaction electrokinetic chromatography (FASI-HIEKC) as a signal amplification method for the determination of selected macrocyclic antibiotics. *Analytica Chimica Acta*, 1046, 192–198.
Punktacja IF = 5.977. Punktacja MNiSW: 100.
- D2 Pieckowski, M., Kowalski, P., & Bączek, T. (2020). Combination of large volume sample stacking with polarity switching and cyclodextrin electrokinetic chromatography (LVSS-PS-CDEKC) for the determination of selected preservatives in pharmaceuticals. *Talanta*, 211, 1–6.
Punktacja IF = 6.057. Punktacja MNiSW: 100.
- D3 Pieckowski, M., Kowalski, P., Olędzka, I., Miękus-Purwin, N., Plenis, A., Roszkowska, A., & Bączek, T. (2022). Simultaneous determination of mitotane, its metabolite, and five steroid hormones in urine samples by capillary electrophoresis using β -CD₂SDS₁ complexes as hydrophobic compounds solubilizers. *Electrophoresis*, 43, 990–997
Punktacja IF = 3.535. Punktacja MNiSW: 70.
- D4 Pieckowski, M., Kowalski, P., Olędzka, I., Roszkowska, A., Plenis, A., & Bączek, T. (2022). Nanoemulsion supported microemulsion electrokinetic chromatography coupled with selected preconcentration techniques as an approach for analysis of highly hydrophobic compounds. *Journal of Chromatography A*, 1677, 1–8.
Punktacja IF = 4.601. Punktacja MNiSW: 100.

Sumaryczna wartość Współczynnika Oddziaływania (Impact Factor, IF) dla prac wchodzących w skład osiągnięcia wynosi: **20.170**.

Sumaryczna wartość punktów MNiSW dla prac wchodzących w skład osiągnięcia wynosi: **370**,
liczba cytowań 30, Index Hirscha: 3

2. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

2.1. Wprowadzenie

Od czasu wprowadzenia nowoczesnej elektroforezy kapilarnej (z *ang. capillary electrophoresis* – CE) przez Jorgensona i Lukacsa w 1981 r. [1], techniki elektromigracyjne stały się wszechstronnym narzędziem separacyjnym. Po pierwszej dekadzie badań rozwojowych i komercjalizacji przyrządów technika CE zajęła miejsce wśród uznanych narzędzi analitycznych np. jest metodą z wyboru do szybkiego sekwencjonowania DNA w wysokiej rozdzielczości już od lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku [2]. Chociaż jej rozpowszechnienie jest znacznie mniejsze niż chromatografii cieczowej i gazowej, CE nadal odgrywa kluczową rolę we współczesnej analityce. Wraz z pojawieniem się biofarmaceutyków, CE okazała się szczególnie przydatna w rutynowych badaniach białek terapeutycznych, takich jak przeciwciała monoklonalne [3]. Obecne zastosowania CE sięgają od oznaczania małych jonów nieorganicznych [4] do charakteryzowania biomolekuł o dużej masie cząsteczkowej [5], a nawet nienaruszonych komórek [6], produktów metabolizmu komórek bakteryjnych [7], czy nanocząstek [8]. Dziedzina badań CE pozostaje bardzo aktywna, o czym świadczy stały i znaczący napływ raportów naukowych na temat teorii, trybów separacji, nowego oprzyrządowania i zastosowań technik elektromigracyjnych w różnych dziedzinach nauki [9-11].

Niska rozpuszczalność w roztworach wodnych związków biologicznie czynnych o charakterze hydrofobowym jest nurtującym problemem analitycznym w technikach elektromigracyjnych, gdyż CE w swoim pierwotnym założeniu była przeznaczona do separacji związków jonowych. Stąd za początek separacji analitów neutralnych w CE datuje się wprowadzenie micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (z *ang. micellar electrokinetic chromatography* – MEKC) w 1984 r., gdzie fazą pseudostacjonarną stanowiły micide surfaktantu jonowego laurylosiarczanu sodu (z *ang. sodium dodecyl sulfate* – SDS) [12]. Kolejnym przełomem w modyfikacji fazy pseudostacjonarnej było wprowadzenie w 1991 r. mikroemulsji typu olej/woda (z *ang. microemulsion electrokinetic chromatography* – MEEKC), gdzie za separację analitów odpowiadała faza zdyspergowana [13]. Następnie w 1998 r. po raz pierwszy opisane zostały oddziaływania hydrofobowe (z *ang. hydrophobic interactions electrokinetic Chromatography* – HIEKC) pomiędzy monomerami surfaktantu, przez użycie wysokich stężeń rozpuszczalników organicznych, które uniemożliwiały tworzenie układu micelnego [14]. Obok modyfikacji fazy pseudostacjonarnej, w 1994 r. zamiast wody w elektrolicie podstawowym (z *ang. background electrolyte* – BGE) zastosowano jako rozpuszczalnik formamid, dając początek elektroforezie kapilarnej w środowisku niewodnym (z *ang. nonaqueous capillary electrophoresis* – NACE) [15]. NACE cechuje wiele zalet takich jak możliwość połączenia z czułymi detektorami spektrometrii masowej czy wzbudzonej laserowo fluorescencji, jednakże przez użycie wielu toksycznych rozpuszczalników m.in amidów (formamidu, *N*-metyloformamidu, *N,N*-dimetyloformamidu, *N,N*-dimetyloacetamidu), czy nitrometanu osiągnięcia w tej dziedzinie nie będą (w tym opracowaniu) poruszane.

Z powodzeniem zastosowano układ miceli mieszanych składających się z cholanu sodu i SDS w BGE celem oznaczenia benzofenonów [16], lub bromku heksadecylotrimetyloamoniowego i Brij-35 w analizie antybiotyków makrolidowych [17]. Zastosowanie układu mieszanych miceli pozwala na zwiększenie rozdzielczości układu elektroforetycznego. Obok miceli, niemodyfikowane lub modyfikowane cyklodekstryny (z *ang. cyclodextrin* – CD) mogą pełnić rolę fazy pseudostacjonarnej, dzięki formowaniu kompleksów inkluzyjnych z hydrofobowymi związkami [18]. Interesującą publikacją z wykorzystaniem tych interakcji jest praca Luonga i Guo, gdzie przeprowadzono separację 16 policyklicznych węglowodorów aromatycznych z wykorzystaniem β -cyklodekstryny modyfikowanej grupami sulfbutyloeterowymi (SB- β -CD) oraz mieszaniny SB- β -CD z dokuzynianem sodu [18]. Modyfikowana cieczami jonowymi MEKC została użyta w analizie mieszanin ketonów arylowych. Dzięki obecności cieczy jonowych znacznej poprawie uległa rozdzielczość układu elektroforetycznego dla mieszanin hydrofobowych [19]. W 2009 r. po raz pierwszy zastosowano liposomalną elektrokinetyczną chromatografię w zbadaniu interakcji pomiędzy liposomami, a lekami znieczulającymi miejscowo o charakterze hydrofobowym (bupiwakaina, prylokaina). Faza pseudostacjonarna składała się z różnych stężeń 1-palmitoilo-2-oleilo-sn-glicerofosfatydylocholino, fosfatydyloglicerolu, kardiolipiny, cholesterolu, kwasu oleinowego i kwasu linolowego [20]. Typowe bufony separacyjne oparte o mikroemulsję z SDS są niekompatybilne ze spektrometrem masowym wykorzystującym jonizację przez elektrorozpylanie. Ten problem został rozwiązany przez wprowadzenie mikroemulsji bez surfaktanta (z *ang. surfactant-free microemulsion electrokinetic chromatography* – SF-MEEKC) składającą się z wody, etanolu i 1-oktanolu, dzięki czemu możliwe było oznaczenie m.in. witamin rozpuszczalnych w tłuszczach (tj. cholekalcyferol) [21]. Kolejną modyfikacją w elektrokinetycznej chromatografii było wprowadzenie kationowych nanocząstek lateksu celem separacji arylofenyloketonów [22]. Najnowsze badania w dziedzinie CE dotyczą rozpuszczalników głęboko eutektycznych (z *ang. deep eutectic solvents* – DES) o potencjale hydrofobowym (HDES), które mogą funkcjonować jako jednorodna faza pseudostacjonarna nieulegająca dysocjacji. Ten cel po raz pierwszy osiągnął Li A. i in. wykorzystując (-)-mentol:kwas oktanowy w postaci fazy pseudostacjonarnej w trybie elektrokinetycznej chromatografii. HDES tworzył stabilne agregaty, których selektywność względem analitów była oparta o interakcje hydrofobowe [23], można przypuszczać, że niedługo HDES dzięki swym unikalnym właściwościom zostanie zastosowany w separacji związków hydrofobowych.

Pomimo wielu dostępnych technik separacji związków hydrofobowych, CE jest nadal uważana za technikę niszową w aspekcie analizy tej grupy związków. Bez wątpienia główną wadą CE względem technik chromatograficznych jest jej ograniczona czułość związana z krótką drogą optyczną spowodowana stosowaniem kapilar o wąskich średnicach oraz znacząca dysproporcja w objętości dozowanej próbki tj. kilku nanolitów w porównaniu do objętości stosowanych w technikach chromatograficznych, które są od 2 do 3 rzędów większe. Jednakże, poszukiwania mające na celu rozwiązanie problemu niskiej oznaczalności CE już od lat 90 ubiegłego wieku stały się coraz bardziej intensywne dzięki rozwojowi zjawiska spiętrzania (z *ang. stacking*) analitów w kapilarze [24].

Obecnie do dyspozycji analityków znajduje się szerokie spektrum technik prekoncentracji *on-line* w postaci: spiętrzania Kohlrauscha, opartego o funkcję regulacyjną

Kohlrauscha, opisującej sposób w jaki strefy elektroforetyczne wzajemnie dostosowują swoje przewodności elektryczne oparte o stężenie jonów [25]. Ta zasada spiętrzania obejmuje techniki wykorzystujące dozowanie hydrodynamiczne, w tym technikę zwaną spiętrzaniem dużej objętości próbki (z ang. *large volume sample stacking* –) [26] lub spiętrzaniem próbki we wzmocnionym polu elektrycznym (z ang. *field amplified sample stacking* – FASS) [27]. Inną techniką tego rodzaju jest dozowanie próbki we wzmocnionym polu elektrycznym (z ang. *field amplified sample injection* – FASI) [28], w którym próbka jest wprowadzana elektrokinetycznie, zwykle po hydrodynamicznej preiniekcji wody, lub innego medium cechującego się niską przewodnością elektryczną (tj. rozpuszczalniki organiczne).

Obok możliwości manipulacji przewodnością elektryczną próbki i BGE w ramach prekoncentracji wykorzystuje się różnice w wartościach pH pomiędzy próbką, a BGE. Dynamiczne krzyżowanie pH (z ang. *dynamic pH-junction*) służy do spiętrzania słabych elektrolitów, które są selektywnie zateżane ze względu na zależność ich efektywnej ruchliwości od wartości pH. Zwykle pH roztworu próbki znacznie różni się od pH BGE i jest tak dobierana by zapewnić pełną jonizację analitów. Anality dozowane są do kapilary wypełnionej BGE na drodze elektromigracji, ich efektywne ruchliwości są silnie zmniejszone i ulegają koncentracji w krótkiej strefie [29]. W tak zwanym spiętrzaniu zależnym od pH (z ang. *pH-mediated stacking*) próbka jest zwykle dozowana elektrokinetycznie do kapilary, a przeciwny BGE migrują do strefy próbki. Następnie do kapilary wprowadza się niewielką objętość mocnego kwasu lub zasady, aby utworzyć strefę o niskim przewodnictwie poprzez miareczkowanie jonów BGE w strefie próbki [30]. Obok różnic w przewodnictwie oraz wartościach pH, wykorzystuje się również zjawisko przejściowej izotachoforezy (z ang. *transient isotachopheresis* – tITP) [31] opierające się na wykorzystaniu buforów nieciągłych w stosunku do jonów o zróżnicowanej ruchliwości. W trybie tITP ruchliwość jonu wiodącego jest większa, a jonu terminującego mniejsza od zjonizowanych analitów. W stanie równowagi jony próbki dostosowują swoje stężenie, aby poruszać się z taką samą prędkością jak jon wiodący i ulegają spiętrzaniu pomiędzy strefą jonu wiodącego, a terminującego. Modyfikacją tITP jest pseudo-tITP, która polega na zastosowaniu mieszających się z wodą rozpuszczalników organicznych, które mogą działać jako jon terminujący [32].

Ponadto w technikach prekoncentracji *on-line* zastosowanie znalazły micelle czy cyklodekstryny, które po raz pierwszy opisane zostały przez Qurino i Terabe zastosowali zmiatanie próbki (z ang. *sweeping*) fazą pseudostacjonarną składającą się z miceli SDS [33]. Inne techniki obejmują rozpad miceli w układzie buforów nieciągłych, które obejmują ogniskowanie analitów przy użyciu rozpadu miceli (z ang. *analyte focusing by micelle collapse* – AFMC) [34] z wykorzystaniem różnic pomiędzy przewodnością próbki i BGE, a także destabilizacja miceli rozpuszczalnikiem, gdzie wykorzystuje się wysokie stężenia rozpuszczalnika organicznego w BGE (z ang. *micelle to solvent stacking* – MSS) [35]. Jedną z najmłodszych technik jest modyfikacja MSS, destabilizacja miceli cyklodekstrynami (z ang. *micelle to cyclodextrin stacking* – MCDS) [36], gdzie zamiast rozpuszczalnika organicznego zastosowano różnice w powinowactwie analitów między micelami, a cyklodekstrynami.

Tabela 1. Przedstawienie jednowymiarowych technik prekoncentracji *on-line* stosowanych w CE

Technika prekoncentracji	Ładunek analitów	Siła wzmocnienia sygnału
LVSS	⊕ ⊖	$10^2 - 10^3$
FASS	⊕ ⊖	$10^1 - 10^2$
FASI	⊕ ⊖	$10^2 - 10^3$
Techniki oparte o zmiany pH	⊕ ⊖	$10^1 - 10^3$
tITP, pseudo-tITP	⊕ ⊖	$10^2 - 10^3$
Sweeping	⊕ ⊖ ○	$10^1 - 10^3$
AFMC	○	$10^1 - 10^2$
MSS	⊕ ⊖	$10^1 - 10^2$
MCDS		

Przedstawione techniki prekoncentracji *on-line*, które zostały ujęte w Tabeli 1 należą do technik jednowymiarowych. Można zauważyć, iż jedynie zmiatanie (sweeping) oraz AFMC dotyczą mechanizmów w założeniu dedykowanym analitom o charakterze neutralnym i głównie zmiatanie stosuje się w separacji związków hydrofobowych, celem wzmocnienia ich sygnału. Przeważnie literatura obfituje w prace dokumentujące oznaczania hormonów steroidowych wraz z techniką zmiatania i przy zastosowaniu detekcji spektrofotometrycznej UV-Vis [37, 38]. Ponadto, w nowszych doniesieniach napotkać można szereg możliwości kombinacji przy dozowaniu próbki, takich jak: hydrodynamiczne wypełnienie całej kapilary próbką z zmiataniem, gdzie osiągnięto limity detekcji (*z ang. limit of detection* – LOD) na poziomie 50 – 1000 ng mL⁻¹ dla pięciu steroidów [39], czy kombinacji powtarzalnego dostrzyku dużej objętości próbki oraz zmiatania, gdzie LOD wyniósł dla trzech hormonów pomiędzy 50 – 200 ng mL⁻¹ [40]. Poza tym wprowadzono również modyfikację cyklodekstrynami micelarnej fazy pseudostacjonarnej w postaci 20 mM hydroksypropylo-β-CD w połączeniu z techniką zmiatania w metodzie oznaczenia loratadyny i desloratadyny [41]. Niestety, zmiatanie jest obarczone ograniczeniami, które w przypadku związków wysoce hydrofobowych często uniemożliwiają ich oznaczenie. Mechanizm separacji tej techniki narzuca wykorzystanie matrycy próbki, które są pozbawione miceli surfaktanta – potencjalnego solubilizatora, gdyż może to mieć istotny wpływ na efektywność procesu prekoncentracji. Z kolei rozpuszczanie analitów hydrofobowych w roztworach o wysokich stężeniach rozpuszczalników organicznych zwiększa krytyczne stężenie micelarne (*z ang. critical micelle concentration* – CMC) i dodatkowo może przyczynić się do destabilizacji procesu prekoncentracji. Druga technika oparta o zastosowanie miceli – AFMC jest przeznaczona dla związków neutralnych, jednak stosunkowo niewiele prac dotyczy hydrofobowych analitów, pomimo, iż sam odkrywca metody stosował progesteron jako analit wzorcowy [42]. Przyczyną małej ilości publikacji dotyczących zastosowania techniki AFMC może być fakt stosunkowo niedawnego odkrycia mechanizmu prekoncentracji, wysoki poziom skomplikowania metody, a także obligatoryjnie niskie stężenie surfaktanta w próbce, co ogranicza możliwości analizy związków silnie hydrofobowych [43]. Dotychczas jedynym zastosowaniem techniki AFMC w analizie

związków hydrofobowych jest praca Dawoda i in., gdzie oznaczano leki z grupy statyn, których wartości $\log P$ wynosiły powyżej 3.5 a uzyskane wartości LOD w porównaniu z techniką zmiatania były znacznie niższe [44].

Obok technik prekoncentracji *on-line* opartych na zastosowaniu miceli, we wzmacnieniu sygnału możliwa jest odpowiednia manipulacja składem i przewodnością zarówno próbki jak i BGE, a więc spiętrzaniem Kohlrauscha. W związku z brakiem ładunku, z wyboru, związki hydrofobowe dozuje się hydrodynamicznie do wnętrza kapilary, przez co w literaturze można odnaleźć prace głównie z wykorzystaniem techniki FASS [45], gdzie zarówno bufor separacyjny, jak i próbka zawierają micelle, natomiast matryca próbki wykazuje stosunkowo niską przewodność względem BGE. Co więcej, udało się obejść ograniczenia związane z dozowaniem elektrokinetycznym poprzez modyfikowanie matrycy próbki micelami surfaktantu – neutralne anality, które oddziałując z rdzeniem hydrofobowym miceli uzyskują pozorny ładunek elektryczny. Tak zmodyfikowaną techniką FASI oznaczano steroidy [46], bisfenole [47] oraz benzofenony [48]. Można zauważyć, iż w ostatniej pracy dotyczącej benzofenonów, stosując anality zróżnicowane pod względem wartości $\log P$, zaobserwowano zależność pomiędzy $\log P$ a LOD, gdzie anality bardziej hydrofobowe cechowały się wyższymi limitami detekcji. Nasuwa się wniosek, iż taka korelacja ma podłoże w ich *zdolności do solubilizacji i oddziaływaniach van der Waalsa* – im wyższa hydrofobowość, tym wyższe zapotrzebowanie na całkowitą solubilizację, przez co wysokie stężenie surfaktanta jonowego generuje wyższą przewodność próbki, która obniża potencjał techniki FASI

Tabela 2. Wady i zalety technik prekoncentracji *on-line* w analizie związków hydrofobowych.

Techniki prekoncentracji <i>on-line</i> w analizie związków hydrofobowych	Zmiatanie	Zalety	Prosta metodologia Możliwość połączenia z innymi technikami Szerokie spektrum zastosowań Wzmocnienie sygnału rzędu 10^3 Wielokrotne wykorzystanie próbki
		Wady	Restrykcyjny skład matrycy próbki Niska rozdzielczość
	AFMC	Zalety	Technika dedykowana neutralnym analitom Matryca może zawierać niskie stężenia surfaktanta, co poprawia rozpuszczalność analitów Wielokrotne wykorzystanie próbki
		Wady	Skomplikowana metodologia Stosunkowo wyższe limity detekcji, względem zmiatania rzędu 10^2 Konieczność kontroli przewodności próbki i buforu Dozowanie dużych objętości wymaga dłuższych kapilar
	FASS	Zalety	Prosta metodologia Możliwość połączenia z innymi technikami Wielokrotne wykorzystanie próbki
		Wady	Wzmocnienie rzędu 10^1 Niezależna od długości kapilary
	FASI	Zalety	Możliwość połączenia z innymi technikami Wzmocnienie sygnału rzędu 10^3
		Wady	Ograniczenia w stężeniu surfaktanta jonowego w matrycy Niższe limity detekcji w porównaniu do związków jonowych Jednokrotne wykorzystanie próbki

Cechy najczęściej stosowanych technik prekoncentracyjnych dla analitów hydrofobowych w kapilarze zostały zebrane w Tab.2, Ponadto, stosunkowo ubogi wybór metod prekoncentracji *on-line*, przy dynamicznie rozwijających się trybach separacji dla związków hydrofobowych **otwiera nową przestrzeń** do badań, które umożliwiłyby rozwiązanie problemu zateżania tych analitów w kapilarze. Co ważniejsze, z powodu przewagi względem technik chromatograficznych, jaką oferuje CE, w kontekście niskiego zużycia rozpuszczalników organicznych, prostej automatyzacji, wysokiej rozdzielczości i niskich kosztów eksploatacji zasadne staje się poszukiwanie nowych rozwiązań obniżenia wartości LOD oraz opracowania nowych składów matryc próbek. Prace, które składają się na prezentowaną rozprawę zawierają się w tym nurcie. które poszerzą wiedzę z dziedziny technik elektromigracyjnych w analizie związków o charakterze hydrofobowym.

2.2. Cel pracy

Prezentowana rozprawa doktorska składa się z 4 prac oryginalnych (oznaczonych D1 – D4), których celem było opracowanie nowych strategii w analizie związków hydrofobowych z różnorodnych grup chemicznych, gdzie główny nacisk położony został na opracowanie składu i stężenia komponentów matrycy próbki i buforu separacyjnego. Priorytetem badań było osiągnięcie niskich wartości LOD, uzyskanie satysfakcjonujących warunków ostrości i rozdzielczości pików, przy stosunkowo krótkim czasie separacji i zastosowaniu najpopularniejszego detektora spektrofotometrycznego w zakresie UV-Vis.

W publikacji D1 głównym celem było opracowanie nowej matrycy próbki dla związków makrocząsteczkowych o charakterze hydrofobowym zawierającej stężenie surfaktanta znacznie poniżej jego CMC. Jako związki modelowe wybrano sześć antybiotyków makrolidowych o wartościach logP powyżej 4. Ponadto wyznaczono dwa dodatkowe cele w postaci połączenia nowo opracowanej matrycy z techniką prekoncentracji *on-line* opartej o dozowanie elektrokinetyczne, a także zbadanie wpływu matrycy na efekt wzmocnienia sygnału.

Celem badawczym w publikacji D2 było określenie wpływu cyklodekstryn (wysokosulfonowanych oraz niemodyfikowanych) na efektywność separacji konserwantów (głównie pochodnych kwasu p-hydroksybenzoesowego) o wysokich wartościach logP (1.77 – 3.5) oraz wprowadzenie prekoncentracji *on-line* bazującej na spiętrzaniu dużej objętości próbki w kombinacji z buforem modyfikowanym cyklodekstrynami.

Podstawą publikacji D3 obok skupienia się na mechanizmach prekoncentracji było również poruszenie aspektu możliwości optymalizacji składu próbki w badaniach metabolomicznych. Jako główne zadanie postawiono problematykę jednoczesnego oznaczenia mitotanu i jego metabolitu wraz z 5 hormonami steroidowymi (istotnymi pod kątem diagnostycznym) w próbkach moczu. Dodatkowym założeniem było opracowanie całkowicie nowej matrycy próbki dla związków o charakterze hydrofobowym, która umożliwi zastosowanie zmiatania jako techniki prekoncentracji *on-line*.

W publikacji D4 celem było rozwiązanie problemu limitów dozowania we wzmocnionym polu elektrycznym dla związków hydrofobowych poprzez wprowadzenie nanoemulsji stanowiącej matrycę próbki. Jako związki modelowe wybrano witaminy rozpuszczalne w tłuszczach – A, D, E, K₁, K₂, antybiotyk – iwermektynę oraz pestycyd – dichlorodifenylotrichloroetan (DDT). Ponadto zbadano wpływ nanoemulsji na efekt wzmocnienia sygnału w połączeniu z technikami prekoncentracji *on-line* opartymi o dozowanie elektrokinetyczne i MEEKC jako tryb separacji. Dodatkowo przeprowadzono eksperymenty porównawcze nanoemulsji opartych o różne fazy olejowe przy użyciu dynamicznego rozpraszania światła.

2.3. Omówienie wyników badań

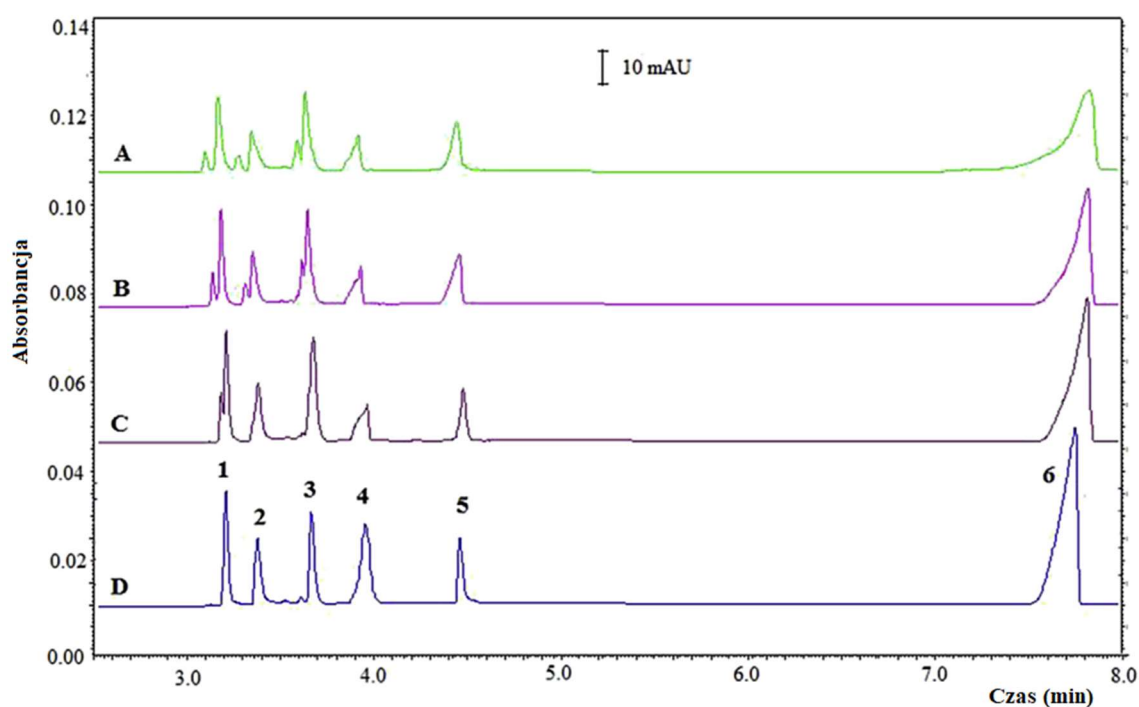
Antybiotyki makrolidowe to grupa blisko spokrewnionych związków stanowiących połączenia glikozydowe, w których aglikon to wielocząłowy, bezazotowy pierścień laktonowy, natomiast sacharydową częścią są metylopentozy, zaś jedna z nich jest aminosacharydem. Największe znaczenie w medycynie mają związki posiadające 14-, lub 16-

członowe aglikony [49]. Makrolidy są hydrofobowymi, słabo zasadowymi lekami o wartościach pKa w zakresie 7,1-8,9 (tylko rapamycyna wykazuje pKa bliskie 10), dlatego te antybiotyki bardzo łatwo przenikają do tkanek (o pH niższym niż krew) drogą niejonowej dyfuzji biernej [50]. Podstawową trudnością związaną z analizą tych związków technikami elektromigracyjnymi jest ich niska lub znikoma rozpuszczalność w roztworach wodnych pomimo obecności w ich strukturze ugrupowań jonizowalnych. Ponadto makrolidy są stosunkowo dużymi cząsteczkami, pozbawionymi chromoforów i zwykle mogą być obecne w materiale biologicznym w niewielkich ilościach (na poziomie $\mu\text{g mL}^{-1}$). Ze względu na bardzo małą rozpuszczalność w buforach wodnych związki makrocykliczne mogą ulegać wytrącaniu podczas analizy elektroforetycznej, co wymaga specjalnego podejścia w wyborze parametrów rozdzielania metodą CE. Dodatkowo z powodu obecności wiązania glikozydowego w ich strukturze, w warunkach silnie kwasowych oraz zasadowych może następować zjawisko hydrolizy. Dotychczas elektroforetyczne oznaczenia makrolidów dotyczyły modyfikacji BGE przy użyciu takich układów jak: cholan sodu-acetonitryl i acetonitryl-fosforan [51] lub bromek cetylotrimetyloamoniowy-cholan sodu i fosforan) [52]. Jednak dostępne w literaturze metody CE do analizy antybiotyków makrocyklicznych dotyczą najczęściej tylko pojedynczego związku [53]. Natomiast celem uzyskania niskich granic detekcji w analizie makrolidów stosuje się chromatografię cieczową w połączeniu ze spektrometrią masową [54,55]. W **publikacji D1** wstępne badania dotyczyły optymalizacji składu BGE oraz matrycy próbki celem separacji wybranych antybiotyków makrolidowych. Obiecujące rezultaty otrzymano po zastosowaniu cholanu sodu oraz soli fosforanowych (30 mM cholan sodu, 20 mM NaH_2PO_4 , 40 % $[\text{v v}^{-1}]$ metanol, pH = 7.51). Wykorzystano również bufor zawierający mieszane micelle (20 mM cholan sodu, 7 mM CTAB, 40 mM Na_3PO_4 pH = 7). Micelarne bufor zapewniały rozdzielanie wszystkich 6 wybranych antybiotyków, przy stosunkowo niskiej, niezadowalającej granicy oznaczalności spowodowanej krótkim dozowaniem HDI i w stosunkowo długim czasie separacji (~20 min.), który wynikał z silnego oddziaływania analitów z fazą pseudostacjonarną. Z tego względu zrezygnowano z zastosowania surfaktantów jonowych w BGE, pozostając przy wysokim stężeniu rozpuszczalnika organicznego. Aby zapewnić pełne rozpuszczenie analitów w BGE, przetestowano bufor fosforanowe zawierające 40, 50, 60 i 65 % (v v^{-1}) acetonitrylu do oznaczania analitów. Wyniki potwierdziły, że zwiększenie zawartości acetonitrylu do 60% poprawia rozdzielczość. Chociaż Flurer [51] opisał użycie nawet 65% ACN w BGE dla makrolidów, jednakże w tej sytuacji powodowało to przerwanie analizy przed osiągnięciem 25 kV (między 50 a 60 s od rozpoczęcia separacji). Dlatego do dalszych badań zastosowano bufor separacyjny składający się z 60% (v v^{-1}) acetonitrylu i 20 mM fosforanu (pH 7.1), gdyż zapewniał wysokie i intensywne sygnały i najbardziej symetryczne piki dla makrolidów w czasie rozdzielania nieprzekraczającym 8 min.

Wszystkie badane antybiotyki rozpuszczone w czystych rozpuszczalnikach organicznych nie ulegały separacji, ponieważ matryca generowała niestabilne natężenie pola elektrycznego układu separacyjnego. Badania przeprowadzone przez Lalloo [56] wykazały, że ze względu na wyjątkowo niską rozpuszczalność leków makrocyklicznych w roztworach wodnych, wymagają one wprowadzenia 20% (v v^{-1}) rozpuszczalnika organicznego do rozcieńczalnika próbki, aby zapobiec precypitacji analitów w matrycy próbki. W celu uzyskania zadowalającego parametrów rozdzielania makrolidów zmodyfikowano skład roztworu próbki pod kątem

zawartości acetonitrylu i SDS. Dodanie jonowego surfaktanta w małej ilości do roztworu próbki w obecności ACN nie jest w stanie utworzyć miceli. Konsekwencją tego jest brak możliwości wytworzenia fazy pseudostacjonarnej i pojawienie się oddziaływań hydrofobowych pomiędzy wolnymi monomerami SDS a lipofilowymi makrolidami. W wyniku takiego podejścia cząsteczki analitów oddziałują z grupami laurylosiarczanowymi, tworząc wiązania hydrofobowe. Anality otrzymują ładunek ujemny i po dozowaniu EKI ulegają separacji zgodnie z mechanizmem strefowej elektroforezy kapilarnej (z ang. *capillary zone electrophoresis* – CZE). Wyniki potwierdziły, że dzięki zawartości 3.5 mM SDS oraz 10 % acetonitrylu w roztworze próbki, uzyskano warunki wystarczające by całkowicie rozpuścić anality i otrzymać symetryczne, ostre i wysoki piki wybranych leków makrocyklicznych metodą dozowania we wzmocnionym polu elektrycznym (z ang. *field amplified sample injection* – FASI) w połączeniu z elektrokinetyczną chromatografią oddziaływań hydrofobowych (z ang. *hydrophobic interactions electrokinetic chromatography* – HIEKC)

Badania antybiotyków rozpoczęto od dozowania HDI, jednak, jak już wspomniano towarzyszyło temu częste przerywanie analizy ze względu na spadek natężenia pola elektrycznego. Zamiennie zastosowano dozowanie EKI w odwróconej polaryzacji elektrod, gdyż po optymalizacji składu próbki, zawierającej surfaktant anionowy - SDS - doszło do nadania pozornego ładunku ujemnego cząsteczkom makrolidów. Przy czym dzięki stosunkowo niskiej przewodności próbki możliwe stało się zastosowanie techniki FASI. Mechanizm metody polegał na wypełnieniu kapilary BGE, następnie dozowaniu HDI, krótkiej preiniekcji wody (5 sek, 0.5 psi), a następnie właściwym dozowaniu EKI w odwróconej polaryzacji elektrod -10 kV przez 18 sek. Ryc. 1 przedstawia wpływ stężenia SDS w próbce w połączeniu z techniką FASI.

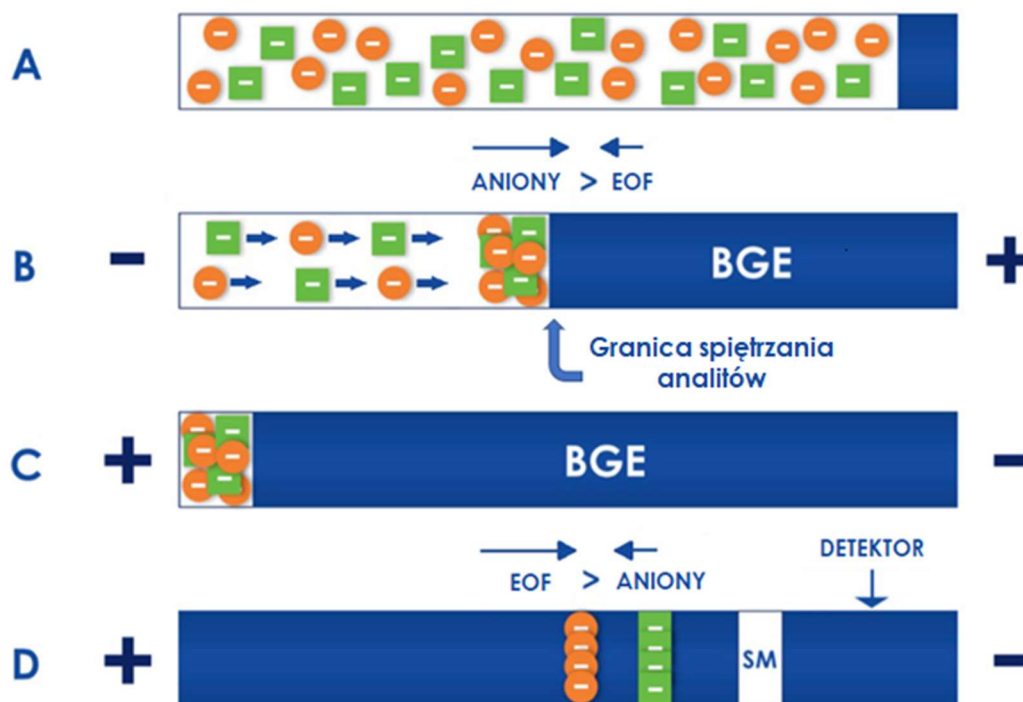


Rycina 1. Wpływ zawartości SDS w próbce na rozdział elektroforetyczny [D1]. Próbka 6 makrolidów (1 – Spiramycyna, 2 – Iwermektyna, 3 – Josamycyna, 4 – Tylozyna, 5 – Rapamycyna i 6 – Ryfamycyna) o stężeniu 100µg/ml. Parametry: kapilara 50x75; 25kV; dozowanie EKI -10kV, 18 sek; preiniekcja wodą 5 sek, 0.5 psi; UV $\lambda=232\text{nm}$; BGE: 60%[v/v] ACN, 20mM bufor fosforanowy. A – 20 mM SDS, B – 10 mM SDS, C – 7 mM SDS, D – 3,5 mM SDS.

Przy wzrastających stężeniach SDS w próbce dochodziło do poszerzenia, a w konsekwencji rozszczępienia pików, co potwierdza wcześniej wspomniane ograniczenia techniki FASI – stężenie surfaktanta jonowego potrzebne do solubilizacji analitów może generować zbyt wysoką przewodność uniemożliwiającą efektywne zastosowanie FASI w oznaczeniu związków o charakterze hydrofobowym. Jednakże, dzięki oddziaływaniom hydrofobowym pomiędzy monomerami SDS, a makrolidami uzyskano wysoki sygnał oraz symetryczne piki. Aby ocenić efekt wzmocnienia sygnału dla analitów, wyznaczono współczynnik wzmocnienia (z ang. *enhancement factor* – EF) jako stosunek wartości LOD pomiędzy metodą FASI-HIEKC, a standardowym dozowaniem HDI (5 s, 0.5 psi), przy czym warto zaznaczyć, że w standardowym dozowaniu próbka ulegała prekoncentracji FASS, z uwagi na niską przewodność matrycy. Zaproponowana strategia FASI-HIEKC umożliwiła uzyskanie wartości LOD w zakresie 0.08 a 0.18 $\mu\text{g mL}^{-1}$, co pozwoliło na wzmocnienie sygnału w zakresie 17 – 63 razy dla badanych związków w porównaniu do standardowego dozowania HDI. Opracowaną metodę FASI-HIEKC zastosowano do oznaczania spiramycyny w tabletkach powlekanych „Rovamycine” zawierających 1,5 mln IU (500 mg) substancji czynnej. Zawartość spiramycyny w badanych tabletkach wahała się od 92.0 do 10.8 % wartości deklarowanej przez producenta (n = 6). Precyzja i dokładność metody, uzyskane podczas analizy rzeczywistych próbek farmaceutycznych, mieściły się w przedziale odpowiednio 5.9 – 12.5% i 85.0 – 109.8%.

Kolejną grupę analitów o właściwościach hydrofobowych stanowiły związki pełniące rolę konserwantów (głównie pochodne kwasu p-hydroksybenzoesowego). Szersze spektrum działania konserwantów w produktach farmaceutycznych i kosmetycznych uzyskuje się często przez zastosowanie ich kombinacji, których potencjał inhibicji bakteryjnej jest większy niż pojedynczych substancji [57]. Takie podejście, w przypadku analizy próbki leku lub kosmetyku leczniczego, zawierającej kilka konserwantów z różnych grup chemicznych, wymaga zastosowania specyficznych metod separacji. Opracowano kilka metod spełniających takie wymagania, jednak ich wadą są wysokie granice wykrywalności [58-61], brak separacji izomerycznych parabenów [62-67] czy długi czas analizy [64-68]. Z tej przyczyny w **Publikacji D2** podjęto temat modyfikowania buforu cyklodekstrynami z różnych grup celem separacji 8 konserwantów (metyloparaben, etyloparaben, propyloparaben, izobutyloparaben, butyloparaben, kwas sorbowy, kwas benzoowy oraz kwas p-hydroksybenzoesowy) w niepochodzonych, niezjonizowanych formach, których rozpuszczalność w wodzie nie przekraczała 2.9 g L⁻¹, a także możliwości połączenia nowo opracowanego buforu separacyjnego z techniką prekocentracji *on-line*. Ze względu na bardzo słabą rozpuszczalność analitów w wodzie, przetestowano różne rozpuszczalniki organiczne jako modyfikatory matrycy próbki, takie jak acetonitryl, metanol, etanol oraz ich mieszaniny z wodą. Optymalne wyniki uzyskano przy zawartości nie mniejszej niż 15 % [v v⁻¹] metanolu w wodnym roztworze matrycy próbki. Gdy utrzymywano w próbkach stałe stężenie 15 % [v v⁻¹] metanolu, żaden z analitów nie wytrącił się, jednocześnie pozwoliło to na uzyskanie stabilnego prądu podczas wszystkich rozdzielów elektroforetycznych. Wstępne badania obejmowały wykorzystanie MEKC z użyciem SDS jako składnika fazy pseudostacjonarnej, jednak nie przyniosły one zadowalających wyników w rozdzielaniu parabenów izomerycznych, postanowiono zastosować BGE zawierający zarówno cyklodekstryny wysokosulfonowane, jak i

niezmodyfikowane. Wstępny test wykazał, że przy niższych stężeniach SDS w BGE nie uzyskano rozdziału między analogami nieizomerycznymi. Wynika to z faktu, że estry kwasu p-hydroksybenzoesowego różnią się w szeregu homologicznym tylko jedną grupą metylenową (-CH₂). Aby zapewnić całkowite oddzielenie 8 konserwantów, zbadano wpływ dodatku wysokosulfonowanych cyklodekstryn do BGE na rozdział elektroforetyczny. Pełne rozdzielanie wszystkich analitów uzyskano stosując HS- α -CD w stężeniu 1,0 % w 25 mM tetraboranie sodu. Ponadto zaobserwowano, że zwiększenie stężenia HS- α -CD wpływa na czasy migracji kwasowych analitów (kwasów sorbowego, benzoesowego i p-hydroksybenzoesowego), podczas gdy czasy migracji parabenów (w formie estrów) nie uległy zmianie. Pik kwasu benzoesowego przy różnych stężeniach HS- α -CD wykazywał największe zróżnicowanie w czasach migracji, co mogło wynikać z jego najsilniejszego oddziaływania z HS- α -CD. Te różnice w szybkości migracji parabenów i pozostałych środków konserwujących, wykazujących charakter kwaśny wynikają z różnych wartości pKa (wynoszących poniżej 5,0 dla kwasowych konserwantów oraz około 8.4 dla parabenów). W BGE przy pH powyżej 9,0 anality kwasowe są całkowicie zdysocjowane, podczas gdy parabeny w tych warunkach są słabo zjonizowane. Ta właściwość sugeruje, że głównym czynnikiem rozdzielającym estry kwasu p-hydroksybenzoesowego była interakcja hydrofobowa między rdzeniem HS- α -CD, a lipofilowym fragmentem struktury parabenów. Z drugiej strony, w przeciwieństwie do parabenów, kwasowe anality tworzyły kompleksy z HS- α -CD w wyniku odpychania między grupami sulfonowymi cyklodekstryn a ujemnym ładunkiem konserwantów o charakterze kwasowym, przy czym preferowane były wiązania hydrofobowe z rdzeniem cyklodekstryny. Inna sytuacja wystąpiła przy stosowaniu HS- β -CD w BGE, gdzie wraz ze wzrostem stężenia HS- β -CD wydłużały się czasy migracji wszystkich konserwantów. Nie udało się jednak uzyskać pełnego rozdzielania metylo-, propylo- i izobutyloparabenu. Problem ten spowodowany był większym rdzeniem HS- β -CD i niemożnością tworzenia kompleksów inkluzyjnych pomiędzy hydrofobowym rdzeniem CD a parabenami. Chociaż Kuo K.-L. i in. [69] badali już niesulfonowane α -CD i β -CD pod kątem rozdzielania konserwantów, tutaj zbadano również efekt ich wzbogacania w kapilarze porównując niesulfonowane α -CD i HS- α -CD, jako składnik BGE. Jako technikę prekoncentracji *on-line* zastosowano LVSS ze zmianą polaryzacji elektrod (z *ang. polarity switching* – PS), a jej mechanizm przedstawiony został na Ryc. 2. Stosując bufor separacyjny oparty o 25 mM tetraboranu sodu i zawierający 2 mM α -CD niż z 1.0 % HS- α -CD w połączeniu z metodą LVSS uzyskano znacznie wyższe i ostrzejsze piki niż w tradycyjnej metodzie (HDI). Ponadto wartości LOD analitów były około 500 razy niższe w porównaniu z wartościami uzyskanymi metodą elektroforetyczną, wykorzystującą standardowe HDI, opisaną przez Kuo, K.-L. i in.



Rycina 2. Mechanizm LVSS-PS [D2]. (A) Sytuacja początkowa: matryca próbki o niskim przewodnictwie jest wstrzykiwana hydrodynamicznie do kapilary, aż objętość próbki osiągnie 90–100% pojemności kapilarnej. (B) Po napełnieniu kapilary przykładane jest (stosunkowo niskie) napięcie w trybie odwrotnej polaryzacji w celu usunięcia matrycy próbki (z ang. *sample matrix* – SM) i skupienia analitów. (C) Gdy prąd osiągnie 90–99% swojej wartości, kapilara jest wypełniona prawie wyłącznie buforem, a aniony z wcześniej nastrzykniętej próbki są całkowicie skoncentrowane na wlotowym końcu kapilary. Następnie następuje zamiana biegunowości elektrod i skierowanie przepływu elektroosmotycznego (z ang. *electroosmotic flow* – EOF) w stronę detektora. (D) Wzbogacone anality są rozdzielane zgodnie z zasadami techniki CZE.

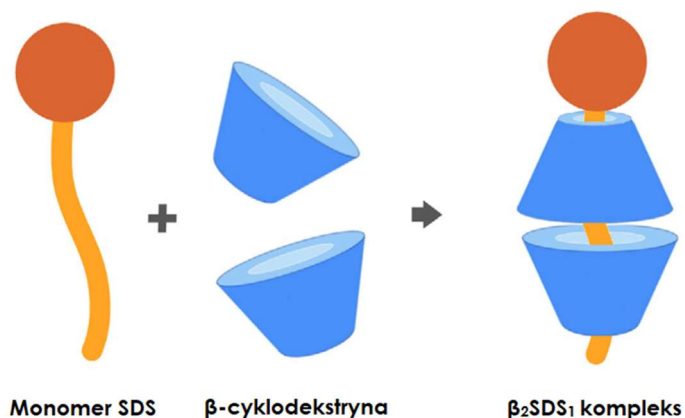
Dodatkowo zbadano wpływ pH BGE w zakresie 7 – 10,5 na rozdzielczość i intensywność sygnałów, pochodzących od analitów. Zarówno przy pH wyższym niż 10, jak i niższym niż 8 nie osiągnięto całkowitego oddzielenia parabenów, a piki analitów znacząco straciły na wysokości i ostrości. Zaobserwowano, że gdy pH było bliższe wartości pH matrycy próbki, sygnał był stosunkowo niższy. Jednak najlepsze wyniki uzyskano przy pH BGE = 9.3 oraz gdy pH matrycy próbki było obojętne (pH = 7.0). W neutralnych warunkach środowiska próbki, oznaczane związki o charakterze kwasowym były słabo zdysocjowane. Zależność ta wynika z dodatkowego mechanizmu prekoncentracji dynamicznego krzyżowania pH. W zasadowym buforze rozdzielającym związki kwasowe były silnie zjonizowane i przy ujemnym ładunku migrowały w kierunku przeciwnym do EOF. Spowodowało to wstępne zateżnienie kwasowych konserwantów na granicy strefy próbki i buforu separacyjnego (sample matrix, SM/BGE). Zaobserwowane zjawisko można potwierdzić dzięki uzyskaniu niższych wartości granic wykrywalności analitów o charakterze kwasowym w stosunku do parabenów. Opracowana metoda charakteryzowała się LOD w zakresie 0.8 – 5 ng L⁻¹, podczas gdy granice oznaczalności (z ang. *limit of quantification* – LOQ) mieściły się w zakresie 3 – 16 ng L⁻¹, przy czym warto nadmienić, iż są to wartości uważane za bardzo niskie dla techniki CE w połączeniu z detekcją UV. Celem walidacji metody na realnych próbkach wybrano do badań próbki czterech postaci leków: trzech w postaci syropu i jednego roztworu. Opracowana metoda LVSS-PS w połączeniu z chromatografią elektrokinetyczną cyklodekstryn (z ang. *cyclodextrin electrokinetic chromatography* – CDEKC) nie wymagała konieczności stosowania specjalnej

procedury ekstrakcji próbki, którą rozpuszczono w czystym metanolu, a następnie roztwór podstawowy rozcieńczono wodą do uzyskania 15 % [v v⁻¹] całkowitego stężenia metanolu. Aby oznaczyć konserwanty w próbkach, każdy pik zidentyfikowano, porównując zarówno czasy migracji, jak i długości fali wzorców uzyskanych przez detektor z matrycą diodową. Zastosowano również dodatek standardu w celu potwierdzenia tożsamości środka konserwującego w badanej próbce. Opracowana metoda okazała się wysoce selektywna i zapewniła stabilną linię podstawową bez znaczących zakłóceń. Co więcej, przeprowadzona analiza wykazała, że wszystkie leki zawierały konserwanty w deklarowanym zakresie stężeń, a wartości względnych współczynników zmienności (z ang. *relative standard deviation* – RSD%) nie przekraczały 1.61%, co wskazuje, że metoda jest wysoce powtarzalna.

Obok skupienia się w pracy badawczej nad opracowywaniem składu matryc próbek dla związków o charakterze hydrofobowym i możliwości ich połączenia z technikami prekoncentracji *on-line*, w publikacji D3 dodatkowym założeniem aplikacyjnym było opracowanie metody z wykorzystaniem próbek moczu. Do kolejnych badań wybrano mitotan (1-(2-chlorofenylo)-1-(4-chlorofenylo)-2,2-dichloroetan, o,p''-DDD), chlorowany bicykliczny związek aromatyczny stosowany w leczeniu nieoperacyjnego raka kory nadnerczy oraz w celu zmniejszenia ryzyka nawrotów i przerzutów po resekcji guza. Leku tego oraz jego metabolitu dotychczas nie oznaczano przy użyciu technik elektromigracyjnych. Jego mechanizm działania opiera się zarówno na działaniu przeciwnowotworowym, jak i przeciwhormonalnym; jednak cytotoksyczne działanie mitotanu nie zostało do końca poznane [70]. Mitotan wpływa na steroidogenezę oraz metabolizm hormonów kory nadnerczy poprzez hamowanie takich enzymów jak: 20,22-desmolaza, 11 β -hydroksylaza czy dehydrogenaza 3 β -hydroksysteroidowa [71]. Tak rozległy wpływ na układ hormonalny wymaga monitorowania stężenia steroidów u pacjentów leczonych mitotanem [72]. Opracowano już kilka metod oznaczania mitotanu za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (z ang. *high-performance liquid chromatography* – HPLC) [73,74] w połączeniu z ekstrakcją ciecz-ciecz [75] i ekstrakcją do fazy stałej (z ang. *solid phase extraction* – SPE) [76,77]. Ando i in. opracowali oznaczanie mitotanu w próbkach osocza krwi metodą chromatografii gazowej (z ang. *gas chromatography* – GC) w połączeniu z elektronową jonizacją-MS [78]. Jak dotąd nie uzyskano metody, pozwalającej na jednoczesne oznaczanie mitotanu, jego metabolitu i hormonów steroidowych. Podobnie w piśmiennictwie nie ma wystarczających danych na temat poziomów DDD i DDA w próbkach moczu pacjentów. Mornar i in. [76] przeprowadzili badania na próbkach moczu pacjentów leczonych 1.5 g mitotanu (dawka 500 mg przyjmowana co 8 h). Wykryte stężenie mitotanu wynosiło 710 ng mL⁻¹; jednak DDA nie był obecny w próbce moczu, co tłumaczy się brakiem biotransformacji mitotanu. Chen i in. [79] badali stężenia DDA w próbkach moczu w populacji narażonej na insektycyd 1,1,1-trichloro-2-(2-chlorofenylo)-2-(4-chlorofenylo)etan, związek z tej samej grupy co mitotan, bicykliczny aromatyczny chlorowany węglowodór, stosując technikę GC. Stężenie DDA, będącego metabolitem 1,1,1-trichloro-2-(2-chlorofenylo)-2-(4-chlorofenylo)etanu, wahało się w próbkach moczu od 11 do 92 ng mL⁻¹. Z tych powodów w badaniu tym opracowano dyspersyjną mikroekstrakcję ciecz-ciecz (z ang. *dispersive liquid-liquid microextraction* – DLLME) mitotanu, jego metabolitu kwasu octowego 1,1-(o, p''-dichlorofenylo) (o, p''-DDA) i pięciu hormonów steroidowych

(progesteron, testosteron, epitestosteron, kortyzol i kortykosteron) z próbek moczu z separacją elektroforetyczną przy użyciu detekcji UV i zmiatania jako techniki prekoncentracji *on-line*.

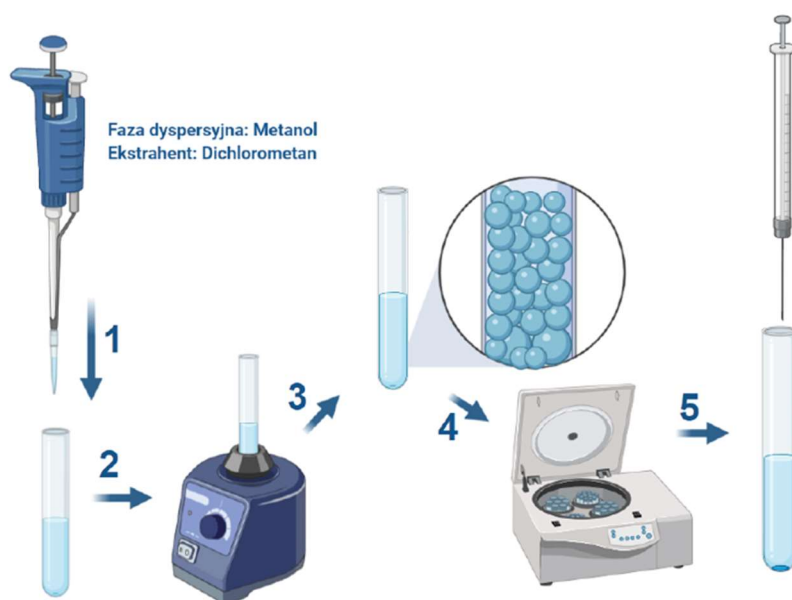
Ze względu na znaczną hydrofobowość analitów, w szczególności mitotanu ($\log P = 6.11$) [80], skład matrycy do rozdzielania elektroforetycznego był kluczowym punktem optymalizacji procedury analitycznej. Stwierdzono, że acetonitryl jest optymalnym rozpuszczalnikiem dla wszystkich wybranych analitów, jednak stężenia tego rozpuszczalnika większe niż 30 % ($v v^{-1}$) zakłócały stabilność prądu podczas rozdzielania. Z drugiej strony obecność wody w SM powodowała wytrącanie się mitotanu. Z tego powodu konieczne było użycie solubilizatorów, takich jak surfaktanty czy cyklodekstryny, chociażby ze względu na ograniczenia metody zmiatania (matryca próbki nie może zawierać SDS nawet w niskich stężeniach), nie było możliwości zastosowania SDS w stężeniu (powyżej 20 mM) wymaganym do rozpuszczenia mitotanu. Dopiero dodatek β -cyklodekstryn umożliwił obniżenie stężenia SDS do 3.5 mM, a mechanizm tego zjawiska polega na tworzeniu kompleksów inkluzyjnych pomiędzy cząsteczkami cyklodekstryn a monomerami SDS, które są stabilizowane przez oddziaływania van der Waalsa [81]. Cząsteczki β -CD spontanicznie tworzą kompleks z SDS w stosunku molowym 2:1 w roztworach wodnych, gdzie jeden łańcuch alkilowy SDS jest osadzony w dwóch zagłębieniach β -CD, tworząc kompleks β -CD₂SDS₁ [82] (ryc. 3).



Rycina 3. Schemat spontanicznego tworzenia kompleksów β -CD₂SDS₁ [D3].

Lin i in. potwierdzili, że zwiększające się stężenia cyklodekstryn powodują wzrost wartości CMC dla SDS [83], co w mechanizmie molekularnym wynika z tworzenia kompleksów β -CD₂SDS₁ i ich braku zdolności do micelizacji. W związku z tym destabilizacja procesu zmiatania nie występuje z powodu braku miceli w matrycy próbki. Po drugie, wartość pH i przewodność próbki znacząco wpłynęły na ostrość pików, dlatego zbadano stężenia kwasu fosforowego w zakresie 5–100 mM. Ze względu na obecność jonizowalnych grup chemicznych wśród steroidów i DDA, zbyt niskie stężenia H₃PO₄ nie zapewniały odpowiednich warunków do uzyskania efektywnego wzmocnienia sygnału dla wszystkich analitów. Natomiast wyższe stężenia tego kwasu zwiększały przewodnictwo, co skutkowało ostrzejszymi pikami, niemniej jednak w stężeniu powyżej 70 mM dochodziło do destabilizowania natężenia pola elektrycznego, dlatego stężenie 60 mM H₃PO₄ w SM zapewniało akceptowalną ostrość pików i stabilność prądu oraz linii bazowej. Ostatecznie zoptymalizowana matryca próbki składała się z 10 % [$v v^{-1}$] acetonitrylu, 3.5 mM SDS, 7 mM β -CD i 60 mM H₃PO₄ o współczynniku przewodnictwa SM/BGE = 1.2

Mechanizm zmiatania w odwróconym układzie elektrod (z ang. *reversed polarity* – RP) opiera się na tłumieniu EOF przez kwas (25 mM H₃PO₄, pH = 2.5), dzięki czemu anality zostają „zmiotane” i ulegają spiętrzeniu przez micelle SDS, które migrują w kierunku anodowego końca kapilary. Technika RP-sweeping, pomimo znacznego wzmocnienia sygnału w przypadku związków hydrofobowych, ze względu na ich duże powinowactwo do hydrofobowych rdzeni miceli, charakteryzuje się stosunkowo niską rozdzielczością. Dlatego koniecznym było zastosowanie modyfikatorów organicznych do całkowitego oddzielenia analitów. BGE składający się z 25 mM H₃PO₄ oraz 100 mM SDS wykazywał wyjątkowo niską rozdzielczość, a dodatek acetonitrylu znacząco wpłynął na czas migracji wybranych do badań analitów hydrofobowych. Jednak przy 25 % [v v⁻¹] zawartości tego modyfikatora organicznego w buforze separacyjnym wszystkie anality zostały rozdzielone z wyjątkiem DDA i progesteronu, podobnie wyższe stężenia acetonitrylu zakłóciły stabilność natężenia pola elektrycznego. Roztwory, zawierające ponad 30 % ACN powodują zasadniczo całkowite wytrącenie β-CD, a w efekcie przerwanie przepływu prądu. Z drugiej strony 7 mM β-CD w połączeniu z 25 % ACN zapewniło wysoką rozdzielczość ze względu na wysokie powinowactwo analitów do hydrofobowego rdzenia β-CD; w rezultacie anality rozdzielono metodą MEKC modyfikowanej cyklodekstrynami (CD-MEKC). Ponadto zbadano wpływ stężenia SDS w buforze separacyjnym na potencjał zmiatania. Wykazano, że rosnące stężenia SDS wpływają na ostrość piku, intensywność sygnału i czas migracji badanych związków. Stężenia SDS przekraczające 100 mM, pomimo wzrostu sygnału, zaburzyły stabilność linii bazowej, dlatego 100 mM SDS było stężeniem optymalnym pod względem czasu migracji i wysokości piku dla wszystkich analitów.



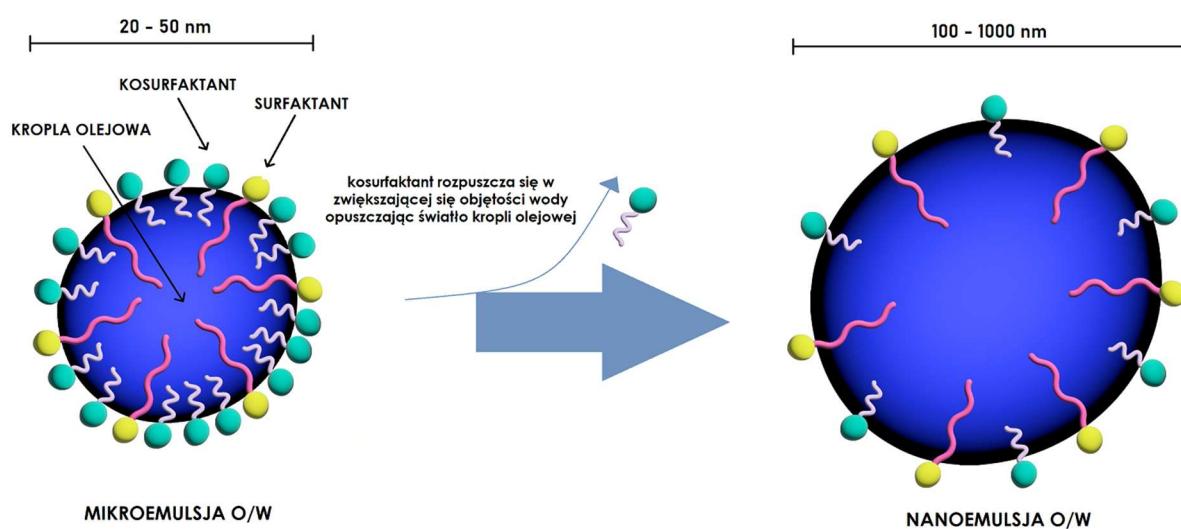
Rycina 4. Ekstrakcja DLLME mitotanu, jego metabolitu i hormonów steroidowych z próbek moczu. 1 – Wprowadzenie mieszaniny dyspersyjnej do próbki moczu, 2 – worteksowanie, 3 – rozproszenie ekstrahentu w formie mikrokropel, 4 – wirowanie, 5 – pozyskanie odwirowanej fazy ekstrahentu za pomocą strzykawki tłokowej Hamiltona i odparowanie.

Warunki ekstrakcji z próbek materiału biologicznego, której proces został przedstawiony na ryc. 4, były istotnie związane ze zróżnicowaniem hydrofobowości analitów oraz obecnością jonizowalnych grup chemicznych. Próbki moczu zawierające DDA oraz steroidy wymagały zakwaszenia za pomocą HCl w celu pełnego zobojętnienia analitów i

poprawy efektywności ich ekstrakcji z matrycy próbki do rozpuszczalników lipofilowych. Ponadto zbadano efektywność izolacji analitów przy użyciu różnych rodzajów ekstrahenta i rozpuszczalników dyspergujących. W pierwszej kolejności przetestowano wydajność ekstrahentów hydrofobowych (dichlorometanu i chloroformu) z roztworów wodnych wzbogaconych mieszaniną analitów (250 ng mL^{-1}). Po ekstrakcji chloroformem sygnały pochodzące od oznaczanych związków były niezadowalające, podczas gdy ekstrakcja dichlorometanem pozwoliła na otrzymanie intensywniejszych sygnałów dla wszystkich analitów, przy czym jako ekstrahent wybrano dichlorometan. Po drugie, zbadano cztery mieszaniny rozpuszczalników dyspergujących z dichlorometanem: aceton, acetonitryl, metanol i izopropanol. Wśród nich acetonitryl wykazywał najlepszą wydajność ekstrakcji dla wszystkich analitów; stąd wybrano go jako rozpuszczalnik dyspergujący. Ponadto zbadano wpływ objętości ekstrahenta i rozpuszczalnika dyspergującego na efektywność ekstrakcji w zakresie odpowiednio $100 - 300$ i $500 - 1000 \mu\text{L}^{-1}$. Objętości mieszaniny ekstrahującej większe niż $200 \mu\text{L}$ zmniejszały sygnał wszystkich analitów, z wyjątkiem kortyzolu, który wykazywał wzrost wysokości pików. Podobnie objętości acetonitrylu poniżej $900 \mu\text{L}$ nie zapewniały wystarczającej dyspersji dichlorometanu, a $1000 \mu\text{L}$ powodowały mniejszą intensywność sygnału, dlatego finalnie wybrano mieszaninę ekstrakcyjną składającą się z acetonitrylu i dichlorometanu w stosunku $9:2 [\text{v v}^{-1}]$ i całkowitej objętości mieszaniny ekstrahującej $1100 \mu\text{L}$. Zoptymalizowana metoda RP-sweeping-CD-MEKC-DLLME została zwalidowana zgodnie z wytycznymi Europejskiej Agencji Leków dotyczącymi walidacji metod bioanalitycznych poprzez pomiar wysokości pików przy długości fali maksymalnej absorbancji: 248 nm dla steroidów i 200 nm dla mitotanu i jego metabolitu. Zastosowanie detektora diodowego (DAD) do analizy pozwoliło na uzyskanie wyników dla różnych długości fal w trakcie jednej separacji elektroforetycznej próbki biologicznej. Aby potwierdzić brak substancji balastowych o podobnych czasach migracji, przeanalizowano ślepą próbę moczu i syntetyczny mocz ($n = 6$) i porównano z matrycami z dodatkiem analitów i wzorca wewnętrznego (deksametazon), odpowiednio przy 25 i 100 ng mL^{-1} . Wykazano brak istotnej interferencji w czasie migracji analitów i substancji balastowych, stąd procedura oczyszczania próbki była selektywna. Należy zauważyć, iż walidacja metody pod kątem jej selektywności została przetestowana z randomizowanymi próbkami moczu o objętości 5 mL , podczas gdy stężenie steroidów było stosunkowo niższe niż w próbce pochodzącej z 24-godzinnej zbiórki moczu, co jest preferowanym sposobem kontrolowania hamowania steroidogenezy mitotanu tą metodą.

Liniowość metody została zbadana przez dodanie analitów do syntetycznej matrycy moczu w zakresie $10 - 750 \text{ ng mL}^{-1}$ dla kortyzolu, $5 - 500 \text{ ng mL}^{-1}$ dla pozostałych analitów i 100 ng mL^{-1} dla wzorca wewnętrznego w sześciu powtórzeniach ($n = 6$) o siedmiu stężeniach. Względne wysokości pików wybrano jako sygnały analityczne dla *wszystkich* analitów. Krzywe kalibracyjne uzyskano za pomocą analizy regresji liniowej metodą najmniejszych kwadratów. Odpowiedzi w formie sygnałów na mitotan, DDA i steroidy były liniowe w badanym zakresie stężeń, co zostało potwierdzone zadowalającym współczynnikiem determinacji ($R^2 \geq 0.9988$). Natomiast wartości LOD wynosiły odpowiednio 3 ng mL^{-1} dla kortyzolu i 1.5 ng mL^{-1} dla pozostałych analitów, natomiast wartości LOQ 10 ng mL^{-1} dla kortyzolu i 5 ng mL^{-1} dla innych analitów.

W publikacji D4 opracowano całkowicie nowe podejście w projektowaniu składu SM dla związków hydrofobowych, gdzie jako technikę separacji wybrano MEEKC. Pomimo wyższego potencjału rozdzielczości niż CZE i MEKC [84-86], metody prekoncentracji *on-line* w połączeniu z MEEKC nie były dotychczas badane w analizie silnie hydrofobowych związków ($\log P > 4$). Opracowanie składu SM dla związków o wysokim $\log P$ wymaga niezwyklej uwagi i precyzji ze względu na labilność mikroemulsji (ME), pełniącej rolę buforu separacyjnego. Po zadozowaniu do kapilary, próbka i ME stają się wrażliwe nawet na niewielkie zmiany ich składu. Próbki o wysokim stężeniu rozpuszczalników organicznych mogą prowadzić do załamania ME i powodować niestabilność natężenia pola elektrycznego w układzie separacyjnym. Z tego powodu rozdzielanie związków hydrofobowych techniką MEEKC opiera się najczęściej na matrycach przygotowanych przez rozpuszczenie próbek w ME. Może to prowadzić do niemożności zastosowania takich SM w połączeniu z technikami prekoncentracji *on-line* [87-89]. Kolejną zaletą proponowanej techniki w porównaniu z separacjami CZE i MEKC do analizy związków hydrofobowych jest to, że ME mają znacznie wyższy potencjał rozpuszczalności, ponieważ działają jako uniwersalne rozpuszczalniki, dlatego złożone matryce składające się zarówno ze związków hydrofobowych, jak i hydrofilowych, rozdzielane w warunkach MEEKC są powszechnie spotykane w literaturze [90-93]. Stąd, zasadnym stało się opracowanie nowych metod separacji związków silnie hydrofobowych ze względu na skład SM oraz możliwość połączenia z technikami prekoncentracji *on-line*. W pracy przedstawiono całkowicie nowatorskie w chemii analitycznej opracowanie składu matrycy próbki dla związków o charakterze hydrofobowym na bazie nanoemulsji typu olej w wodzie (NE O/W) przygotowanej przez rozcieńczenie „na zimno” ME O/W wodą (ryc.5).



Rycina 5. Mechanizm tworzenia NE poprzez rozcieńczenie „na zimno” mikroemulsji.

Wykazano, że matryca NE zapewnia rozpuszczalność silnie hydrofobowych analitów, jednocześnie dostarczając im ładunku elektrycznego wystarczającego do dozowania EKI. Po drugie, ze względu na niską przewodność matryc NE, określono możliwość zastosowania metod prekoncentracji *on-line* opartych na EKI we wzmocnionym polu elektrycznym dla związków hydrofobowych. Jako związki modelowe do eksperymentów wykorzystano witaminy rozpuszczalne w tłuszczach (A, D₃, K₁, K₂), iwermektynę oraz pestycyd DDT.

Podstawą teorii o nanoemulsyjnych matrycach jest solubilizacja analitów, którą można określić za pomocą dwóch deskryptorów, a mianowicie molowego współczynnika solubilizacji (z ang. *molar solubilization ratio* – MSR) i współczynnika podziału micela-woda K_M . Wartość MSR definiuje się jako liczbę moli substancji rozpuszczonej, jaką może rozpuścić jeden mol micelnego środka powierzchniowo czynnego, natomiast K_M to stosunek stężenia substancji rozpuszczonej w miceli do stężenia substancji rozpuszczonej w wodzie [94]. Dla danego środka powierzchniowo czynnego o określonym CMC ogólne równanie MSR jest następujące:

$$\text{MSR} = \frac{S_{surf} - S_{cmc}}{C_{surf} - \text{CMC}} \quad (1)$$

gdzie S_{surf} to rozpuszczalność danej substancji rozpuszczonej przy stężeniu środka powierzchniowo czynnego C_{surf} ($C_{surf} > \text{CMC}$), a S_{cmc} to rozpuszczalność danej substancji w roztworze surfaktanta w jego CMC. Wartość MSR można określić na podstawie nachylenia, gdy stężenie substancji rozpuszczonej jest wykreślone w funkcji stężenia środka powierzchniowo czynnego powyżej CMC, a zatem nie jest związane z jego rozpuszczalnością w wodzie. K_M oblicza się jako:

$$K_M = \frac{X_m}{X_a} \quad (2)$$

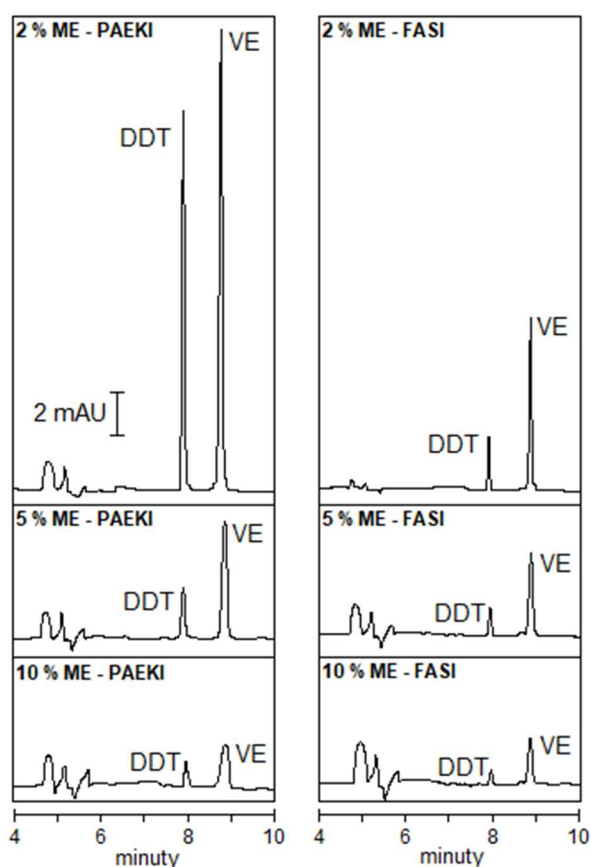
gdzie X_m i X_a to odpowiednio ułamki molowe substancji rozpuszczonej w micelach i wodzie. Dla układów nasyconych, tj. takich, w których micelarna faza surfaktantu i faza wodna znajdują się w równowadze X_m można obliczyć jako $X_m = \text{MSR}/(1 + \text{MSR})$, a X_a można wyrazić jako $X_a = S_{cmc}V_w$, gdzie $V_w = 0.0180 \text{ L mol}^{-1}$ to molowa objętość wody. W konsekwencji K_M jest powiązany z MSR według:

$$K_M = \frac{\text{MSR}}{S_{cmc}V_w(1+\text{MSR})} \quad (3)$$

Można stwierdzić, że im analit jest słabiej rozpuszczalny, tym wyższe stężenie środka powierzchniowo czynnego jest potrzebne do jego rozpuszczenia w próbce. Dlatego rozpuszczanie związków o wysokim logP wymaga wyższych stężeń surfaktantów w roztworach wodnych, co jest niekorzystne przy stosowaniu technik prekoncentracji *on-line* we wzmocnionym polu elektrycznym. Stąd surfaktanty jonowe, zwiększając przewodnictwo próbki, powodują, że stosunek przewodności SM i BGE zbliża się do 1, co w konsekwencji zmniejsza wysokość sygnału oznaczanych związków. Zatem dobór środka powierzchniowo czynnego w SM w połączeniu z techniką wstępnego zateżnienia opartą na wzmocnionym polu elektrycznym i optymalnych parametrach jest kompromisem pomiędzy najniższym stężeniem środka powierzchniowo czynnego, zapewniającym solubilizację analitu, a efektem wzmocnienia sygnału. Zależność tę można zauważyć we wspomnianej już pracy Félez i in. [48], gdzie metodę FASI-MEKC zastosowano do rozdzielania kilku benzofenonów o różnych wartościach logP, a matrycą próbki był 10 mM SDS. Wyznaczone współczynniki wzmocnienia sygnału malały wraz ze wzrostem wartości logP benzofenonów. Ponadto zwiększenie stężenia SDS w próbce powodowało spadek siły sygnału, co wiązało się ze wzrostem przewodnictwa próbki.

Mechanizm prekoncentracji analitów w hydrofobowych w matrycy NE przy jednoczesnym zastosowaniu technik polegających na dozowaniu we wzmocnionym polu elektrycznym dotyczy nadania ładunku elektrycznego związkom hydrofobowym poprzez ujemnie naładowaną fazę olejową NE. Przy takim założeniu faza olejowa NE będzie wykazywać podobne właściwości jak roztwory micelarne (z ang. *micellar solution* – MS). Ponieważ główną cechą NE jest niskie stężenie środka powierzchniowo czynnego, możliwe jest ich zastosowanie jako matrycy dla związków hydrofobowych w celu uzyskania próbek o niższym przewodnictwie niż roztwory micelarne oraz umożliwienia solubilizacji związków hydrofobowych. Zastosowanie ME jako rozpuszczalnika do roztworów podstawowych, pozwala na proste przygotowanie matrycy próbki poprzez rozcieńczenie wodą ME do NE przed analizą elektroforetyczną.

Wstępne eksperymenty dotyczyły oznaczania próbek standardowych DDT i witaminy E opracowaną metodą NE-MEEKC. Badane próbki zawierały odpowiednio 10 %, 5 % i 2 % [v^{-1}] ME rozcieńczonej wodą dejonizowaną. Czas stosowany przy dozowaniu wszystkich próbek utrzymywano na stałym poziomie 1 minuty, a przyłożone napięcie podczas EKI ustalono na -5 kV dla FASI, podczas gdy dla dozowania we wzmocnionym polu elektrycznym wspomaganym ciśnieniowo (z ang. *pressure assisted electrokinetic injection* – PAEKI) na 1 minutę, -8 kV i 0.4 psi (oba dozowania przy odwróconej polaryzacji elektrod)



Rycina 6. Efekt rozcieńczenia ME w próbce na intensywność pików [D4]. Stężenie analitów = $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$; UV = 208 nm; kapilara = 40 cm, 50 μm ; DDT – Dichlorodifenylotrichloroetan, VE – Witamina E; BGE (40 mM SDS, 6.1% n-heksan, 7.5% butanol-1, 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)

Wyniki rozcieńczenia ME przedstawione na Ryc.6. wskazują, że siła sygnału dozowania we wzmocnionym polu elektrycznym dla związków hydrofobowych o dużym powinowactwie do fazy olejowej jest odwrotnie proporcjonalna do przewodnictwa próbki i stężenia SDS. Gdy użyto 2 % ME, zawierającej surfaktanta w stężeniu 0.8 mM (odpowiadającym jego 10-krotnie niższej wartości CMC), wskazywało to na solubilizację analitów kropelkami nanoemulsji. w SM.

Walidację metody przeprowadzono dla analitów, którymi były witaminy K₁ oraz K₂, gdzie LOD dla witaminy K₁ przy użyciu NE-MEEKC-FASI i NE-MEEKC-PAEKI wynosił odpowiednio 66.0 i 17.6 ng mL⁻¹. Dla witaminy K₂ wartości LOD wynosiły 42.9 i 12.1 ng mL⁻¹, odpowiednio dla każdej zastosowanej metody. Ponadto zadano wpływ składu SM na efektywność metody NE-MEEKC-PAEKI z zastosowaniem suplementu diety zawierającego witaminę K₂, otrzymanej z produktu fermentacji nasion soi. Procedura przygotowania próby do analizy elektroforetycznej nie wymagała usunięcia substancji wypełniających, zawartych w tabletkach (na etapie ekstrakcji przed analizą), ponieważ opracowana metoda NE-MEEKC-PAEKI nie wykrywała ich obecności a jednocześnie zapewniała satysfakcjonującą powtarzalność oznaczeń. Twardą tabletkę o łącznej masie 0.4 g i deklarowanej przez producenta dawce 75 µg witaminy K₂ wstępnie roztarto w moździerzu, następnie 1 mg roztartej tabletki przeniesiono do próbki Eppendorfa i rozpuszczono w 1 mL 2% ME otrzymując stężenie 1 mg mL⁻¹ roztartej tabletki w próbce (0.1875 µg witaminy K₂). Dla stężeń 10 %, 50 % lub 100 % ME próbkę rekonstruowano w koncentracji ME (100 % ME), a następnie rozcieńczano wodą dejonizowaną do stężenia 2 % ME i 1 mg mL⁻¹ roztartej tabletki. Wykazano silną korelację liniową ($R^2 = 0.97$) między średnim odzyskiem a stężeniem ME-użytych do odtworzenia próbki, przy czym najbardziej efektywne wyniki uzyskano dla 100 % ME. Prowadzi to do wniosku, że im mniejsze stężenie ME użyte do rozpuszczenia sproszkowanej tabletki, tym mniejszy stopień odtworzenia związków hydrofobowych w próbce dozowanej do kapilary. Problem ten został jednak przewyżniony przez zastosowanie początkowo koncentratu ME i rozcieńczeniem do NE (2% ME), co potwierdza, że związek hydrofobowy rozpuszczony w ME pozostaje w jej fazie olejowej. Wzmocnienie sygnału w metodzie NE-MEEKC z wykorzystaniem PAEKI przy uwzględnieniu rozcieńczenia koncentratu ME do NE było 45-krotnie większe dla witaminy K₂ niż dla standardowego HDI w analizie suplementu diety otrzymanego z produktu fermentacji nasion soi.

2.4. Wnioski

Tematyka niniejszej rozprawy dotyczy opracowania nowych rozwiązań pozwalających na poprawę czułości oznaczeń analitów hydrofobowych w technikach elektromigracyjnych bez konieczności modyfikowania dostępnej na rynku aparatury do CE. Z uwagi na fakt, że szereg substancji biologicznie czynnych wykazuje stosunkowo wysokie wartości logP koniecznym jest opracowanie metod prekoncentracji dedykowanym związkom hydrofobowym. Wiarygodne i precyzyjne określenie poziomu stężeń terapeutycznych substancji czynnych w matrycach biologicznych lub próbkach środowiskowych wpisuje się w obecny nurt badań analitycznych. Zebrane w niniejszej dysertacji publikacje skupiają się na możliwościach modyfikacji składu dozowanej próbki i buforu separacyjnego do oznaczeń związków natury

hydrofobowej oraz opisują mechanizmy zachodzące zarówno podczas dozowania próbki do kapilary, jak i przebiegające w trakcie separacji analitów.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań składających się na prezentowaną pracę można zawrzeć w następujących wnioskach:

- Wyjaśniono mechanizm wzbogacania związków makrocząsteczkowych o wysokich wartościach logP w kapilarze, na drodze EKI we wzmocnionym polu elektrycznym poprzez oddziaływania hydrofobowe analitów z monomerami surfaktantu jonowego.
- Wykazano, zależność intensywności sygnału dla wybranych związków hydrofobowych w zależności od stężenia SDS w próbce w przedziale stężeń 3.5 – 20 mM.
- Porównano wpływ cyklodekstryn niemodyfikowanych oraz wysokosulfonowanych obecnych w BGE na elektroforetyczną separację związków, stosowanych jako konserwanty, wykazując jednocześnie najbardziej efektywną rozdzielczość przy zastosowaniu 2 mM α -CD.
- Po raz pierwszy bufor separacyjny modyfikowany cyklodekstrynami połączono z techniką LVSS w odwróconej polaryzacji elektrod do oznaczania konserwantów w preparatach farmaceutycznych. Ponadto opisano dodatkowy efekt prekoncentracji kwasowych analitów przy użyciu dynamicznego krzyżowania pH.
- Opracowano pierwszą elektroforetyczną metodę oznaczania mitotanu i jego kwasowego metabolitu w próbkach moczu. Ponadto jest to pierwsza metoda w wysokosprawnych technikach analizy ilościowej, którą jednocześnie pozwoliła na oznaczenie hormonów steroidowych.
- Z powodzeniem zastosowano modyfikację składu dozowanej próbki poprzez zastosowanie kompleksów β -CD₂SDS₁, która umożliwiła solubilizację silnie hydrofobowych związków oraz jednoczesnego użycia zmiatania, jako techniki prekoncentracji *on-line*.
- Po raz pierwszy w technikach elektromigracyjnych wprowadzono NE typu O/W jako matrycę dla związków o charakterze hydrofobowym poprzez „zimne rozcieńczenie” ME typu O/W.
- Zbadano i wykazano efekt wzmocnienia sygnału dla witamin z grupy K, polegający na kombinacji matrycy nanoemulsyjnej i technik prekoncentracji *on-line* opartych o

dozowanie we wzmacnionym polu elektrycznym (PAEKI i FASI), przy czym osiągnięte wartości LOD były porównywalne z metodami wykorzystującymi ultra-wysoko-sprawną chromatografię cieczową (z *ang.* ultra-high-performance liquid Chromatography – UHPLC) [95].

3. Literatura

- [1] Jorgenson, J. W., & Lukacs, K. D. (1981). Free-zone electrophoresis in glass capillaries. *Clinical chemistry*, 27(9), 1551–1553.
- [2] Dovichi N. J. (1997). DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 18(12-13), 2393–2399. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181229>
- [3] Lechner, A., Giorgetti, J., Gahoual, R., Beck, A., Leize-Wagner, E., & François, Y. N. (2019). Insights from capillary electrophoresis approaches for characterization of monoclonal antibodies and antibody drug conjugates in the period 2016-2018. *Journal of chromatography B*, 1122-1123, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.05.014>
- [4] Kubáň, P., Dvořák, M., & Kubáň, P. (2019). Capillary electrophoresis of small ions and molecules in less conventional human body fluid samples: A review. *Analytica chimica acta*, 1075, 1–26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.004>
- [5] Tomnikova, A., Kozlík, P., & Křížek, T. (2022). Monosaccharide profiling of glycoproteins by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis*, 43(20), 1963–1970. <https://doi.org/10.1002/elps.202200033>
- [6] Shen, B., Pade, L. R., Choi, S. B., Muñoz-LLancao, P., Manzini, M. C., & Nemes, P. (2022). Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry for Scalable Single-Cell Proteomics. *Frontiers in chemistry*, 10, 863979. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.863979>
- [7] Piotrowska, M., Ciura, K., Zalewska, M., Dawid, M., Correia, B., Sawicka, P., Lewczuk, B., Kasprzyk, J., Sola, L., Piekoszewski, W., Wielgomas, B., Waleron, K., & Dziomba, S. (2020). Capillary zone electrophoresis of bacterial extracellular vesicles: A proof of concept. *Journal of chromatography. A*, 1621, 461047. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461047>
- [8] Dziomba, S., Ciura, K., Correia, B., & Wielgomas, B. (2019). Stabilization and isotachopheresis of unmodified gold nanoparticles in capillary electrophoresis. *Analytica chimica acta*, 1047, 248–256. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.09.069>
- [9] Wang, M., Gong, Q., Liu, W., Tan, S., Xiao, J., & Chen, C. (2022). Applications of capillary electrophoresis in the fields of environmental, pharmaceutical, clinical, and food analysis (2019-2021). *Journal of separation science*, 45(11), 1918–1941. <https://doi.org/10.1002/jssc.202100727>
- [10] Chen, D., McCool, E. N., Yang, Z., Shen, X., Lubeckyj, R. A., Xu, T., Wang, Q., & Sun, L. (2023). Recent advances (2019-2021) of capillary electrophoresis-mass spectrometry for multilevel proteomics. *Mass spectrometry reviews*, 42(2), 617–642. <https://doi.org/10.1002/mas.21714>
- [11] Šlampová, A., Malá, Z., & Gebauer, P. (2019). Recent progress of sample stacking in capillary electrophoresis (2016-2018). *Electrophoresis*, 40(1), 40–54. <https://doi.org/10.1002/elps.201800261>
- [12] Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A., & Ando, T. (1984). Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Analytical Chemistry*, 56(1), 111–113. <https://doi.org/10.1021/ac00265a031>

- [13] Watarai, H. (1991). Microemulsion Capillary Electrophoresis. *Chemistry Letters*, 20(3), 391–394. <https://doi.org/10.1246/cl.1991.391>
- [14] Pedersen-Bjergaard S., Rasmussen K.E., Tilander T. (1998). Separation of fat-soluble vitamins by hydrophobic interaction electrokinetic chromatography with tetradecylammonium ions as pseudostationary phase. *Journal of Chromatography A*, 807(2), 285–295
- [15] Sahota, R. S., & Khaledi, M. G. (1994). Nonaqueous Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 66(7), 1141–1146. <https://doi.org/10.1021/ac00079a032>
- [16] Lin, C. E., & Chen, M. J. (2001). Separation and selectivity of benzophenones in micellar electrokinetic chromatography using sodium dodecyl sulfate micelles or sodium cholate modified mixed micelles. *Journal of chromatography. A*, 923(1-2), 241–248. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)00980-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)00980-3)
- [17] Tobback, K., Li, Y. M., Pizarro, N. A., De Smedt, I., Smeets, T., Van Schepdael, A., Roets, E., & Hoogmartens, J. (1999). Micellar electrokinetic capillary chromatography of macrolide antibiotics. Separation of tylosin, erythromycin and their related substances. *Journal of chromatography. A*, 857(1-2), 313–320. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(99\)00770-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(99)00770-0)
- [18] Luong, J. H., & Guo, Y. (1998). Mixed-mode separation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, 19(5), 723–730. <https://doi.org/10.1002/elps.1150190521>
- [19] Mwangela, S. M., Numan, A., Gill, N. L., Agbaria, R. A., & Warner, I. M. (2003). Separation of achiral and chiral analytes using polymeric surfactants with ionic liquids as modifiers in micellar electrokinetic chromatography. *Analytical chemistry*, 75(22), 6089–6096. <https://doi.org/10.1021/ac034386i>
- [20] Muhonen, J., Holopainen, J. M., & Wiedmer, S. K. (2009). Interactions between local anesthetics and lipid dispersions studied with liposome electrokinetic capillary chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1216(15), 3392–3397. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.028>
- [21] Mohorič, U., Beutner, A., Krickl, S., Touraud, D., Kunz, W., & Matysik, F. M. (2016). Surfactant-free microemulsion electrokinetic chromatography (SF-MEEKC) with UV and MS detection - a novel approach for the separation and ESI-MS detection of neutral compounds. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(30), 8681–8689. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0057-0>
- [22] McGettrick, J. R., Williamson, N. H., Sutton, A. T., & Palmer, C. P. (2017). Performance and selectivity of cationic nanoparticle pseudo-stationary phases in electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, 38(5), 730–737. <https://doi.org/10.1002/elps.201600380>
- [23] Li, A., Xue, S., Ren, S., Xu, Y., & Zhang, Q. (2022). Hydrophobic deep eutectic solvents as pseudo-stationary phases in capillary electrokinetic chromatography: An explorative study. *Analytica chimica acta*, 1213, 339936. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339936>
- [24] Breadmore M. C. (2012). Capillary and microchip electrophoresis: challenging the common conceptions. *Journal of chromatography. A*, 1221, 42–55. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.062>
- [25] Gebauer, P., & Bocek, P. (2009). Electrophoretic sample stacking. *Electrophoresis*, 30 *Suppl 1*, S27–S33. <https://doi.org/10.1002/elps.200900053>
- [26] Otin, J., Tran, N. T., Benoit, A., Buisson, C., & Taverna, M. (2023). Online large volume sample stacking preconcentration and separation of enantiomeric GHRH analogs

- by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 10.1002/elps.202200278. w trakcie publikacji. <https://doi.org/10.1002/elps.202200278>
- [27] Zhao, T., Wang, L., & Chen, D. D. Y. (2020). Quantification of imatinib and related compounds using capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry with field-amplified sample stacking. *Electrophoresis*, 41(21-22), 1843–1850. <https://doi.org/10.1002/elps.202000118>
- [28] Purgat, K., Koška, I., & Kubalczyk, P. (2021). The Use of Single Drop Microextraction and Field Amplified Sample Injection for CZE Determination of Homocysteine Thiolactone in Urine. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(18), 5687. <https://doi.org/10.3390/molecules26185687>
- [29] Yahaya, N., Huang, Z. A., Yan, B., & Chen, D. D. Y. (2022). Capillary electrophoresis-mass spectrometry analysis of bisphenol A and its analogues in bottled tea beverages with dynamic pH focusing. *Food chemistry*, 372, 131220. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131220>
- [30] Ivanov, A. V., Popov, M. A., Aleksandrin, V. V., Kozhevnikova, L. M., Moskovtsev, A. A., Kruglova, M. P., Vladimirovna, S. E., Aleksandrovich, S. V., & Kubatiev, A. A. (2022). Determination of glutathione in blood via capillary electrophoresis with pH-mediated stacking. *Electrophoresis*, 43(18-19), 1859–1870. <https://doi.org/10.1002/elps.202200119>
- [31] Fukushi, K., Fujita, Y., Nonogaki, J., Tsujimoto, J. I., Hattori, T., Inui, H., Beškoski, V. P., Hotta, H., Hayashi, M., & Nakano, T. (2018). Capillary zone electrophoresis determination of fluoride in seawater using transient isotachopheresis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 410(6), 1825–1831. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0838-0>
- [32] Koška, I., Purgat, K., Głowacki, R., & Kubalczyk, P. (2021). Simultaneous Determination of Ciprofloxacin and Ofloxacin in Animal Tissues with the Use of Capillary Electrophoresis with Transient Pseudo-Isotachopheresis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(22), 6931. <https://doi.org/10.3390/molecules26226931>
- [33] Quirino, J. P., & Terabe, S. (1998). Exceeding 5000-fold concentration of dilute analytes in micellar electrokinetic chromatography. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5388), 465–468. <https://doi.org/10.1126/science.282.5388.465>
- [34] Lin, Y. H., Lu, C. Y., Jiang, S. J., Hsiao, W. Y., Cheng, H. L., & Chen, Y. L. (2015). Application of a multivariate approach for analyte focusing by micelle collapse-micellar electrokinetic chromatography for analyzing sunscreen agents in cosmetics. *Electrophoresis*, 36(19), 2396–2403. <https://doi.org/10.1002/elps.201500222>
- [35] Dziomba, S., Kowalski, P., & Bączek, T. (2012). Micelle to solvent stacking of tricyclic psychiatric drugs in capillary electrophoresis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 62, 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.01.018>
- [36] Quirino, J. P., Grochocki, W., & Markuszewski, M. J. (2017). Sample Concentration of Charged Small Molecules and Peptides in Capillary Electrophoresis by Micelle to Cyclodextrin Stacking. *Analytical chemistry*, 89(24), 13422–13428. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03700>
- [37] Shen, H. J., & Lin, C. H. (2006). Comparison of the use of anionic and cationic surfactants for the separation of steroids based on MEKC and sweeping-MEKC modes. *Electrophoresis*, 27(5-6), 1255–1262. <https://doi.org/10.1002/elps.200500659>
- [38] Fang, H., Yang, F., Sun, J., Tian, Y., Zeng, Z., & Xu, Y. (2011). Centrifuge microextraction coupled with sweeping-MEKC to analyze trace steroid hormones in urine samples. *Talanta*, 85(4), 2148–2153. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.07.060>

- [39] Wang, C. C., Cheng, S. F., Cheng, H. L., & Chen, Y. L. (2013). Analysis of anabolic androgenic steroids in urine by full-capillary sample injection combined with a sweeping CE stacking method. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(6), 1969–1976. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6640-0>
- [40] Wang, C. C., Chen, J. L., Chen, Y. L., Cheng, H. L., & Wu, S. M. (2012). A novel stacking method of repetitive large volume sample injection and sweeping MEKC for determination of androgenic steroids in urine. *Analytica chimica acta*, 744, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.07.021>
- [41] El-Awady, M., Belal, F., & Pyell, U. (2013). Robust analysis of the hydrophobic basic analytes loratadine and desloratadine in pharmaceutical preparations and biological fluids by sweeping-cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1309, 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.020>
- [42] Quirino, J. P., & Haddad, P. R. (2008). Online sample preconcentration in capillary electrophoresis using analyte focusing by micelle collapse. *Analytical chemistry*, 80(17), 6824–6829. <https://doi.org/10.1021/ac801258r>
- [43] Quirino J. P. (2008). Neutral analyte focusing by micelle collapse in micellar electrokinetic chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1214(1-2), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.074>
- [44] Dawod, M., Breadmore, M. C., Guijt, R. M., & Haddad, P. R. (2010). Strategies for the on-line preconcentration and separation of hypolipidaemic drugs using micellar electrokinetic chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1217(3), 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.043>
- [45] Olędzka, I., Kowalski, P., Plenis, A., & Bączek, T. (2017). Evaluation of various approaches to the isolation of steroid hormones from urine samples prior to FASS-MEKC analysis. *Electrophoresis*, 38(12), 1632–1643. <https://doi.org/10.1002/elps.201600509>
- [46] Fang, H., Yang, F., Sun, J., Zeng, Z., & Xu, Y. (2007). Pressure-assisted field-amplified sample injection with reverse migrating micelles for analyzing trace steroids in MEKC. *Electrophoresis*, 28(20), 3697–3704. <https://doi.org/10.1002/elps.200700210>
- [47] Gallart-Ayala, H., Núñez, O., Moyano, E., & Galceran, M. T. (2010). Field-amplified sample injection-micellar electrokinetic capillary chromatography for the analysis of bisphenol A, bisphenol F, and their diglycidyl ethers and derivatives in canned soft drinks. *Electrophoresis*, 31(9), 1550–1559. <https://doi.org/10.1002/elps.200900606>
- [48] Félez, C., Molet, A., & Núñez, O. (2015). Field-Amplified Sample Injection-Micellar Electrokinetic Chromatography for the Determination of Benzophenones in Food Simulants. *Chromatography*, 2(3), 452–471. <http://dx.doi.org/10.3390/chromatography2030452>
- [49] Zrnčić, M., Babić, S., & Mutavdžić Pavlović, D. (2015). Determination of thermodynamic pKa values of pharmaceuticals from five different groups using capillary electrophoresis. *Journal of separation science*, 38(7), 1232–1239. <https://doi.org/10.1002/jssc.201401057>
- [50] Anadón, A., & Reeve-johnson, L. (1999). Macrolide antibiotics, drug interactions and microsomal enzymes: implications for veterinary medicine. *Research in veterinary science*, 66(3), 197–203. <https://doi.org/10.1053/rvsc.1998.0244>
- [51] Flurer C. L. (1996). Analysis of macrolide antibiotics by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 17(2), 359–366. <https://doi.org/10.1002/elps.1150170212>

- [52] González-Hernández, R., Li, Y. M., Van Schepdael, A., Roets, E., & Hoogmartens, J. (1999). Analysis of spiramycin by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, *20*(12), 2407–2411. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19990801\)20:12<2407::AID-ELPS2407>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19990801)20:12<2407::AID-ELPS2407>3.0.CO;2-O)
- [53] Buchberger, W., Ferdig, M., Sommer, R., & Vo, T. D. (2004). Trace analysis of rapamycin in human blood by micellar electrokinetic chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *380*(1), 68–71. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2687-x>
- [54] Berrada, H., Moltó, J. C., Mañes, J., & Font, G. (2010). Determination of aminoglycoside and macrolide antibiotics in meat by pressurized liquid extraction and LC-ESI-MS. *Journal of separation science*, *33*(4-5), 522–529. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900682>
- [55] Guidi, L. R., Santos, F. A., Ribeiro, A. C., Fernandes, C., Silva, L. H., & Gloria, M. B. (2017). A simple, fast and sensitive screening LC-ESI-MS/MS method for antibiotics in fish. *Talanta*, *163*, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.089>
- [56] Lalloo, A. K., Chattaraj, S. C., & Kanfer, I. (1997). Development of a capillary electrophoretic method for the separation of the macrolide antibiotics, erythromycin, josamycin and oleandomycin. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, *704*(1-2), 333–341. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(97\)00456-8](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(97)00456-8)
- [57] Chen, Q. C., & Wang, J. (2001). Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography. *Journal of chromatography. A*, *937*(1-2), 57–64. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)01306-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)01306-1)
- [58] Jaworska, M., Szulińska, Z., & Wilk, M. (2005). Application of a capillary electrophoresis method for simultaneous determination of preservatives in pharmaceutical formulations. *Journal of separation science*, *28*(2), 137–143. <https://doi.org/10.1002/jssc.200401785>
- [59] Sun, B., Qi, L., & Wang, M. (2014). Determination of preservatives in soft drinks by capillary electrophoresis with ionic liquids as the electrolyte additives. *Journal of separation science*, *37*(16), 2248–2252. <https://doi.org/10.1002/jssc.201400444>
- [60] Huang, J. Q., Hu, C. C., & Chiu, T. C. (2013). Determination of seven preservatives in cosmetic products by micellar electrokinetic chromatography. *International journal of cosmetic science*, *35*(4), 346–353. <https://doi.org/10.1111/ics.12040>
- [61] Baranowska, I., Wojciechowska, I., Solarz, N., & Krutysza, E. (2014). Determination of preservatives in cosmetics, cleaning agents and pharmaceuticals using fast liquid chromatography. *Journal of chromatographic science*, *52*(1), 88–94. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms210>
- [62] Tsai, I.-C., Su, C.-Y., Hu, C.-C., & Chiu, T.-C. (2014). Simultaneous determination of whitening agents and parabens in cosmetic products by capillary electrophoresis with on-line sweeping enhancement. *Anal. Methods*, *6*(19), 7615–7620. <https://doi.org/10.1039/C4AY00985A>
- [63] Hsu, S. H., Hu, C. C., & Chiu, T. C. (2014). Online dynamic pH junction-sweeping for the determination of benzoic and sorbic acids in food products by capillary electrophoresis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *406*(2), 635–641. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7481-1>
- [64] He, S., Zhao, Y., Zhu, Z., Liu, H., Li, M., Shao, Y., & Zhuang, Q. (2006). Comparative study for the analysis of parabens by micellar electrokinetic capillary chromatography with and without large-volume sample stacking technique. *Talanta*, *69*(1), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.09.018>

- [65] Blanco, E., Casais, M.delC., Mejuto, M.delC., & Cela, R. (2008). Simultaneous determination of p-hydroxybenzoic acid and parabens by capillary electrophoresis with improved sensitivity in nonaqueous media. *Electrophoresis*, 29(15), 3229–3238. <https://doi.org/10.1002/elps.200700916>
- [66] Maijó, I., Borrull, F., Aguilar, C., & Calull, M. (2013). Different strategies for the preconcentration and separation of parabens by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 34(3), 363–373. <https://doi.org/10.1002/elps.201200147>
- [67] Blanco, E., Casais, M.delC., Mejuto, M.delC., & Cela, R. (2009). Combination of off-line solid-phase extraction and on-column sample stacking for sensitive determination of parabens and p-hydroxybenzoic acid in waters by non-aqueous capillary electrophoresis. *Analytica chimica acta*, 647(1), 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.05.024>
- [68] Cheng, Y. C., Wang, C. C., Chen, Y. L., & Wu, S. M. (2012). Large volume sample stacking with EOF and sweeping in CE for determination of common preservatives in cosmetic products by chemometric experimental design. *Electrophoresis*, 33(9-10), 1443–1448. <https://doi.org/10.1002/elps.201100546>
- [69] Kuo, K.-L., & Hsieh, Y.-Z. (1997). Determination of preservatives in food products by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis with multiwavelength detection. *Journal of Chromatography A*, 768(2), 334–341. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00040-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00040-X)
- [70] Paragliola, R. M., Torino, F., Papi, G., Locantore, P., Pontecorvi, A., & Corsello, S. M. (2018). Role of Mitotane in Adrenocortical Carcinoma - Review and State of the art. *European endocrinology*, 14(2), 62–66. <https://doi.org/10.17925/EE.2018.14.2.62>
- [71] Ghataore, L., Chakraborti, I., Aylwin, S. J., Schulte, K. M., Dworakowska, D., Coskeran, P., & Taylor, N. F. (2012). Effects of mitotane treatment on human steroid metabolism: implications for patient management. *Endocrine connections*, 1(1), 37–47. <https://doi.org/10.1530/EC-12-0028>
- [72] Veytsman, I., Nieman, L., & Fojo, T. (2009). Management of Endocrine Manifestations and the Use of Mitotane As a Chemotherapeutic Agent for Adrenocortical Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 27(27), 4619–4629. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.2775>
- [73] Garg, M. B., Sakoff, J. A., & Ackland, S. P. (2011). A simple HPLC method for plasma level monitoring of mitotane and its two main metabolites in adrenocortical cancer patients. *Journal of Chromatography B*, 879(23), 2201–2205. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.06.001>
- [74] De Francia, S., Pirro, E., Zappia, F., De Martino, F., Sprio, A. E., Daffara, F., Terzolo, M., Berruti, A., Di Carlo, F., & Ghezzi, F. (2006). A new simple HPLC method for measuring mitotane and its two principal metabolites. *Journal of Chromatography B*, 837(1–2), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.04.005>
- [75] Luci, G., Cucchiara, F., Ciofi, L., Mattioli, F., Lastella, M., Danesi, R., & Di Paolo, A. (2021). Determination of Mitotane (DDD) and Principal Metabolite by a Simple HPLC-UV Method and Its Validation in Human Plasma Samples. *Separations*, 8(5), 63. <https://doi.org/10.3390/separations8050063>
- [76] Mornar, A., Sertić, M., Turk, N., Nigović, B., & Koršić, M. (2012). Simultaneous analysis of mitotane and its main metabolites in human blood and urine samples by SPE-HPLC technique. *Biomedical Chromatography*, 26(11), 1308–1314. <https://doi.org/10.1002/bmc.2696>

- [77] Jančić-Stojanović, B., Vemić, S., Elezović, V., Petrović, A., Sinadinović, Z., Ivanović, D., Damjanović, S., & Miljković, B. (2015). Development of New Liquid Chromatographic Method for Mitotane and Its Metabolites Determination in Human Plasma Employing Design of Experiments Methodology. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38(14), 1371–1378. <https://doi.org/10.1080/10826076.2015.1057645>
- [78] Ando, M., Hirabatake, M., Yasui, H., Fukushima, S., Sugioka, N., & Hashida, T. (2020). A simplified method for therapeutic drug monitoring of mitotane by gas chromatography-electron ionization-mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 34(3). <https://doi.org/10.1002/bmc.4776>
- [79] Chen, Z., Maartens, F., Vega, H., Kunene, S., Gumede, J., & Krieger, R. I. (2009). 2,2-bis(4-Chlorophenyl)Acetic Acid (DDA), a Water-Soluble Urine Biomarker of DDT Metabolism in Humans. *International Journal of Toxicology*, 28(6), 528–533. <https://doi.org/10.1177/1091581809349862>
- [80] Cazaubon, Y., Talineau, Y., Feliu, C., Konecki, C., Russello, J., Mathieu, O., & Djerada, Z. (2019). Population Pharmacokinetics Modelling and Simulation of Mitotane in Patients with Adrenocortical Carcinoma: An Individualized Dose Regimen to Target All Patients at Three Months? *Pharmaceutics*, 11(11), 566. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110566>
- [81] Brocos, P., Banquy, X., Díaz-Vergara, N., Pérez-Casas, S., Piñeiro, Á., & Costas, M. (2011). A Critical Approach to the Thermodynamic Characterization of Inclusion Complexes: Multiple-Temperature Isothermal Titration Calorimetric Studies of Native Cyclodextrins with Sodium Dodecyl Sulfate. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(49), 14381–14396. <https://doi.org/10.1021/jp208740b>
- [82] Jiang, L., Peng, Y., Yan, Y., Deng, M., Wang, Y., & Huang, J. (2010). “Annular Ring” microtubes formed by SDS@2 β -CD complexes in aqueous solution. *Soft Matter*, 6(8), 1731. <https://doi.org/10.1039/b920608f>
- [83] Lin, C.-E., Huang, H.-C., & Chen, H.-W. (2001). A capillary electrophoresis study on the influence of β -cyclodextrin on the critical micelle concentration of sodium dodecyl sulfate. *Journal of Chromatography A*, 917(1–2), 297–310. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00636-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00636-7)
- [84] Zang, K., Xia, J., Wu, C., Yang, S., Wang, W., Zeng, Z.-C., Zhou, L., & Pu, Q. (2021). After enjoying curry: urine metabolism analysis of curcuminoids by microemulsion electrokinetic chromatography with laser-induced native fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1635, 461729. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461729>
- [85] Bordagaray, A., Garcia-Arrona, R., Vidal, M., & Ostra, M. (2018). Determination of food colorants in a wide variety of food matrices by microemulsion electrokinetic capillary chromatography. Considerations on the found concentrations and regulated consumption limits. *Food Chemistry*, 262, 129–133. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.086>
- [86] Ma, H., Li, J., Yu, H., Li, Z., Gao, X., & Chang, Y. (2018). The microemulsion electrokinetic capillary chromatography combined with reversed-electrode polarity stacking mode for enriching and quantifying lignanoids and ginsenosides in TCMs preparation Shengmai injection. *Electrophoresis*, 39(19), 2439–2445. <https://doi.org/10.1002/elps.201800196>
- [87] Seelanan, P., Srisa-art, M., Petsom, A., & Nhujak, T. (2006). Determination of avermectins in commercial formulations using microemulsion electrokinetic chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 570(1), 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.03.110>

- [88] Olędzka, I., Kowalski, P., Bałuch, A., Bączek, T., Paradziej-Łukowicz, J., Taciak, M., & Pastuszewska, B. (2014). Quantification of the level of fat-soluble vitamins in feed based on the novel microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(3), 544–551. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6290>
- [89] Olędzka, I., Kaźmierska, K., Plenis, A., Kamińska, B., & Bączek, T. (2015). Capillary electromigration techniques as tools for assessing the status of vitamins A, C and E in patients with cystic fibrosis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *102*, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.036>
- [90] Yin, C., Cao, Y., Ding, S., & Wang, Y. (2008). Rapid determination of water- and fat-soluble vitamins with microemulsion electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1193*(1–2), 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.016>
- [91] Cao, J., Chen, J., Yi, L., Li, P., & Qi, L.-W. (2008). Comparison of oil-in-water and water-in-oil microemulsion electrokinetic chromatography as methods for the analysis of eight phenolic acids and five diterpenoids. *Electrophoresis*, *29*(11), 2310–2320. <https://doi.org/10.1002/elps.200700749>
- [92] Suntornsuk, L. (2010). Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *398*(1), 29–52. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3741-5>
- [93] Ryan, R., Altria, K., McEvoy, E., Donegan, S., & Power, J. (2013). A review of developments in the methodology and application of microemulsion electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, *34*(1), 159–177. <https://doi.org/10.1002/elps.201200375>
- [94] Paria, S., & Yuet, P. K. (2006). Solubilization of Naphthalene by Pure and Mixed Surfactants. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *45*(10), 3552–3558. <https://doi.org/10.1021/ie051377m>
- [95] Rathi, DN., Md Noh, M.F., Abd Rashed, A. *et al.* Simultaneous analysis of vitamin D and K in processed food products via ultra high- performance liquid chromatography (UHPLC). *Food Measure* **13**, 1947–1957 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00113-8>

4. Manuskrypty wchodzące w skład rozprawy doktorskiej.



Combination of field amplified sample injection and hydrophobic interaction electrokinetic chromatography (FASI-HIEKC) as a signal amplification method for the determination of selected macrocyclic antibiotics

Piotr Kowalski ^{a,*}, Ilona Olędzka ^a, Alina Plenis ^a, Natalia Miękus ^{a,b}, Michał Pieckowski ^a, Tomasz Bączek ^a

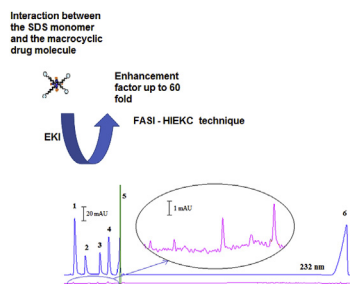
^a Department of Pharmaceutical Chemistry, Medical University of Gdańsk, Hallera 107, Gdańsk, 80-416, Poland

^b Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology, University of Gdańsk, Wita Stwosza 59, Gdańsk, 80-308, Poland

HIGHLIGHTS

- Electrophoretic separation of six macrocyclic drugs in a single run was performed.
- A hydrophobic interaction electrokinetic chromatography (HIEKC) mechanism for macrocyclic antibiotics was described.
- Combination of FASI and HIEKC for the signal amplification effect for the first time was applied.
- The effect of the sample composition on the separation effect was tested.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 July 2018

Received in revised form

14 September 2018

Accepted 20 September 2018

Available online 23 September 2018

Keywords:

Signal enhancement technique
Hydrophobic interaction electrokinetic chromatography
Field amplified sample injection
Macrolide and ansamycin antibiotics

ABSTRACT

In this study, a field amplified sample injection (FASI) and hydrophobic interaction electrokinetic chromatography (HIEKC) method has been developed for the separation of five macrolide antibiotics: spiramycin, ivermectin, tylosin, josamycin, rapamycin, and one ansamycin drug – rifamycin. By the manipulation of both the sample and separation buffer compositions, their pH values and molarity, a systematic approach has been achieved to maximize analyte differential electrophoretic mobility and signal amplification. The impact of the sample solution composition and the injection mode on the signal amplification effect of the six tested antibiotics was also investigated. Moreover, the influence of the injection of the sample and the water plug on the quantity, symmetry and height of the analyte signal was demonstrated. All the analytes were completely resolved in less than 8 min in an uncoated fused-silica capillary of 75 μm internal diameter (I.D.) \times 50 cm length. The electrophoretic separations were performed in a 60% (v/v) acetonitrile and 20 mM phosphate electrolyte system (pH 7.1) with an applied voltage of 25 kV. The established method was validated and confirmed to be applicable for the determination of the active ingredients in a quality control analysis.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Macrocyclic antibiotics have proven to be a valuable alternative

* Corresponding author.

E-mail addresses: piotr.kowalski@gumed.edu.pl, piotrpl@wp.eu (P. Kowalski).

to penicillins and cephalosporins for treating a number of infections. The interest of clinicians in these drugs is due to their broad spectrum of action, while relatively minor side effects and lack of teratogenicity. This group of antibiotics can be defined as lipophilic molecules, constituted by a macrocyclic lactone ring (formed by 14, 15 or 16 carbon atoms) linked to one or more deoxy sugar molecule with glycosidic bonds [1]. Some of them are amino-sugars, containing a diethylamino, tertiary amine function. Macrolides are hydrophobic weak base drugs with pK_a values in the range of 7.1–8.9 (only rapamycin shows a pK_a close to 10), thus these antibiotics pass very readily into tissues (with a pH lower than blood) by non-ionic passive diffusion [2]. The basic difficulty associated with the analysis of these compounds by means of electromigration techniques is their low to insignificant solubilities in aqueous solutions despite the presence of carbohydrate moieties in their structures. Moreover, macrolides are relatively large molecules, devoid of chromophores, and they can usually be present in biological material at trace level ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Due to their very low solubility in aqueous buffers, macrocyclic compounds may precipitate during electrophoretic analysis, necessitating a special approach for the selection of capillary electrophoresis (CE) separation parameters.

To overcome this problem, different approaches, including a different buffer system: cholate-acetonitrile, and acetonitrile-phosphate [3], or a mixed micellar separation buffer (composed of cholate-cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) – phosphate, pH 7) [4,5] were performed. However, the CE methods available in the literature for the analysis of macrocyclic antibiotics most often concern only a single compound [6]. Although fast reductive voltammetric detection is also used for CE analysis of selected macrolides [7], the most recent liquid chromatography (LC) - mass spectrometry (MS) methods are often selected [8,9]. Reviews with a summary of the most important achievements of the determination of macrolides by CE techniques can be found in publications by Flurer [3,10,11] and other authors [12,13]. Recently, Hong et al. [14] have described a micellar electrokinetic chromatography (MEKC) method with field amplified sample stacking (FASS) for the five macrolide residues in milk samples; however, the description of the method indicates the use of a field amplified sample injection (FASI) technique rather than the use of an electrokinetic injection (EKI).

The first descriptions of interactions between hydrophobic analytes and acetonitrile (ACN) – water mixtures containing tetrahexylammonium salts, known as “solvophobic interactions” were demonstrated by Walbroehl and Jorgenson [15]. Next, interactions between acidic silanol groups and the amine moiety of macrolides in the presence of tetraalkylammonium hydrogen sulphate were investigated by Paesen et al. [16]. A thorough study of the influence of organic solvents contained in the separation buffer and the sample matrix on the efficiency of CE separation of macrolides was undertaken by Laloo et al. [17]. Separations of very hydrophobic neutral analytes were achieved using hydrophobic interaction electrokinetic chromatography (HIEKC) by Ahuja and Foley [18].

The HIEKC technique utilizes surfactants below their critical micelle concentration (CMC) in the presence of an organic solvent to induce hydrophobic interactions between the surfactant monomers and the lipophilic analytes. All hydrophobic interactions take place between solubilized analytes and the hydrophobic portions of free (non-micellized) surfactant monomers in solution [18]. In our study, an anionic surfactant such as sodium dodecyl sulphate (SDS) was employed at a concentration that did not allow the formation of micelles. In this way, the monomers of the free surfactant only were present in the sample matrix dedicated for EKI.

It was possible to hypothesize that free SDS molecules (not forming micellar structures) enter into hydrophobic interactions

sufficiently strong to modify the charges of macrocyclic antibiotics. In order to test the theory of possible hydrophobic interactions between free SDS monomers and hydrophobic compounds, Ahuja and Foley reported SDS- and CTAB-based HIEKC methods as a new way to quantify very hydrophobic analytes like alkyl aryl ketone homologues [18]. Similarly, the HIEKC method utilizing ACN-water separation buffers and containing tetraalkylammonium ions as the pseudo-stationary phase was proposed by Pedersen-Bjergard et al. [19] as an attractive CE technique for the separation of non-ionic hydrophobic vitamins as highly hydrophobic substances. It should be noted that those authors also suggested that free SDS molecules are able to modify the charges of macrocyclic antibiotics as a result of hydrophobic interactions.

Therefore, the first attempt to obtain a significant signal amplification for hydrophobic compounds using HIEKC in combination with FASI during EKI, and the following electrophoretic separation, has been presented. In order to study the theory of possible hydrophobic interactions between lipophilic compounds and free surfactant monomers, the separation of macrocyclic antibiotics was conducted. Moreover, the effect of SDS and ACN concentrations in the sample solution on the separation of hydrophobic macrocyclic compounds was investigated, and the possible HIEKC mechanism during EKI has been discussed.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

HPLC-grade ACN was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), while all macrocyclic antibiotics were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). SDS, disodium hydrogen phosphate and sodium dihydrogen phosphate, used to prepare the tested separation buffers, were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Highly pure water (distilled and deionized) was obtained from Milli-Q equipment (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Macrocyclic antibiotics standard solutions

Individual stock solutions of analytes at a concentration of 1 mg mL^{-1} were prepared in pure ACN and stored at -20°C . Mixed standard and working solutions were freshly prepared at each working session from the stock solutions by proper dilution with ACN and SDS solutions and were shaken on a Basic Yellow Line TTS 3, IKA[®] shaker (Staufen, Germany). All working solutions were stored at 4°C in dark containers for 48 h.

2.3. CE instrument

The electrophoretic separations were conducted on a PACE MDQ capillary electrophoresis system (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) equipped with a diode array detector (DAD) and controlled with 32 Karat 8.0 software. Uncoated fused-silica capillaries (Polymicro Technology) with an I.D. of $75 \mu\text{m}$ and 60.2 cm total length (50 cm length to the detector) were used for the electrophoresis and hydrophobic interaction experiments. The capillary temperature was controlled at $25.0 (\pm 0.1)^\circ\text{C}$ during all the experiments. Samples were injected at the inlet end of the capillary using the EKI mode (injection time 18 s, applied voltage – 10 kV, reversed polarity) and with a hydrodynamic pre-injection of the water plug (5 s at 0.5 psi). A separation voltage of +25 kV was applied at positive polarity (cathode at the detection end) with the separation buffer at both ends of the capillary. The UV detection for spiramycin, josamycin and rifamycin was performed at 232 nm, whereas for ivermectin, tylosin and rapamycin, it was set at 284 nm.

To ensure good reproducibility of all analyses, the new capillary was conditioned with 0.1 M NaOH (10 min), deionized water (10 min) and with the separation buffer for 10 min prior to use. Between each run, to inter-process regeneration, the capillary was washed with 0.1 M NaOH (1 min), deionized water (1 min) and finally with the separation buffer for 1 min. The pH values of the separation buffer and other solutions were measured using a pH meter (Beckman Coulter, CA, USA).

The separation was performed in a separation buffer composed of 60% (v/v) ACN and 20 mM phosphate buffer solution that was prepared from sodium dihydrogen phosphate and disodium hydrogen phosphate (5:1, w/w), whereas the sample matrix consisted of 10% (v/v) ACN and 3.5 mM SDS water solution. The separation buffer was replenished after ten runs, while the sample for EKI was used only once to maintain the reproducibility of the results.

3. Results and discussion

In this study, a combination of two techniques as a signal amplification method for the determination of hydrophobic compounds has been presented. One of them is a technique of *on-line* preconcentration, the other is a method of hydrophobic interactions used during the injection of a sample into a capillary.

3.1. Separation buffer composition

A preliminary analysis using different separation buffers with a pH in the range of 6–8 for both capillary zone electrophoresis (CZE) and MEKC techniques did not provide satisfactory results. This may be explained by the fact that very hydrophobic compounds tended to remain in the inner hydrophobic core of the micelle and most frequently co-migrate with the micelle itself. Moreover, MEKC separations are most efficient when solutes possess some degree of water solubility [3] or when a mixed micelle system is employed [5]. Tობბაკ et al. obtained good selectivity in 10 min for the separation of tylosin and its related substances with a separation buffer containing 80 mM sodium phosphate, 20 mM sodium cholate and 7 mM CTAB [5].

One way to increase the affinity of the hydrophobic compounds for the aqueous solution is by the insertion of organic modifiers to the separation buffer [18]. The pK_a values for analytes in aqueous-organic solvents can significantly differ from those reported in aqueous solutions. Consequently, the degree of the ionization of macrocyclic antibiotics, their hydrodynamic radius and their electrophoretic mobility can be reduced in the presence of an organic solvent. Likewise, it has also been observed that the presence of an organic modifier in the CE buffer promotes the solubilization of the analytes, while the use of a bile salt enhances the electrophoretic separation of the structurally similar, hydrophobic compounds within this class of antibiotics. Flurer reported the development of a sodium cholate and an ACN system for the analysis of six macrolides, obtaining their separation in 16 and 14 min, respectively [3].

To ensure the full dissolution of the analytes in the separation buffer, we tested phosphate buffers with 40, 50, 60 and 65% (v/v) ACN for the determination of analytes. The results confirmed that the increase in ACN content to 60% improves the effect of signal amplification. Although Flurer [3] described the use of up to 65% of ACN in the separation buffer for macrolides, in our study it caused an interruption of the analysis before reaching 25 kV (between 50 and 60 s from the start of the separation).

Therefore, for further study we employed a separation buffer composed of 60% (v/v) ACN and 20 mM phosphate (pH 7.1) because it provided the maximum heights and the most symmetrical signals for macrocyclic drugs in a separation time not exceeding 8 min.

Moreover, an increase in the phosphate concentration resulted in a reduction in the analyte signals, which is in contradiction to Laloo's observations [17]. On the other hand, similarly to Laloo, we have noticed that along with the increase in pH, the time of analysis increased, while lowering the pH caused the peaks to sharpen.

3.2. Modification of the sample composition

All the tested drugs dissolved in pure organic solvents did not undergo electrophoretic separation because both the electric field strength and the baseline on the electropherogram were unstable. Studies conducted by Laloo [17] have shown that due to the extremely low solubility of macrocyclic drugs in aqueous solutions, they require the inclusion of 20% (v/v) of an organic solvent in the sample diluent to prevent precipitation. In order to obtain a satisfactory separation of analytes, the composition of the sample solution was modified in terms of the ACN and SDS content.

As already mentioned in the introduction, the addition of SDS in a small amount to the sample solution in the presence of ACN is unable to form micelles. The consequence of this is the inability to create a pseudo-stationary phase and the appearance of hydrophobic interactions between free SDS monomers and lipophilic macrolides. As a result of this approach, the analyte molecules interact with the lauryl-sulfuric acids groups to form hydrophobic bonds. Analytes receive a negative charge and after the injection into the capillary by EKI they can be separated according to the capillary zone electrophoresis (CZE) mechanism (Fig. 1).

Our results confirmed that thanks to the 3.5 mM content of SDS

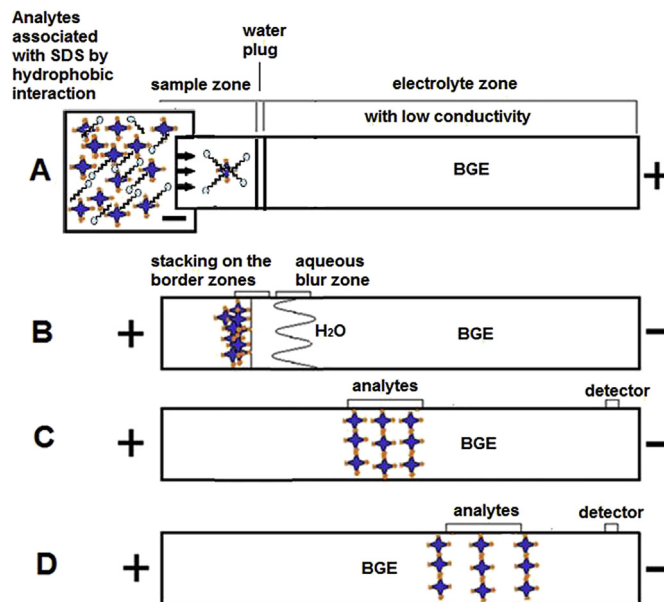


Fig. 1. Scheme mechanism of the FASI-HIEKC technique employed of EKI for hydrophobic analytes, followed CE separation.

(A) Initially, the capillary was filled with low conductivity BGE followed by hydrodynamic injection of a water plug. Hydrophobic analytes associated with SDS by hydrophobic interaction in sample matrix were introduced into the capillary by EKI at reverse polarity (cathode at the capillary inlet). The sample matrix consists of anionic surfactant (at concentration below CMC) and 10% (v/v) ACN.

(B) A high voltage was applied at normal polarity (anode at the capillary inlet). In contact with the BGE with a high content of organic solvent, the hydrophobic interactions are destabilized and the analytes stacking on the sample/BGE boundary.

(C) The analytes migrate toward the cathode and are separated by capillary one electrophoresis mechanism.

(D) Finally, the hydrophobic analytes reach the detector window. BGE – back ground electrolyte, CMC – critical micelle concentration, ACN– acetonitrile, EKI – electrokinetic injection.

in the sample solution, the 10% ACN was found to be sufficient to dissolve the analytes and to obtain symmetrical, sharp and high peaks of the selected macrocyclic drugs by the FASI-HIEKC method.

3.3. Optimization of injection parameters

Preliminary tests showed a frequent interruption of the CE analysis when a hydrodynamic injection (HDI) of the sample containing macrocyclic drugs dissolved in an ACN–water mixture was employed. It was caused by a sudden fall of the current in the sample zone. In these circumstances, an EKI analysis was considered, as injection mode for sample containing hydrophobic analytes. It was initially attempted to close the analytes in the micelles created by SDS, giving the complexes a certain amount of electric charge. In this case SDS worked also as a solubilizing agent for macrocyclic antibiotics. However, the addition of SDS above 3.5 mM in the sample solution caused additional signals from spiramycin, ivermectin and tylosin (probably from individual forms of these antibiotics) (Fig. 2A–C). Our research confirmed that the 10% (v/v) ACN content in the sample was found to be sufficient to dissolve the analytes, and a concentration of 3.5 mM SDS to obtain symmetrical, sharp and high peaks in the electrophoretic view (Fig. 2 D).

In consequence, the introduction of SDS at a concentration of 3.5 mM as the sample component can create the possibility for the formation of hydrophobic interactions, and allows the injection of lipophilic analytes into the capillary during EKI at reversed polarity. Moreover, in order to select the appropriate injection parameters, a series of experiments were performed where the injection times (in the range of 10–30 s) and applied voltage values (ranging from –5 to –15 kV) were tested to obtain the best separation efficiency. In terms of the applied voltage, the value of –10 kV (cathode at the inlet of the capillary) was chosen due to the highest signal intensity. For the optimization of the injection time, the best results were obtained with a time of 18 s. A longer injection time caused a blurring of the peaks, which became less sharp and asymmetrical (data not shown).

Summarizing, the use of EKI for analytes interacting

hydrophobically with SDS monomers allowed the possibility of the manipulation of the signal amplification effect to be extended. Under the given conditions, during EKI with reversed polarity, the SDS molecules interact with macrolides based on hydrophobic interactions. Furthermore, by using EKI, it was possible to inject the compounds of interest into the capillary without the accompanying matrix.

3.4. Field amplified sample injection procedure

Moreover, to increase the signal amplification, a stacking procedure based on the FASI mechanism was implemented. Macrocyclic drugs interacting hydrophobically with SDS molecules were injected into the capillary between two zones with different conductivities: a sample zone (with low conductivity) and a separation buffer zone (with high conductivity). As a result of the difference between the conductivities of the two zones, the analytes become stacked at the border zones because in the water region (without phosphate) the migration speed of analytes is relatively high, but it is significantly reduced as it approaches the separation buffer zone (with phosphate). Moreover, the ACN in combination with water behaves like an inert solvent and thus nominally changes the electroosmotic flow (EOF) [20]. However, by using reverse polarity during EKI, the mobility of complexes (hydrophobic analytes with SDS molecules) was greater than the opposite directed EOF, therefore FASI caused the injection of a relatively large amount of analytes. In result, a greater number of analytes were introduced into the capillary, as shown by the increase in peak heights in Fig. 3.

It should be noted that the selected macrocyclic compounds have only weak UV absorbance at the low wavelength range due to the lack of a suitable chromophore allowing sufficient absorbance of light in the UV range. Spiramycin, tylosin and rifamycin reached their absorption maxima at 232 nm, while the highest peaks for ivermectin, josamycin and rapamycin were registered at 284 nm. Therefore, the DAD was employed and two analytical wavelengths (232 and 284 nm), which had no interference with the baseline, were selected for further investigation.

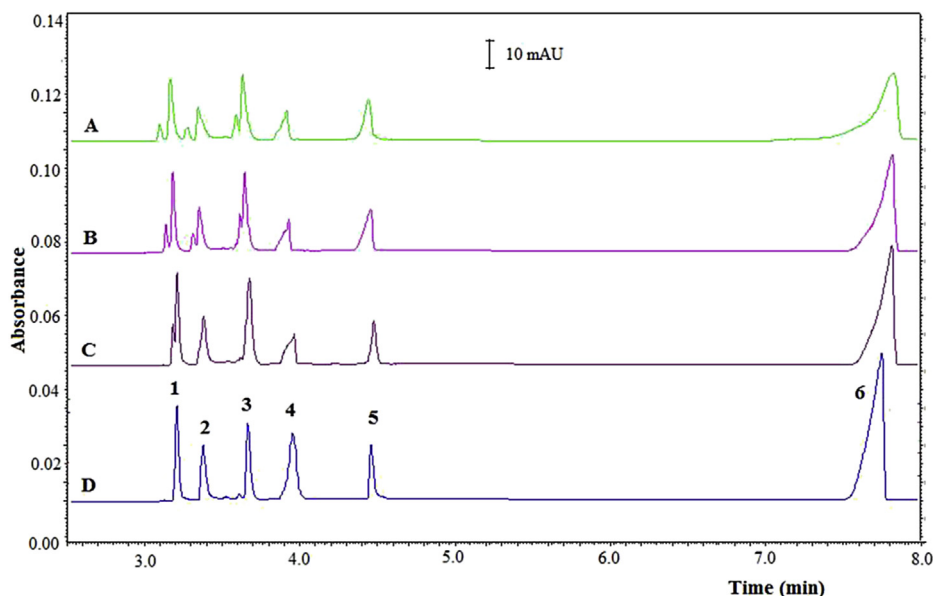


Fig. 2. The effect of SDS concentration in the sample on the electrophoretic separation of macrocyclic drugs. Concentration of SDS in the sample: 20 mM (A), 10 mM (B), 7 mM (C), 3.5 mM (D). Parameters: capillary 75 $\mu\text{m} \times 50$ cm; applied voltage +25 kV; EKI –10 kV, 30 s injection time of sample; UV $\lambda = 232$ nm; BGE: 60% (v/v) ACN, 20 mM phosphate (pH 7.1). A sample of 6 macrocyclic antibiotics: spiramycin (1), ivermectin (2), josamycin (3), tylosin (4), rapamycin (5), and rifamycin (6) at concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Abbreviations like in Fig. 1.

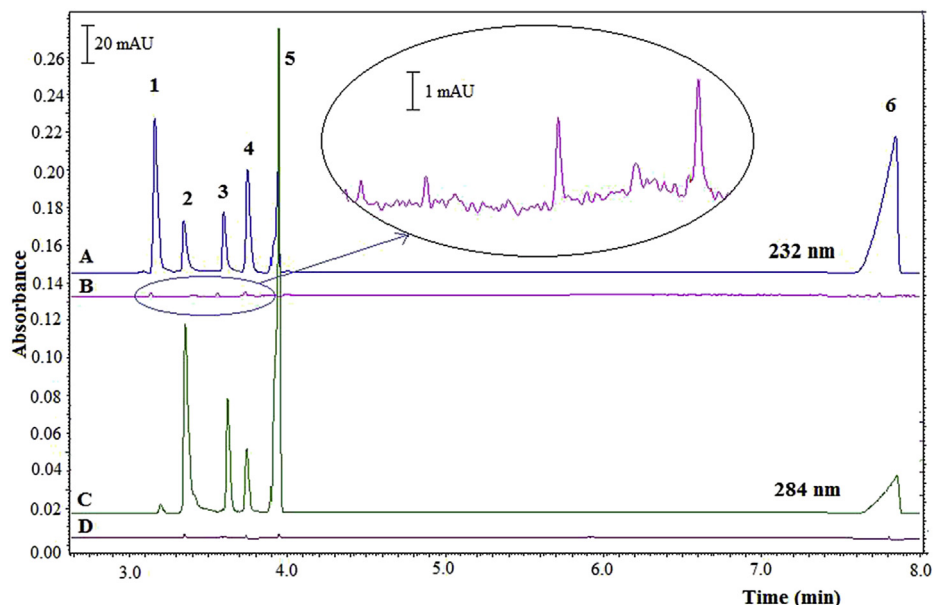


Fig. 3. The effect of signal amplification by using FASI-HIEKC method (A, C) in the comparison with the standard method based on HDI (B, D) for the macrocyclic antibiotics. Analysis of the sample containing spiramycin (1), ivermectin (2), josamycin (3), tylosin (4), rapamycin (5) and ansamycin drug - rifamycin (6) at $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ was conducted simultaneously at $\lambda = 232 \text{ nm}$ (A, B) and at $\lambda = 284 \text{ nm}$ (C, D), 18 s injection time of sample; other parameters such as at Fig. 2.

Moreover, in the above method, a water plug was used with HDI, optimized for time in the range of 0–10 s. The sharpest and most symmetrical peaks were obtained with a 5 s pre-injection of the water plug (Fig. 4).

3.5. Signal amplification effect

To evaluate the signal amplification effect for analytes, the enhancement factor (EF) was determined as a ratio of the limit of detection (LOD) value obtained using the FASI-HIEKC method to the LOD parameter calculated after the method based on standard

sample dosing (HDI 5 s, 3.45 kPa). The LOD and limit of quantification (LOQ) were calculated as three and ten times the baseline noise level, respectively (data has been collected in Table 1). It can be noted that the LOD values for conventional HDI by the CE technique were in the range of $3.12\text{--}7.75 \mu\text{g mL}^{-1}$, while the proposed FASI-HIEKC strategy allowed LODs between 0.08 and $0.18 \mu\text{g mL}^{-1}$ to be obtained for pure solvents (Table 1). Therefore, the use of 10% ACN in 3.5 mM SDS as the sample solution and the application of the FASI-HIEKC technique with a longer injection time (18 s) has allowed a sensitivity enhancement in the range of 17–63 fold for the tested compounds compared to the traditional

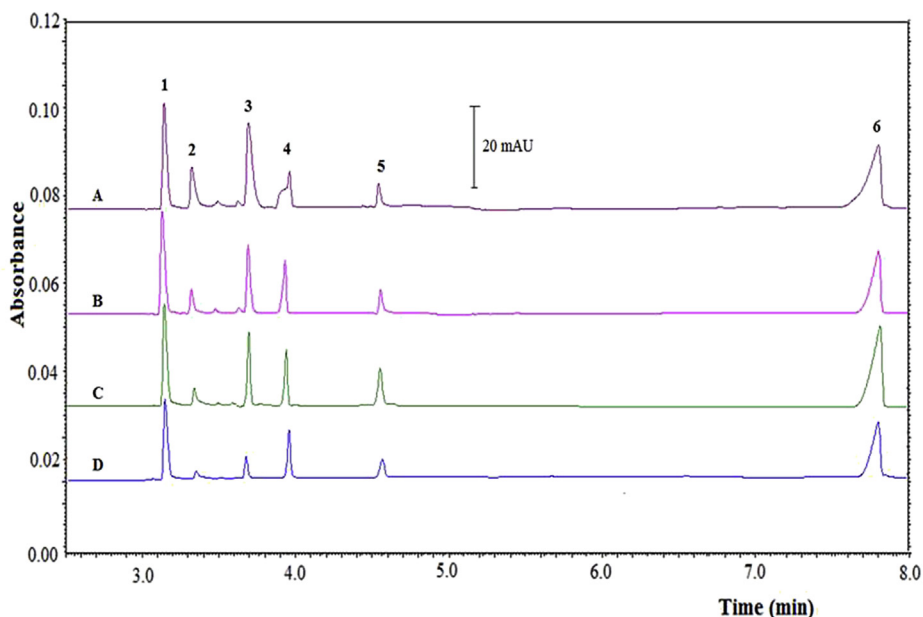


Fig. 4. Influence of water plug pre-injection time on signal efficiency for macrocyclic antibiotics. A sample of macrocyclic antibiotics: spiramycin (1), ivermectin (2), josamycin (3), tylosin (4), rapamycin (5) and rifamycin (6) at $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Parameters separation: UV $\lambda = 232 \text{ nm}$; water plug time HDI at 0.5 psi (3.45 kPa): 8 s (A), 6 s (B), 5 s (C), and finally 3 s (D). Other parameters such as at Fig. 3.

Table 1
Calibration parameters, enhancement factor (EF) and validation data for determination of macrocyclic antibiotics by FASI-HIEKC method (n = 6).

Substances	Spiramycin	Ivermectin	Tylosin	Josamycin	Rapamycin	Rifamycin
Limits of detection (LOD) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						
Traditional HDI	3.12	7.75	2.5	5.2	5.0	2.4
FASI-HIEKC	0.12	0.18	0.10	0.17	0.08	0.14
EF	26	43	25	26	63	17
Validation parameters of the developed FASI-HIEKC method						
Limits of quantification (LOQ) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						
For all substances	0.5					
Linearity concentration range of 0.5–50 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						
r	0.9993	0.9991	0.9979	0.9996	0.9996	0.9994
Intercept	881.38	981.66	300.38	418.8	1265.8	469.93
Slope	230.18	54.2	20.44	59.26	848.35	1347.3
Precision and accuracy assay						
Intra-day precision (% RSD)						
LQC	10.9	11.2	10.7	11.1	11.7	10.6
MQC	6.3	6.2	7.6	7.5	7.3	7.9
HQC	5.6	5.8	6.2	6.8	6.2	6.1
Intra-day accuracy (%)						
LQC	89	104	98	96	107	91
MQC	100	97	101	102	104	97
HQC	102	100	103	103	98	104
Inter-day precision (% RSD)						
LQC	11.6	12.0	11.2	11.5	12.2	10.9
MQC	7.6	6.7	7.9	8.4	7.9	8.5
HQC	5.9	6.3	6.6	7.0	6.8	6.9
Inter-day accuracy (%)						
LQC	86	101	96	94	108	89
MQC	97	95	99	100	100	95
HQC	101	96	98	101	94	106
Precision for the migration times of the analytes (% RSD)						
Intra-day	2.3	2.5	2.4	3.1	3.1	3.7
Inter-day	2.8	2.9	3.0	3.3	3.5	4.1

injection (5 s). Although the LODs for macrocyclic drugs obtained with liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) systems are comparable or lower [21–24], CE-DAD based methods are cheaper, easier and more available to perform.

3.6. Validation study

The developed FASI-HIEKC method was validated according to FDA and ICH requirements [25,26]. The linearity of the method was tested for the concentration range of 0.5–50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ using standard solutions. The elaborated CE method exhibited reliable linear responses for the validated range of concentrations for each macrocyclic drug. Likewise, satisfactory determination coefficients ($r > 0.9979$) were obtained for the calibration curves. As it was earlier mentioned, the LODs were from 0.08 to 0.18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ while the LOQ parameters were set at 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. An intra-day and inter-day precision and accuracy study was carried out with tested quality control (QC) samples at three different concentrations (low (LQC), medium (MQC), and high (HQC) at the levels of 1, 10, and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively), which were prepared with standard solutions of each analysed drug. The precision was expressed as the relative standard deviation (% RSD) and the accuracy was calculated as the deviation of the mean from the nominal concentration for macrocyclic compounds. The obtained validation parameters for the developed FASI-HIEKC method are summarized in Table 1. The precision and accuracy results showed acceptable values for both intra- and inter-day tests for all analytes.

Moreover, the electrophoretic repeatability of the elaborated method was determined as the RSD of peak areas and migration times calculated for 10 replicate EKI analyses of a standard sample (at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for each drug). Despite the use of EKI, characterized by a lower reproducibility of results than HDI, values lower than

2.7% for peak areas (data not shown) and lower than 4.1% for migration times were obtained (Table 1). Likewise, the fused-silica capillary with optimized separation parameters showed relatively high stability since no significant changes such as migration time or capillary back-pressure were found over the few weeks during the assay. In all the examined electrophoretic conditions the selectivity and performance of the method were unchanged, which proves also the robustness of the proposed method.

3.7. Real samples

The developed FASI-HIEKC method was applied for the determination of spiramycin in “Rovamycine” -coated tablets containing 1.5 mln IU (500 mg) of the active substance (Sanofi-Aventis, Gentilly, France). The content of spiramycin in the tested tablets ranged from 92.0 to 103.8% of the declared value by the manufacturer (n = 6). The precision and accuracy of the method, obtained during the analysis of real pharmaceutical samples, were in the range of 5.9–12.5% and 85.0–109.8%, respectively.

In summary, all macrocyclic drugs were well separated under the presented electrophoretic conditions and the peaks were symmetrical and completely resolved one from another. No interference was observed during the electrophoretic run of the samples at migration times where drugs peaks appear.

4. Conclusion

The present work has demonstrated that the CE separation of hydrophobic compounds using a surfactant (at a concentration below its CMC) as a component of the sample matrix may be employed for the accurate and reliable determination of macrocyclic antibiotics. With a modification of the acetonitrile-phosphate

separation buffer system, the separation conditions may be stabilized and the need for the frequent regeneration of the capillary can be eliminated.

It can be stated that the EKI-based method with the HIEKC mechanism presented in this paper is innovative because EKI can be successfully accomplished for hydrophilic, organic molecules, followed by electrophoretic separation. Moreover, it is the first documented and successful attempt to implement on-line pre-concentration of analytes in the capillary using the FASI-HIEKC technique. When analyte molecules are dissolved in the sample medium (3.5 mM SDS and 10% (v/v) ACN-water mixture), they undergo a solvophobic interaction with the anionic surfactant (SDS-) ion, forming a negatively charged complex species that can migrate in an electric field. The presented technique can be easily implemented for hydrophobic analytes, and the proposed separation system may be an attractive high speed alternative in comparison to existing methods in quality control and for screening tests of macrocyclic antibiotics.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The work was supported by the National Center for Research and Development in Poland within the V4-Korea Joint Research Program, project MTB No. DZP/V4-Korea-I/20/2018.

References

- [1] M. Zrncic, S. Babic, D.M. Pavlovic, Determination of thermodynamic pK(a) values of pharmaceuticals from five different groups using capillary electrophoresis, *J. Separ. Sci.* 38 (2015) 1232–1239.
- [2] A. Anadon, L. Reeve-Johnson, Macrolide antibiotics, drug interactions and microsomal enzymes: implications for veterinary medicine, *Res. Vet. Sci.* 66 (1999) 197–203.
- [3] C.L. Flurer, Analysis of macrolide antibiotics by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 17 (1996) 359–366.
- [4] R. Gonzalez-Hernandez, Y.M. Li, A. Van Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, Analysis of spiramycin by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 20 (1999) 2407–2411.
- [5] K. Tobback, Y.M. Li, N.A. Pizarro, I. De Smedt, T. Smeets, A. Van Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, Micellar electrokinetic capillary chromatography of macrolide antibiotics - separation of tylosin, erythromycin and their related substances, *J. Chromatogr. A* 857 (1999) 313–320.
- [6] W. Buchberger, M. Ferdig, R. Sommer, D.T.V. Thuy, Trace analysis of rapamycin in human blood by micellar electrokinetic chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 68–71.
- [7] J.K. Zhou, Y. Chen, R. Cassidy, Separation and determination of the macrolide antibiotics (erythromycin, spiramycin and oleandomycin) by capillary electrophoresis coupled with fast reductive voltammetric detection, *Electrophoresis* 21 (2000) 1349–1353.
- [8] H. Berrada, J.C. Molto, J. Manes, G. Font, Determination of aminoglycoside and macrolide antibiotics in meat by pressurized liquid extraction and LC-ESI-MS, *J. Separ. Sci.* 33 (2010) 522–529.
- [9] L.R. Guidi, F.A. Santos, A. Ribeiro, C. Fernandes, L.H.M. Silva, M.B.A. Gloria, A simple, fast and sensitive screening LC-ESI-MS/MS method for antibiotics in fish, *Talanta* 163 (2017) 85–93.
- [10] C.L. Flurer, Analysis of antibiotics by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 22 (2001) 4249–4261.
- [11] C.L. Flurer, Analysis of antibiotics by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 20 (1999) 3269–3279.
- [12] T.A. McGlinchey, P.A. Rafter, F. Regan, G.P. McMahon, A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices, *Anal. Chim. Acta* 624 (2008) 1–15.
- [13] I. Kanfer, M.F. Skinner, R.B. Walker, Analysis of macrolide antibiotics, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 255–286.
- [14] Y.P. Hong, W.Y. Guo, G.-H. Chen, J.-W. Zhou, X.-M. Zou, X. Liao, T. Hou, Determination of five macrolide antibiotic residues in milk by micellar electrokinetic capillary chromatography with field amplified sample stacking, *J. Food Saf.* 38 (2018) e12382, <https://doi.org/10.1111/jfs.12382>.
- [15] Y. Walbroehl, J.W. Jorgenson, Capillary zone electrophoresis of neutral organic-molecules by solvophobic association with tetraalkylammonium ion, *Anal. Chem.* 58 (1986) 479–481.
- [16] J. Paesen, P. Claeys, E. Roets, J. Hoogmartens, Evaluation of silanol-deactivated silica-based reversed phases for liquid-chromatography of erythromycin, *J. Chromatogr., A* 630 (1993) 117–122.
- [17] A.K. Laloo, S.C. Chattaraj, I. Kanfer, Development of a capillary electrophoretic method for the separation of the macrolide antibiotics, erythromycin, josamycin and oleandomycin, *J. Chromatogr. B* 704 (1997) 333–341.
- [18] E.S. Ahuja, J.P. Foley, Separation of very hydrophobic compounds by hydrophobic interaction electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A* 680 (1994) 73–83.
- [19] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, T. Tilander, Separation of fat-soluble vitamins by hydrophobic interaction electrokinetic chromatography with tetracylammonium ions as pseudostationary phase, *J. Chromatogr. A* 807 (1998) 285–295.
- [20] C. Schwer, E. Kennler, Electrophoresis in fused-silica capillaries - the influence of organic-solvents on the electroosmotic Velocity and the zeta-potential, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1801–1807.
- [21] R.A. Perez, B. Albero, M. Ferriz, J.L. Tadeo, Analysis of macrolide antibiotics in water by magnetic solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 146 (2017) 79–85.
- [22] I. Senta, I. Krizman-Matic, S. Terzic, M. Ahel, Comprehensive determination of macrolide antibiotics, their synthesis intermediates and transformation products in wastewater effluents and ambient waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (vol 1509, pg 60, 2017), *J. Chromatogr. A* 1521 (2017), 167–167.
- [23] X.Q. Song, T. Zhou, Q.Y. Liu, M.Y. Zhang, C.Y. Meng, J.F. Li, L.M. He, Molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of ten macrolide drugs residues in animal muscles by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 208 (2016) 169–176.
- [24] X.Q. Song, T. Zhou, J.F. Li, Y.J. Su, J.M. Xie, L.M. He, Determination of macrolide antibiotics residues in pork using molecularly imprinted dispersive solid-phase extraction coupled with LC-MS/MS, *J. Separ. Sci.* 41 (2018) 1138–1148.
- [25] Guideline on Bioanalytical Method Validation, European Medicines Agency, 2011. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, Committee for Medical Products for Human Use (CHMP), http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientificguideline/2011/08/WC500109686.pdf (accessed 2013).
- [26] Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM), 2001. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf> (accessed 2013).



Combination of large volume sample stacking with polarity switching and cyclodextrin electrokinetic chromatography (LVSS-PS-CDEKC) for the determination of selected preservatives in pharmaceuticals

Michał Pieckowski, Piotr Kowalski*, Tomasz Bączek

Department of Pharmaceutical Chemistry, Medical University of Gdańsk, Hallera 107, 80-416, Gdańsk, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

On-line preconcentration techniques
Large volume sample stacking
Preservative quantification
Highly-sulfated cyclodextrin
Electrokinetic chromatography
Quality control of pharmaceuticals

ABSTRACT

In this study, a large volume sample stacking (LVSS) with polarity switching (PS) and cyclodextrin electrokinetic chromatography (CDEKC) method has been developed for the simultaneous separation and determination of 8 preservatives: methylparaben (MP), ethylparaben (EP), propylparaben (PP), butylparaben (BP), isobutylparaben (IBP), sorbic acid (SA), benzoic acid (BA), p-hydroxybenzoic acid (PHBA) in pharmaceuticals. The effects of some typical parameters such as sample volume, applied voltage, composition and pH of the running buffer and organic modifier concentration were examined and optimized. Moreover, the impact of type and concentration of cyclodextrin as electrolyte modifiers was also investigated. The detection limits of analytes for the elaborated LVSS-PS-CDEKC method were found to be in 0.8–5 ng mL⁻¹ range, which were around 500 times lower than normal CDEKC without preconcentration technique. All analytes were completely resolved in less than 11 min in an uncoated fused-silica capillary of 75 μm internal diameter (I.D) x 50 cm length. The electrophoretic separation was performed in a 2 mM α-cyclodextrin and 25 mM tetraborate system (pH = 9.3) with an applied voltage of 25 kV. The established method was validated and confirmed to be applicable for the determination of the preservatives in a quality control of pharmaceuticals.

1. Introduction

Currently, preservatives are still the most common protection against the development of microorganisms in pharmaceuticals. Bacteriostatic substances are added to non-sterilized medicines to prevent reproduction of fungi and bacteria, while those, which exert bactericidal effect, are used in sterile preparations. A chemical compound, in order to become a preservative, must meet certain requirements established from the point of view of the patient's safety and maintaining the proper quality of the drug [1]. The acceptable daily intake (ADI), determined by the Joint FAO/WHO Expert Committee, are 0–10, 0–10, 0–25, 0–5 mg kg⁻¹ body mass for MP, EP, SA and BA respectively [2]. For PP and BP, only external use is permitted at the sum of their individual concentrations does not exceed 0.19% [3]. The wider spectrum of preservatives is often achieved by using a combination of them, which their potential for bacterial inhibition is greater than that of separate substances [4]. Such application requires specific separation methods that will allow the determination of preservatives from various chemical groups. Several methods have been developed to meet such requirements, but they lack on low detection limits [5–8], separation of

isomeric parabens [9–14] or long analysis time [12–15]. Cheng et al. [15] obtained the separation of BP and IBP, however their results are questionable, since there is no electropherogram indicating the effect of changing sodium dodecyl sulfate (SDS) concentration on analyte separation. Moreover, there is no data on the repeatability of the method, which can raise many questions regarding to the complete separation of all analytes. Although on-line preconcentration methods have been developed in literature to determine parabens in cosmetic products and environmental samples, they have not been used for the quantification in pharmaceutical formulations. The comparison of selected parameters methods with LVSS for preservatives has been collected in Table 1.

To overcome these problems, the separation of 8 preservatives using CDEKC with LVSS and PS is described in this paper for the first time. The principles of the proposed LVSS with PS are shown in Fig. 1. Moreover, the effect of highly-sulfated cyclodextrins on the electrophoretic separation of analytes was also investigated and discussed as well as an additional stacking effect in the form of dynamic pH-junction were described. The elaborated LVSS-PS-CDEKC method has been applied for the determination of parabens and acidic preservatives (BA, SA and PHBA) in liquid forms of pharmaceuticals.

* Corresponding author.

E-mail address: piotr.kowalski@gumed.edu.pl (P. Kowalski).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120673>

Received 18 October 2019; Received in revised form 19 December 2019; Accepted 22 December 2019

Available online 25 December 2019

0039-9140/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1

Comparison of crucial parameters for the prior elaborated methods and the present work with using LVSS as on-line preconcentration technique.

Method	Analyte	LOD (ng mL ⁻¹)	Separation time (min)	Reference
LVSS-MEKC	MP, EP, PP, BP	41–54	< 7	11
LVSS-NACE	MP, EP, PP, BP, BZP, PHBA	0.7–2.1	< 25	12
LVSS-CZE	MP, EP, PP, BP	2	< 27	13
SPE-LVSS-NACE	MP, EP, PP, BP, BZP, PHBA	0.025–0.031	< 21	14
LVSEP-Sweeping	MP, EP, PP, BP, IBP, PHBA, DAH, SAA, SA, BA	5–2000	< 35	15
LVSS-PS-CDEKC	MP, EP, PP, BP, IBP, SA, BA, PHBA	0.8–5	< 11	This work

MEKC – micellar electrokinetic chromatography, NACE – nonaqueous capillary electrophoresis, CZE – capillary zone electrophoresis, SPE – solid phase extraction, LVSEP – large volume sample stacking with electroosmotic pump, BZP – benzyl parahydroxybenzoate, SAA – salicylic acid, DAH – dehydroacetic acid.

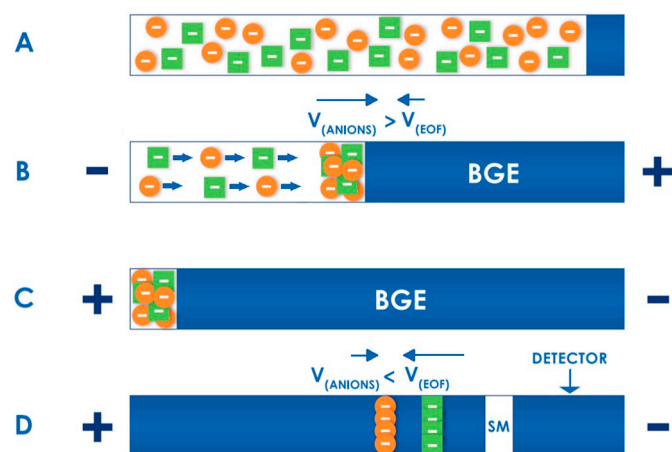


Fig. 1. LVSS with anodic polarity switching mechanism. (A) Initial situation: the sample matrix with low conductivity is hydrodynamically injected into the capillary until the sample volume reaches 90–100% capillary capacity. (B) After filling the capillary a (relatively low) voltage is applied in reverse polarity mode to remove the sample matrix (SM) and focusing the analytes. (C) When the current reaches 90–99% of its value, the capillary is filled almost only with buffer and the anions from the previously injected sample are completely concentrated at the inlet end of the capillary. Next, the polarity of the electrodes is switched and the EOF is directed towards the detector. (D) Focused analytes are separated in accordance with the principles of the CZE technique.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

HPLC-grade methanol and all preservatives (methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, isobutylparaben, sorbic acid, benzoic acid, p-hydroxybenzoic acid) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tetraborate sodium, α -cyclodextrin used to prepare the tested separation buffers, were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Highly sulfated- α -cyclodextrin (HS- α -CD) and highly sulfated- β -cyclodextrin (HS- β -CD) were purchased from AB SCIEX (Foster City, CA, USA). Highly pure water (distilled and deionized) was obtained from Milli-Q equipment (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Preservatives standard solutions

Individual stock solutions of analytes at a concentration of 1 mg mL⁻¹ were prepared in pure methanol and stored at –20 °C. Mixed standard and working solutions were freshly prepared at each working session from the stock solutions by proper dilution with methanol and water, so final concentration of methanol was 15% (v v⁻¹) to prevent precipitation of the analytes. All working solutions were stored at 4 °C in dark containers for 48 h.

2.3. CE instrument

The electrophoretic separations were conducted on a PACE/MDQ capillary electrophoresis system (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) equipped with a diode array detector (DAD) and controlled with 32 Karat 8.0 software. Uncoated fused-silica capillaries (Polymicro Technology) with an I.D. of 75 μ m and 50 cm total length (40 cm length to the detector) were used for method development. The capillary temperature was controlled at 25.0 (\pm 0.1) °C during all experiments. Samples were injected hydrodynamically (80 s, 2 psi) filling approximately 90% of the total capillary volume. Sample matrix removal was under reverse polarity mode (applied voltage –10 kV, 3.15 min). After reaching 95% of the current, the polarity of the electrodes switched and, the proper electrophoretic separation occurred under 25 kV applied voltage. Employment of the DAD detector enabled the determination of analytes at various analytical wavelengths in one run, namely for EP, BA and PHBA were 195 nm, for MP, PP, BP, IBP were 296 nm, and for SA was 254 nm. To ensure good reproducibility of all analyses, the new capillary was conditioned with 1 M NaOH (10 min), deionized water (10 min) and with the separation buffer for 10 min prior to use. Between each run, the capillary was washed with 0.1 M NaOH (2 min), deionized water (2 min) and finally with the separation buffer for 2 min. The pH values of the separation buffer and other solutions were measured using a pH-meter (Beckman Coulter, CA, USA). The separation was performed in 25 mM tetraborate and 2 mM α -cyclodextrin buffer system prepared from stock solution of 0.1 M tetraborate sodium and 20 mM α -cyclodextrin.

3. Results and discussion

3.1. The effects of highly-sulfated cyclodextrin on the separation of the analytes

Because of micellar electrokinetic chromatography with using SDS as a component of the pseudostationary phase does not allow satisfactory results in the separation of isomeric parabens, we decided to try their electrophoretic determination using a buffer containing both highly-sulfated and unmodified cyclodextrins. Preliminary test proved that at lower concentrations of SDS in BGE, the separation between non-isomeric analogues was not obtained. This is through to the fact that the esters of p-hydroxybenzoic acid differ from one another in the homologous series by one methylene (-CH₂) group only. To ensure complete separation of 8 preservatives, the effect of the addition of highly-sulfated cyclodextrins to the BGE on the electrophoretic resolution has been investigated. Figs. 2 and 3 show electropherograms of increasing concentrations of HS- α - and HS- β -cyclodextrins as a component of running buffer respectively. Full separation of all analytes was obtained using HS- α -CD at a concentration of 1.0% in 25 mM sodium tetraborate. Moreover, we observed that increasing concentration levels of HS- α -CD affects migration times of acidic analytes (BA, SA and PHBA), while velocities of all parabens have almost remained without change. Peak of benzoic acid at different concentration of HS- α -CD showed the largest difference in migration time, which could be due to its strongest interaction with HS- α -CD. These velocity dissimilarities between parabens and acid preservatives result from different pKa values that are below 5.0 for BA, SA and PHBA, and about 8.4 for

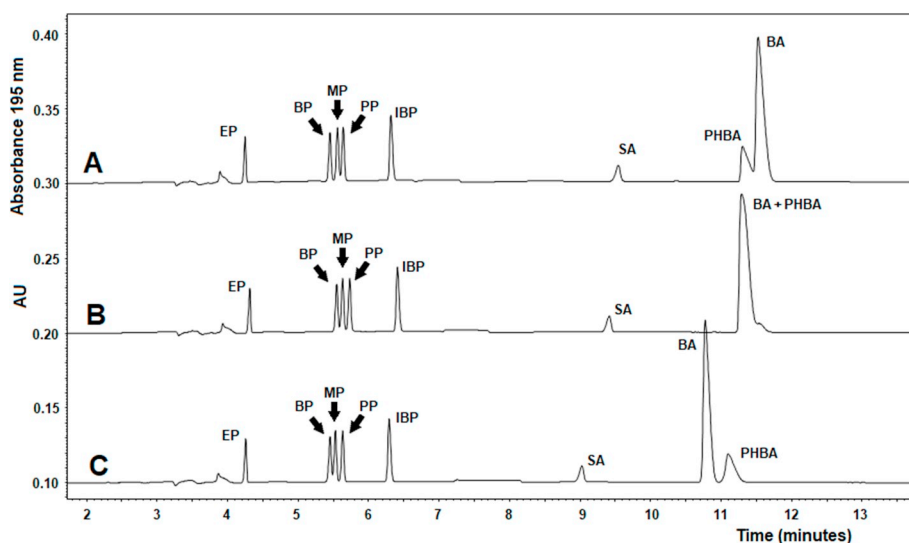


Fig. 2. Effect of the different concentration of HS- α -CD (A - 1.4%, B - 1.2%, C - 1.1%) in 25 mM tetraborate as the background buffer on resolution of analytes. Each sample containing: EP - ethyl parahydroxybenzoate, BP - buthyl parahydroxybenzoate, MP - methyl parahydroxybenzoate, IB - isobutyl parahydroxybenzoate, PP - propyl parahydroxybenzoate, SA - sorbic acid, PHBA - parahydroxybenzoic acid, BA - benzoic acid at concentration of $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 15% methanol, Detection UV = 195 nm. Uncoated fused silica capillary I.D. 75 μm , length 50 cm, applied voltage 25 kV, sample injection: 80 s, 2 psi.

parabens. In the running buffer at pH above 9.0 the acidic compounds are completely dissociated, while the parabens at these circumstances are poorly ionized. This finding suggests that the main factor separating the esters of p-hydroxybenzoic acid was the hydrophobic interaction between the HS- α -CD core and the lipophilic part of the parabens. On the other hand, unlike the parabens, acid analytes formed complexes with HS- α -CD as a result of repulsion between cyclodextrins sulfate groups and the negative charge of the acidic preservatives, whereby hydrophobic bonds with the cyclodextrin core were preferred.

Another situation occurred with the use of HS- β -CD in BGE, where the migration times of all preservatives with the increasing concentration of HS- β -CD were increased. However, it was not possible to obtain a full separation between MP, BP and IBP. This problem was caused by larger cavity of HS- β -CD and the inability to create inclusion complexes between hydrophobic core of CD and parabens.

Although Kuo K.-L. et al. [16] have already studied non-sulfated α -CD and β -CD in terms of the separation of preservatives, in our study the effect of preconcentration of non-sulfated α -CD and HS- α -CD as a running buffer component was compared. Moreover, using the LVSS method, much higher and sharper peaks with a buffer containing 2 mM α -CD than with HS- α -CD were obtained. Likewise, the LOD values of analytes were up to about 500 times lower than the electrophoretic

method with HDI used by Kuo, K.-L. et al. The comparison is shown in Fig. 4.

3.2. The effects of the pH value of the buffer on the separation

As already mentioned, acidic preservatives (BA, SA and PHBA) at the basic pH circumstances are completely dissociated, whereas parabens with pKa values of about 8.4 will have a weak negative charge located on the oxygen atom of the p-OH group. The effect of buffer pH in the range of 7–10.5 on the resolution of separation and intensity of analyte peaks was tested. Both at pH of the BGE higher than 10 and lower than 8, the complete separation of parabens was not achieved and peaks of analytes significantly lost in height and sharpness for all preservatives. It was observed, when the pH of the BGE was closer to the pH of the sample matrix, that the signal was relatively lower. However, the best results were obtained at pH of the BGE = 9.3 and when the sample matrix pH was neutral (pH = 7.0). Under neutral sample circumstances, the acids were poorly dissociated. This relation results from an additional mechanism of preconcentration of the dynamic pH junction. In the basic separation buffer, the acidic compounds were strongly ionized and with negative charge, their direction of migration was towards against the EOF. This situation caused

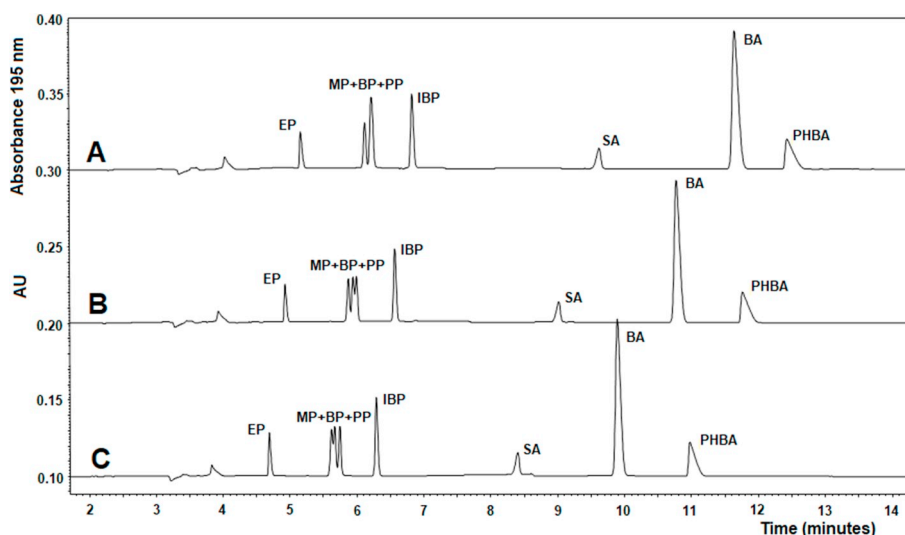


Fig. 3. Effect of the different concentration of HS- β -CD (A - 1.2%, B - 1.0%, C - 0.8%) in 25 mM tetraborate as the background buffer on the resolution. Concentration of each analyte $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 15% methanol, detection UV = 195 nm. Other parameters the same as Fig. 2.

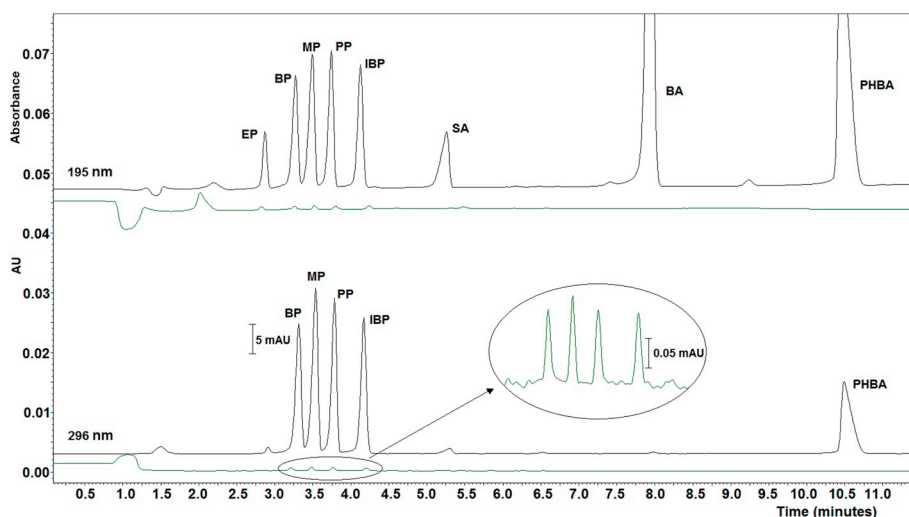


Fig. 4. Impact of the LVSS-PS on-line pre-concentration method on the signal enhancement effect, BGE: 2 mM α -CD, 25 mM sodium tetraborate, sample matrix: 15% methanol, concentration each of analytes: 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. DAD, analytical wavelengths: 195 and 296 nm. A – LVSS-PS-CDEKC method, B – Standard CDEKC method with hydrodynamic injection, 5 s inj, 0.5 psi.

Table 2

Validation parameters for proposed LVSS-PS-CDEKC method, migration time of analytes and sensitive enhancement factor (SEF).

Parameter	EP	BP	MP	PP	IB	SA	BA	PHBA
Calibration range ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a	0.5–0.025	0.5–0.015	0.5–0.015	0.5–0.015	0.5–0.015	0.5–0.010	0.5–0.010	0.5–0.010
Linearity (r^2)	0.9991	0.9989	0.9997	0.9992	0.9981	0.9982	0.9983	0.9998
Slope (L mg^{-1})	0.9896	1.0508	0.9576	0.9913	0.9968	0.9942	1.0144	0.9498
Intercept	1.1631	2.6745	3.4121	2.7711	0.05	2.2006	1.5632	3.4472
T_m (min) ^b	3.431	3.591	3.678	3.778	3.921	4.407	5.407	6.376
T_m RSD (%)	0.23	0.33	0.26	0.25	0.26	0.33	0.13	0.22
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.005	0.004	0.003	0.004	0.004	0.001	0.0008	0.001
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.015	0.012	0.010	0.012	0.012	0.005	0.003	0.005
SEF ^c	440	335	430	330	333	490	500	460

^a ($n = 9$).

^b ($n = 7$).

^c According to the standard CDEKC method, 5 s inj., 0.5 psi.

preconcentration of acidic analytes at the border of SM/BGE. This phenomenon is confirmed by the lower detection limits for SA, PHBA and BA in relation to parabens.

3.3. The effects of concentration of organic modifier in the sample matrix

Due to the very poor solubility of the analytes in water, various types of organic solvents such as acetonitrile, methanol, ethanol and their mixtures with water have been tested. The optimal results were obtained with a content of not less than 15% methanol in aqueous solution of the sample matrix. When we maintained a constant concentration of 15% methanol in samples, none of the analytes precipitated, at the same time it allowed to obtain a stable current during all electrophoretic separations.

3.4. LVSS with polarity switching procedure

LVSS with anodic polarity switching must achieve two primary conditions: analytes have to be in anionic form and their migration velocity in the sample matrix must be higher than the velocity of electroosmotic flow in BGE [17]. The stacking mechanism is described in Fig. 1. In this study the effects of anodic stacking voltage and hydrodynamic injection volume on the peaks intensity was examined. The sharpest peaks were obtained using -10 kV of applied voltage during

removal of the sample matrix, higher voltage resulted in the loss of analytes and signal blur. The injection volume was investigated in the range of 50–100% of the total capillary volume, signal intensity increased until 87% capacity of capillary, resulting in 2 psi (ca. 13.8 kPa) and 80 s injection, further increasing volume injection resulted in a loss of peak sharpness.

3.5. Validation study

The performance parameters for the developed LVSS-PS-CDEKC method was validated according to ICH guidelines [18] and they are shown in Tables 2 and 3. The linearity of the method was tested for the concentration range of 10–500 ng mL^{-1} for SA, BA, PHBA, 15–500 ng mL^{-1} for MP, PP, BP, IBP and 25–500 ng mL^{-1} for EP using standards solutions. Satisfactory determination coefficients were obtained and were higher than ($r^2 = 0.997$) for all compounds of interest. The LOQ was calculated based on a signal-to-noise ratio (S/N) of 10 : 1, whereas the LOD based on a S/N of 3:1 and as it was earlier mentioned, the LOD range was 0.8–5 ng L^{-1} , while the LOQ range was 3–16 ng L^{-1} , values which are considered very low for the CE-UV technique. An intra-day and inter-day precision and accuracy study was carried out with tested quality control (QC) samples at levels of 25, 100, 500 ng mL^{-1} respectively, which were prepared with standard solutions of each analyzed drug. The estimated intra-day precision values

Table 3
Precision and accuracy data of selected preservatives by the proposal LVSS-PS-CDEKC method.

Analyte	Nominal concentration (ng mL ⁻¹)	Intraday (n = 9)			Interday (n = 9)		
		Measured concentration (ng mL ⁻¹) ± SD	Precision RSD (%)	Accuracy (%)	Measured concentration (ng mL ⁻¹) ± SD	Precision RSD (%)	Accuracy (%)
EP	25	25.5 ± 0.6	2.35	102	25.9 ± 2.0	7.72	103.6
	100	101.9 ± 1.9	1.86	101.9	97.7 ± 4.0	4.09	97.7
	500	496 ± 7.2	1.45	99.2	517.2 ± 23.3	4.51	103.4
BP	25	25.3 ± 0.7	2.77	101.2	25.8 ± 2.2	8.53	103.2
	100	99.1 ± 1.7	1.72	99.1	97.1 ± 5.5	5.66	97.1
	500	488.3 ± 4.5	0.92	97.7	523.7 ± 17.9	3.42	104.7
MP	25	25.2 ± 1.0	3.97	100.8	25.5 ± 2.0	7.84	102
	100	100.9 ± 2.1	2.08	100.9	101.2 ± 6.9	6.82	101.2
	500	491.6 ± 5.8	1.18	98.3	479.8 ± 26.4	5.50	96
PP	25	25.7 ± 0.9	3.50	102.8	26.3 ± 2.3	8.75	105.2
	100	99.3 ± 1.8	1.81	99.3	102.7 ± 4.4	4.28	102.7
	500	494.9 ± 4.1	0.83	99	466.2 ± 20.2	4.33	93.2
IBP	25	24.5 ± 0.7	2.86	98	24.1 ± 1.5	6.22	96.4
	100	102.2 ± 1.8	1.76	102.2	103.7 ± 5.8	5.59	103.7
	500	504.6 ± 6.1	1.21	100.9	490.1 ± 20.8	4.24	98.0
SA	25	24.6 ± 0.8	3.25	98.4	24.4 ± 1.8	7.38	97.6
	100	101.9 ± 2.0	1.96	101.9	102.9 ± 5.4	5.25	102.9
	500	493.5 ± 6.8	1.38	98.7	485.0 ± 19.3	3.98	97
BA	25	25.8 ± 1.0	3.88	103.2	25.9 ± 2.0	7.72	103.6
	100	99.3 ± 3.0	3.02	99.3	98.2 ± 6.0	6.11	98.2
	500	503.5 ± 6.4	1.27	100.7	505.8 ± 16.2	3.20	101.16
PHBA	25	24.4 ± 0.8	3.28	97.6	23.9 ± 1.9	7.95	95.6
	100	101.6 ± 2.1	2.07	102.6	103.9 ± 6.7	6.45	103.9
	500	492.3 ± 6.5	1.32	98.5	511.0 ± 19.3	3.78	102.2

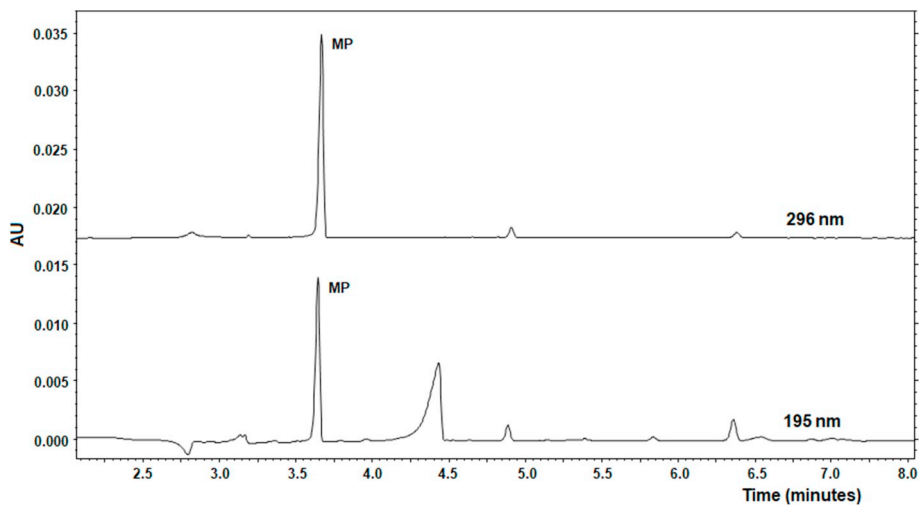


Fig. 5. Electropherogram of samples from antitussive syrup containing methyl parahydroxybenzoate as preservative. DAD at different wavelengths: 296 and 195 nm. BGE: 2 mM α -CD and 25 mM tetraborate sodium, pH = 9.3. Other parameters the same as Fig. 2.

Table 4
The results of the determination of selected parabens in the analyzed forms of drugs.

Drug sample (Active ingredient)	Preservative	Concentration (%)	RSD (%) ^a
Syrup (ambroxol hydrochloride)	MP	0.19 ± 0.0021	1.10
Syrup (butamirate citrate)	BA	0.16 ± 0.0023	1.44
Syrup (ketotifen)	MP	0.18 ± 0.0028	1.61
	PP	0.05 ± 0.0005	1.17
Solution (benzylamine hydrochloride)	MP	0.21 ± 0.0026	1.25

^a (n = 6).

were better than 3.97% (n = 9), while the inter-day precision was below 8.75%, with injection on three different days for each solution (n = 9) indicating very good repeatability for the proposed method.

The accuracy for all compounds was acceptable, with recovery values between 97.6 and 102.8% for intra-day accuracy and 93.2–105.2% for inter-day accuracy. Furthermore, in all the examined electrophoretic conditions, the selectivity and performance of the method were unchanged, which proves also the robustness of the proposed method.

3.6. Analyzing preservatives from selected pharmaceuticals

As it was stated earlier, methanol was chosen as the diluent for drug samples, which provided both very good solubility for preservatives and was perfectly mixed with water. For our research we selected samples of four pharmaceuticals: three in the form of syrup and one in the form of a solution. Due to the high sensitivity of the LVSS-CDEKC method, it was not necessary to employ a special sample extraction procedure. We dissolved the drug sample in pure methanol and then the stock solution was diluted with water to 15% of the total methanol

concentration in the sample. To determine the preservatives in the samples, each peak was identified by comparing both the migration times and the wavelength of the standards acquired by a diode-array detector. Also, addition of the standard was employed to confirm the identity of a preservative in the test sample.

Referring to the electropherograms in Fig. 5, the analysis was highly selective and provided a stable baseline with no significant interference. Table 4 summarizes the levels of preservatives recovered from the tested commercial products, estimated using the developed method. All drugs contained preservatives in the declared concentration range, and RSD% values not exceeding 1.61% indicate that the method is highly repeatable.

4. Conclusion

The proposed combination of LVSS with polarity switching and CDEKC method has been proven as an innovative method of pre-concentration for selected preservatives. Improvement in the sensitivity of the LVSS-PS-CDEKC method using a standard UV detector was reasonable and a 330 to 500-fold increase in LOD values for preservatives was observed in the comparison with the traditional electrophoretic method including hydrodynamic injection. The impact of highly-sulfated and unmodified cyclodextrins on the separation of common preservatives was described and discussed. The elaborated method makes it possible to obtain not only the LOD of 0.8–5 ng mL⁻¹, but also allowed separation of isomeric parabens (BP and IBP). Due to the developed method, we could observe additional stacking effect in the form of dynamic pH-junction for three acidic analytes (benzoic, sorbic and p-hydroxybenzoic acids). Moreover, the developed method has been successfully applied for the determination of preservatives in liquid drug forms.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.


Acknowledgment

The work was supported by the National Center for Research and Development in Poland within the V4-Korea Joint Research Program, project MTB No. DZP/V4-Korea-I/20/2018.

References

- [1] G.A. Shabir, Determination of combined p-hydroxy benzoic acid preservatives in a liquid pharmaceutical formulation by HPLC, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 207–213, <https://doi.org/10.1016/j.jpna.2003.07.006>.

- [2] Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) 1956–1997 (first through Forty-Ninth Meetings), FAO & WHO, 1999.
- [3] Scientific Committee on Consumer Safety, SCCS/1348/10 - Opinion on Parabens, (2010), pp. 1–50, <https://doi.org/10.2772/66369>.
- [4] Q. Chen, J. Wang, Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography, *J. Chromatogr., A* 937 (2001) 57–64, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01306-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01306-1).
- [5] M. Jaworska, Z. Szulińska, M. Wilk, Application of a capillary electrophoresis method for simultaneous determination of preservatives in pharmaceutical formulations, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 137–143, <https://doi.org/10.1002/jssc.200401785>.
- [6] B. Sun, L. Qi, M. Wang, Determination of preservatives in soft drinks by capillary electrophoresis with ionic liquids as the electrolyte additives, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 2248–2252, <https://doi.org/10.1002/jssc.201400444>.
- [7] J.-Q. Huang, C.-C. Hu, T.-C. Chiu, Determination of seven preservatives in cosmetic products by micellar electrokinetic chromatography, *Int. J. Cosmet. Sci.* 35 (2013) 346–353, <https://doi.org/10.1111/ics.12040>.
- [8] I. Baranowska, I. Wojciechowska, The determination of preservatives in cosmetics and environmental waters by HPLC, *Pol. J. Environ. Stud.* 22 (2013) 1609–1625.
- [9] I.-C. Tsai, C.-Y. Su, C.-C. Hu, T.-C. Chiu, Simultaneous determination of whitening agents and parabens in cosmetic products by capillary electrophoresis with on-line sweeping enhancement, *Anal. Methods* 6 (2014) 7615–7620, <https://doi.org/10.1039/C4AY00985A>.
- [10] S.-H. Hsu, C.-C. Hu, T.-C. Chiu, Online dynamic pH junction-sweeping for the determination of benzoic and sorbic acids in food products by capillary electrophoresis, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 635–641, <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7481-1>.
- [11] S. He, Y. Zhao, Z. Zhu, H. Liu, M. Li, Y. Shao, Q. Zhuang, Comparative study for the analysis of parabens by micellar electrokinetic capillary chromatography with and without large-volume sample stacking technique, *Talanta* 69 (2006) 166–171, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.09.018>.
- [12] E. Blanco, M. del C. Casais, M. del C. Mejuto, R. Cela, Simultaneous determination of p-hydroxybenzoic acid and parabens by capillary electrophoresis with improved sensitivity in nonaqueous media, *Electrophoresis* 29 (2008) 3229–3238, <https://doi.org/10.1002/elps.200700916>.
- [13] I. Maijón, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, Different strategies for the pre-concentration and separation of parabens by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 34 (2013) 363–373, <https://doi.org/10.1002/elps.201200147>.
- [14] E. Blanco, M. del C. Casais, M. del C. Mejuto, R. Cela, Combination of off-line solid-phase extraction and on-column sample stacking for sensitive determination of parabens and p-hydroxybenzoic acid in waters by non-aqueous capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta* 647 (2009) 104–111, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.05.024>.
- [15] Y.-C. Cheng, C.-C. Wang, Y.-L. Chen, S.-M. Wu, Large volume sample stacking with EOF and sweeping in CE for determination of common preservatives in cosmetic products by chemometric experimental design, *Electrophoresis* 33 (2012) 1443–1448, <https://doi.org/10.1002/elps.201100546>.
- [16] K.-L. Kuo, Y.-Z. Hsieh, Determination of preservatives in food products by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis with multiwavelength detection, *J. Chromatogr., A* 768 (1997) 334–341, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00040-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00040-X).
- [17] J.P. Quirino, S. Terabe, Sample stacking of cationic and anionic analytes in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr., A* 902 (2000) 119–135, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00812-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00812-8).
- [18] ICH Topic Q 2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, (1995) CPMP/ICH/381/95 https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf.

Michał Pieckowski
 Piotr Kowalski 
 Ilona Ołędzka
 Natalia Miękus-Purwin
 Alina Plenis
 Anna Roszkowska
 Tomasz Bączek

Department of Pharmaceutical
 Chemistry, Medical University of
 Gdańsk, Gdańsk, Poland

Received August 17, 2021
 Revised September 17, 2021
 Accepted September 30, 2021

Research Article

Simultaneous determination of mitotane, its metabolite, and five steroid hormones in urine samples by capillary electrophoresis using β -CD₂SDS₁ complexes as hydrophobic compounds solubilizers

Mitotane is a cytotoxic drug used in the treatment of inoperable adrenocortical carcinoma, it inhibits steroidogenesis as well, and therefore monitoring the level of steroid hormones in patients treated with mitotane is a crucial point of therapy. Hence, we have developed a simple, fast, and efficient electrophoretic method combined with reverse polarity sweeping as online preconcentration technique and dispersive liquid–liquid microextraction for the simultaneous determination of mitotane, its main metabolite DDA, and five steroid hormones (progesterone, testosterone, epitestosterone, cortisol, and corticosterone) in urine samples. In addition, a new sample matrix consisting of β -CD₂SDS₁ complexes for a high hydrophobic compounds solubilization was developed. Approach based on the application of β -cyclodextrin and SDS complex of a ratio 2:1 allowed for hydrodynamic injection into the capillary of a solution containing both mitotane and other analytes. The detection limits of the analytes for the reverse polarity sweeping–dispersive liquid–liquid microextraction method were found to be in the range of 1.5–3 ng/mL, which were approximately 1000 times lower than in the conventional hydrodynamic injection (5 s, 0.5 psi) without any preconcentration procedure. All analytes were completely resolved in less than 13 min by uncoated silica capillary with an inner diameter of 75 μ m (ID) \times 60 cm. Electrophoretic separation was performed in reverse polarity with a voltage of –25 kV with a background electrolyte (BGE) consisting of 100 mM SDS, 25% ACN, 25 mM phosphate buffer (pH 2.5), and 7 mM β -cyclodextrin.

Keywords:

Adrenocortical carcinoma / β -Cyclodextrin / Dispersive liquid–liquid microextraction / Hydrophobic compounds solubilization / Online preconcentration techniques / Sweeping
 DOI 10.1002/elps.202100250

1 Introduction

Majority of adrenal cortex carcinomas (ACC) are characterized by excess hormone secretion (60% of all cases) [1]. Among tumors with hormonal activity, the most frequent is the excessive secretion of cortisol (50–80%), however there are cases of excessive secretion of androgens (40–60%) and estrogens (6–10%). Control of the secretion of both cortisol and testosterone should be implemented in every patient with ACC, moreover 24 h urinary free cortisol is recommended hormonal evaluation in patients with suspected ACC. Measurement of the concentrations of other steroid hormones

is optional, however, their elevated values may be considered as markers for the use of additional hormone inhibitors or for tumor recurrence [2,3]. Mitotane (1-(2-chlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane, *o*, *p*"-DDD) is a chlorinated bicyclic aromatic compound used in the treatment of inoperable adrenal cortex cancer and to reduce the risk of recurrence and metastasis after tumor resection. The mechanism of action of mitotane is based on both anti-neoplastic and anti-hormonal activity; however, the cytotoxic effect of mitotane has not been entirely known [1]. Mitotane influences steroidogenesis as well as the metabolism of adrenal cortex hormones by inhibiting such enzymes as 20,22-desmolase, 11 β -hydroxylase, or 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase [4]. Such an extensive effect on the endocrine system requires the monitoring of steroid levels in patients treated with mitotane [5]. Several methods for the determination of mitotane have already been developed using HPLC

Correspondence: Professor Piotr Kowalski, Department of Pharmaceutical Chemistry, Medical University of Gdańsk, Hallera 107, 80-416 Gdańsk, Poland
E-mail: piotr.kowalski@gumed.edu.pl

Abbreviations: ACC, adrenocortical carcinoma; DLLME, dispersive liquid–liquid microextraction; IS, internal standard; RP, reverse polarity; SM, sample matrix; β -CD, β -cyclodextrin

Color online: See article online to view Fig. 1 in color.

Table 1. Comparison of selected methods for determination of the mitotane and its metabolites in biological fluids

Method	Analyte	LOD	LOQ	Matrix	Reference
HPLC-UV	Mitotane, p,p'-DDA, DDE, p,p'-DDD (IS)	–	0.2–0.5 µg/mL	Plasma	[6]
HPLC-UV	DDT, mitotane, DDE, DDA, dieldrin (IS)	0.3 µg/mL	0.5 µg/mL	Plasma, red cells	[7]
HPLC-LLE-UV	Mitotane, DDE, aldrin (IS)	36–102 µg/mL	108–310 µg/mL	Plasma	[8]
HPLC-SPE-DAD	Mitotane, DDE, DDA	0.050–0.132 µg/mL	0.145–0.399 µg/mL	Plasma, red cells, urine	[9]
HPLC-SPE-UV	Mitotane, DDE, DDA, DDT (IS)	0.2 µg/mL	0.4 µg/mL	Plasma	[10]
GC-EI-MS	Mitotane	–	0.25 µg/mL	Plasma	[11]
CE-CD-MEKC-DLLME	Mitotane, DDA, progesterone, testosterone, epitestosterone, corticosterone, cortisol, dexamethasone (IS)	1–3 ng/mL	5–10 ng/mL	Urine	This study

LLE: liquid–liquid extraction; DDE: 2-(2-chlorophenyl)-2-(4-chlorophenyl)-1,1-dichloroethene; DDT: 1,1,1-trichloro-2-(2-chlorophenyl)-2-(4-chlorophenyl)ethane; IS: internal standard.

[6,7], combined with liquid–liquid extraction [8], and SPE [9,10] (see Table 1). Ando et al. developed the determination of mitotane in blood plasma samples by GC in combination with electron ionization-MS [11]. Thus far, electrophoretic method has not been developed for o, p"-DDD and its metabolites; moreover, the simultaneous determination of mitotane and steroid hormones has not been obtained as well. Likewise, there are insufficient data in the literature on the levels of DDD and DDA in patient urine samples. Mornar et al. [9] conducted studies on urine samples of patient treated with 1.5 g of mitotane (500 mg dose taken every 8 h). The detected concentration of mitotane was 710 ng/mL; however, DDA was not present in the urine sample as explained by the lack of mitotane biotransformation. Chen et al. [12] studied DDA concentrations in urine samples in a population exposed to the insecticide 1,1,1-trichloro-2-(2-chlorophenyl)-2-(4-chlorophenyl)ethane, a compound of the same group as mitotane, a bicyclic aromatic chlorinated hydrocarbon, using GC. The concentration of DDA, which is a metabolite of 1,1,1-trichloro-2-(2-chlorophenyl)-2-(4-chlorophenyl)ethane, ranged from 11 to 92 ng/mL in urine samples. For those reasons, this study developed a fast and sensitive dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) of mitotane, its acetic acid metabolite 1,1-(o, p"-dichlorophenyl) (o, p"-DDA), and five steroid hormones (progesterone, testosterone, epitestosterone, cortisol, and corticosterone) from urine samples with electrophoretic separation using UV detection and sweeping as an online preconcentration technique. Moreover, the use of the spontaneous formation of β -CD₂SDS₁ complexes in aqueous solutions and their influence on the solubility of hydrophobic analytes was investigated. Therefore, in this work practically insoluble mitotane was selected as a model of highly hydrophobic drug to study the possibility of online preconcentration in the capillary, in the presence of β -CD₂SDS₁ complexes in the sample matrix. Furthermore, the influence of standard electrophoretic parameters such as sample volume, applied voltage, composition and pH of the separation buffer, and the concentration of the organic modifier were optimized. The impact of SDS concentra-

tion on the potential of the sweeping technique was also examined.

2 Materials and Methods

2.1 Chemicals and reagents

o,p'-DDD (M), DDA, steroids (progesterone [P], testosterone [T], epitestosterone [E], corticosterone [C1], cortisol [C2]), internal standard ([IS], dexamethasone), SDS, urea, uric acid, sodium phosphate monobasic dihydrate (NaH₂PO₄·2H₂O), potassium dihydrogen phosphate anhydrous (KH₂PO₄), and HPLC-grade ACN were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Phosphoric acid (H₃PO₄), sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), and β -cyclodextrin (β -CD) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Highly pure water (distilled and deionized) was obtained from the Milli-Q equipment (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2 Urine samples

In our study, the synthetic urine solution was used for the estimation of validation parameters, dilution integrity, and carry-over; on the other hand, urine collected from healthy volunteers was used for the development of the extraction conditions, as well as selectivity and stability. Synthetic urine solution was prepared by dissolving 3.034 g of urea, 0.042 g of uric acid, 2.0 of NaCl, 0.050 g of KCl, 0.285 g of NaH₂PO₄·2H₂O, and 0.050 g of KH₂PO₄ (anhydrous) in 250 ml of deionized (18.2 M Ω cm) water, and finally adjusted to pH 6.5 by 0.1 M NaOH solution.

2.3 Analytes standard solutions

Individual stock solutions of analytes at a concentration of 2 mg/mL were prepared in pure ACN and stored at –20°C in

dark containers to avoid the decomposition. Standard and working solutions (5, 0.25, 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were freshly prepared at each working session from the stock solutions by proper dilution with pure ACN. All working solutions were stored at 4°C in dark containers for 48 h.

2.4 CE instrument

The electrophoretic separations were conducted on a PACE/MDQ capillary electrophoresis system (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) equipped with a DAD operating at 200 nm, 214, or 248 nm and controlled with 32 Karat 8.0 software. Uncoated fused-silica capillaries (Polymicro Technology) with an id of 75 μm and 60 cm total length (50 cm length to the detector) were used for method development. The capillary temperature was controlled at 25.0 (± 0.1)°C during all experiments. To ensure good reproducibility of analytes, the new capillary was conditioned with 1 M NaOH (10 min), 0.1 M HCl (10 min), and deionized water (10 min), and with the separation buffer for 10 min prior to use. Between each run, the capillary was washed with 0.1 M NaOH (2 min), deionized water (2 min), and finally with the separation buffer for 2 min. The pH values of the separation buffers and other solutions were measured using a pH meter (Beckman Coulter, CA, USA).

2.5 Extraction procedure

In the reverse polarity sweeping (RP-sweeping)-DLLME method, 5 mL of urine samples filtered by Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter with 10.000 NWML membrane were spiked with selected steroid hormones, mitotane, DDA, and an internal standard from working solutions with concentrations of 250 ng/mL and 25 ng/mL. Then, 100 μL of 0.1M HCl was added to the samples and vortexed, next 1100 μL of the dispersion mixture, composed of the mixture of ACN and dichloromethane in the ratio 9:2 (v/v), was rapidly injected to the samples. The cloudy solution was shaken vigorously and centrifuged for 8 min at 4350 rpm. Dichloromethane phase was collected with a Hamilton syringe, transferred to Eppendorf tubes, and evaporated in a vacuum centrifuge to obtain a dry precipitate. The precipitates were dissolved in 10 μL of ACN, and subsequently in the 90 μL sample buffer system, thus the final concentration was 3.5 mM SDS, 7 mM $\beta\text{-CD}$, and 60 mM H_3PO_4 . The prepared samples were centrifuged for 2 min at 14 800 rpm and electrophoretically separated by sweeping procedure.

3 Results and Discussion

3.1 Sample matrix composition

Due to the significant lipophilicity of analytes, in particular mitotane ($\log P = 6.11$) [13], the development of sample

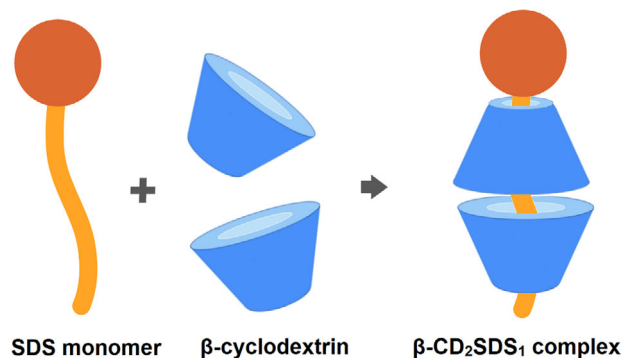


Figure 1. Scheme of spontaneous formation of $\beta\text{-CD}_2\text{SDS}_1$ complexes in aqueous solution at $\beta\text{-CD}/\text{SDS}$ molar ratio = 2.

matrix composition for the electrophoretic separation was a crucial point of analysis procedure optimization. We found ACN to be the optimal solvent for all analytes, however concentrations major than 30% (v/v) disrupted the current during separation. On the other hand, the presence of water in the sample matrix (SM) caused the precipitation of mitotane. For this reason, it was necessary to use solubilizers such as SDS or cyclodextrins, although due to the limitations of the sweeping method (the matrix must contain significantly less SDS than the separation buffer), it was not possible to use SDS at the concentration required to dissolve mitotane (concentration exceeding 20 mM). Only the addition of β -cyclodextrins made it possible to reduce the concentration of SDS to 3.5 mM and mechanism of this phenomenon consists of the formation of inner complexes between cyclodextrins particles and SDS monomers, which are stabilized by Van der Waals interactions [14]. $\beta\text{-CD}$ molecules spontaneously form an inclusion complex with SDS in a molar ratio of 2:1 in aqueous solutions, where one alkyl chain of SDS is embedded in two cavities of $\beta\text{-CD}$, forming a $\beta\text{-CD}_2\text{SDS}_1$ complex [15] (Fig. 1). Lin et al. confirmed that increasing concentrations of cyclodextrins cause an increase in the CMC of SDS [16], which in the molecular mechanism results from the formation of $\beta\text{-CD}_2\text{SDS}_1$ complexes and their inability to micellize. Therefore, destacking phenomenon does not occur due to the absence of micelles in the sample matrix and sweeping preconcentration is not disrupted. Second, the pH value and conductivity of the sample significantly influenced the sharpness of the peaks, therefore phosphoric acid concentrations in the range of 5–100 mM were examined. Due to the presence of ionizable chemical groups among the steroids and DDA, too low concentrations of H_3PO_4 did not ensure the appropriate conditions to obtain the signal amplification effect for all analytes. Likewise, higher acid concentrations increased the conductivity, resulting in sharper peaks, nonetheless above 70 mM destabilized the electric field, therefore concentration of 60 mM H_3PO_4 in the SM ensured acceptable peak sharpness and current stability. Conclusively, the optimized sample matrix consisted of 10% ACN, 3.5 mM SDS, 7 mM $\beta\text{-CD}$, and 60 mM H_3PO_4 with a conductivity ratio $\text{SM}/\text{BGE} = 1.2$.

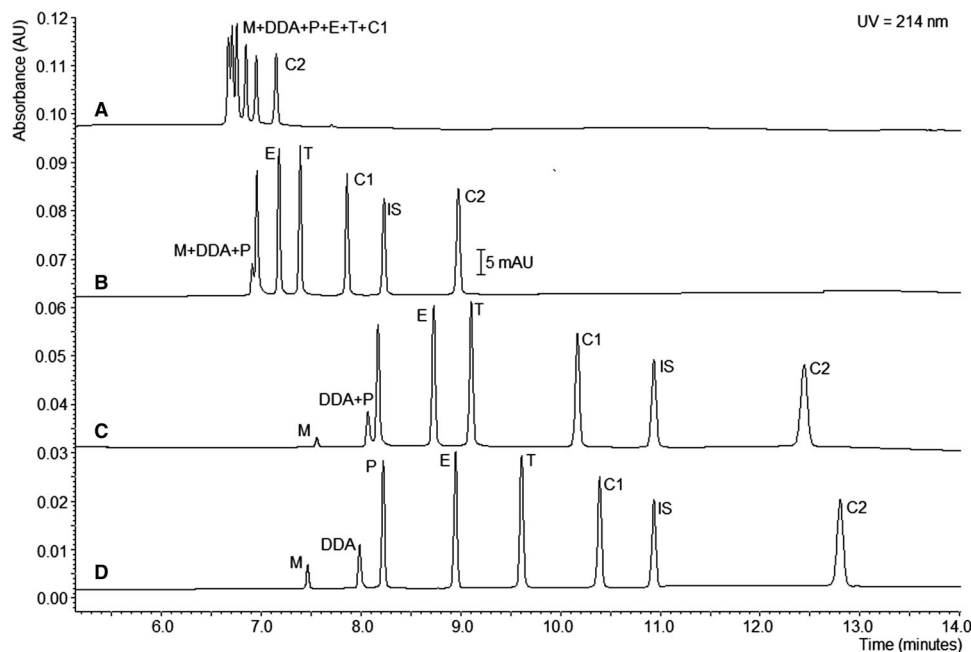


Figure 2. The impact of organic modifiers and β -CD in BGE on the resolution of analytes. (A) 25 mM H_3PO_4 , 100 mM SDS, (B) 25 mM H_3PO_4 , 100 mM SDS, 10% ACN, (C) 25 mM H_3PO_4 , 100 mM SDS, 25% ACN, (D) 25 mM H_3PO_4 , 100 mM SDS, 25% (v/v) ACN, 7 mM β -CD. Analyte concentration: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, hydrodynamic injection (50 s, 0.5 psi), applied voltage -25 kV, capillary length 60 cm, sample matrix: 10% (v/v) ACN, 3.5 mM SDS, 7 mM β -CD, 60 mM H_3PO_4 , analytical wavelength: 214 nm.

3.2 Buffer composition and sweeping mechanism

The RP-sweeping mechanism is based on the suppression of electroosmotic flow by the acid (25 mM H_3PO_4 , pH 2.5), whereby the analytes are “swept” and stacked by SDS micelles that migrate toward the anodic end of the capillary. The RP-sweeping method, despite significant signal amplification in the case of hydrophobic compounds, due to their high affinity for hydrophobic micelle cores, is characterized by relatively low resolution. Therefore, it has proved necessary to use organic modifiers for the complete separation of the analytes. As shown in Fig. 2, the background electrolyte consisting of 25 mM H_3PO_4 , 100 mM SDS maintained an exceptionally low resolution, and the addition of ACN significantly influenced the migration time. However, at its 25% (v/v) content in the running buffer all analytes were separated except for DDA and progesterone, and likewise higher concentrations of ACN disrupted current stability. Solutions containing over 30% ACN cause substantially complete precipitation of the β -CD, and as a result of interruption of current flow.

On the other hand, 7 mM β -CD in combination with 25% ACN (Fig. 2D) provided high resolution due to the high affinity of the analytes to the hydrophobic β -CD core; as a result, the analytes were separated according to micellar electrokinetic chromatography technique modified with cyclodextrins (CD-MEKC). In addition, we investigated the effect of the concentration of SDS in the separation buffer on the sweeping potential. Figure 3 shows that increasing concentrations of SDS affect peak sharpness, signal intensity, and analyte migration time. SDS concentrations exceeding 100 mM (Fig. 3E), despite the increase in signal, disturbed the baseline stability, therefore 100 mM SDS (Fig. 3D) was the

optimal concentration in terms of migration time and peak height for all analytes.

3.3 Extraction and disperser solvents

Extraction conditions were significantly related to the variety of lipophilicity of the analytes and the presence of ionizable chemical groups. The acidic nature of the DDA as well as the carboxyl and hydroxyl groups in steroids required acidification of urine samples with HCl to neutralize the ionic charge of the analytes and improve the extraction efficiency to lipophilic solvents. Moreover, a study of the type of extractants and disperser solvents was examined. First, the extractants efficiency (dichloromethane and chloroform) from aqueous solutions spiked with the mixture of analytes (250 ng/mL) was investigated. After extraction with chloroform, the peak signals were significantly low, while extraction with dichloromethane provided a higher signal for all analytes, whereby dichloromethane was chosen as the extractant. Second, four mixtures of dispersing solvents with dichloromethane were studied: acetone, ACN, methanol, and isopropanol. ACN has the best extraction performance for all analytes; hence it was selected as the disperser solvent. Furthermore, the volume of the extractant and disperser solvent on the extraction efficiency was investigated in the range of 100–300 and 500–1000 μL^{-1} , respectively. Volumes higher than 200 μL reduced the effectiveness of all analytes, except for cortisol, which showed an increase in peak height. Likewise, ACN volumes below 900 μL did not provide a sufficient dispersion of dichloromethane, while 1000 μL caused lower signal intensity, therefore the extraction mixture consisted of

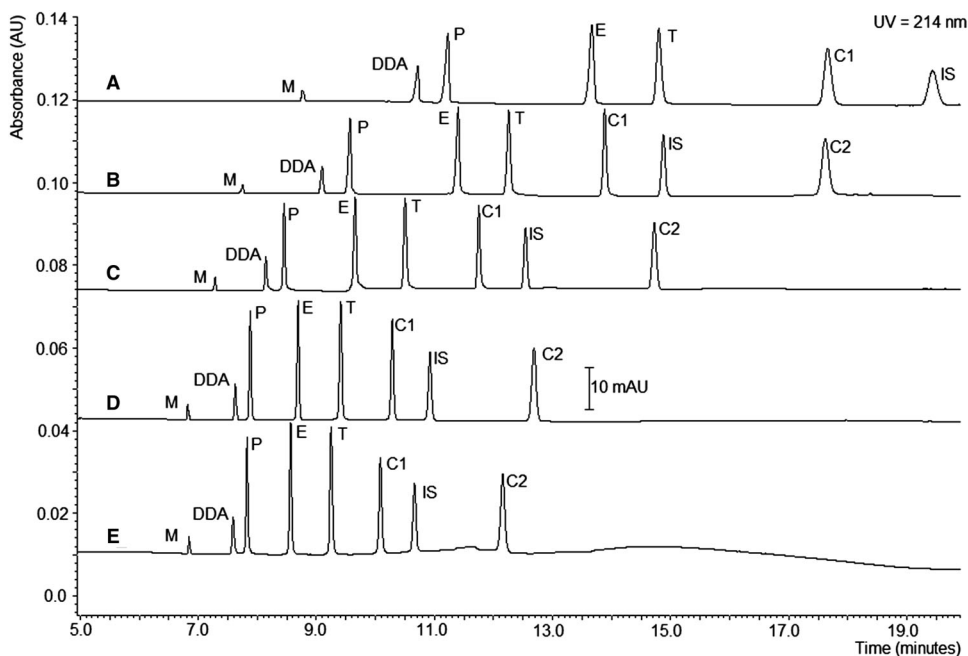


Figure 3. The effect of increasing concentration of SDS in BGE. (A) 40 mM, (B) 60 mM, (C) 80 mM, (D) 100 mM, (E) 120 mM, BGE other components: 25 mM H_3PO_4 , 25% (v/v) ACN, 7 mM β -CD, other conditions are the same as in Fig. 2.

ACN and dichloromethane in a 9:2 ratio (v/v) and a volume of 1100 μL .

3.4 Validation study

The optimized RP-sweeping-CD-MEKC-DLLME method has been validated according to the European Medicines Agency guidelines for the validation of bioanalytical methods [17] by measuring peak heights at the wavelength of maximum absorbance: 248 nm for steroids and 200 nm for mitotane and its metabolite.

3.4.1 Selectivity

To confirm the absence of interfering substances about the migration time of analytes, the blank urine and synthetic urine samples ($n = 6$) were analyzed and compared to matrices spiked with analytes and IS (25 and 100 ng/mL, respectively). As shown in Fig. 4, there is no significant urine matrix interference at migration time of analytes, hence the sample clean-up procedure was selective. Note that selectivity validation was tested with 5 mL randomized urine samples, while the concentration of steroids is relatively lower than the 24 h urine aliquot, which is preferred method to control mitotane steroidogenesis inhibition.

3.4.2 Linearity, LOD, and LOQ

The LOD and LOQ were calculated via the value of the SD from the maximum sensitivity provided by the elec-

trophoretic system. The LOD and LOQ were estimated by multiplying the SD of the blanks by a factor of 3 and 10, respectively. Subsequently the resulting LOD and LOQ were validated separately by analyzing six samples from different standards ($n = 6$) (Table 2). The linearity of the method was determined by adding analytes to synthetic urine matrix in the range of 10–750 ng/mL for cortisol, 5–500 ng/mL for the rest of the analytes, and 100 ng/mL for internal standard in six replications ($n = 6$) of seven concentration. The relative peak heights were selected as analytical signals for all the analytes. The calibration curves were obtained by least squares linear regression analysis. Responses to mitotane, DDA, and steroids were linear in the concentration range studied (Table 2), which was confirmed by a satisfactory coefficient of determination ($R^2 \geq 0.9988$).

3.4.3 Accuracy and precision

The within-run accuracy and precision were calculated at LLOQ, LQC, MQC, and HQC levels for the five replicates, each of the same analytical run. For the equivalent concentrations, accuracy and precision between runs over three different analytical cycles in two different days were calculated. Based on the data presented in Table 3, it was confirmed that the values were within the acceptable limits according to recommended guidelines.

3.4.4 Dilution integrity and carry-over

For dilution integrity, blank synthetic urine samples were spiked with two times higher than the ULOQ (upper limit of

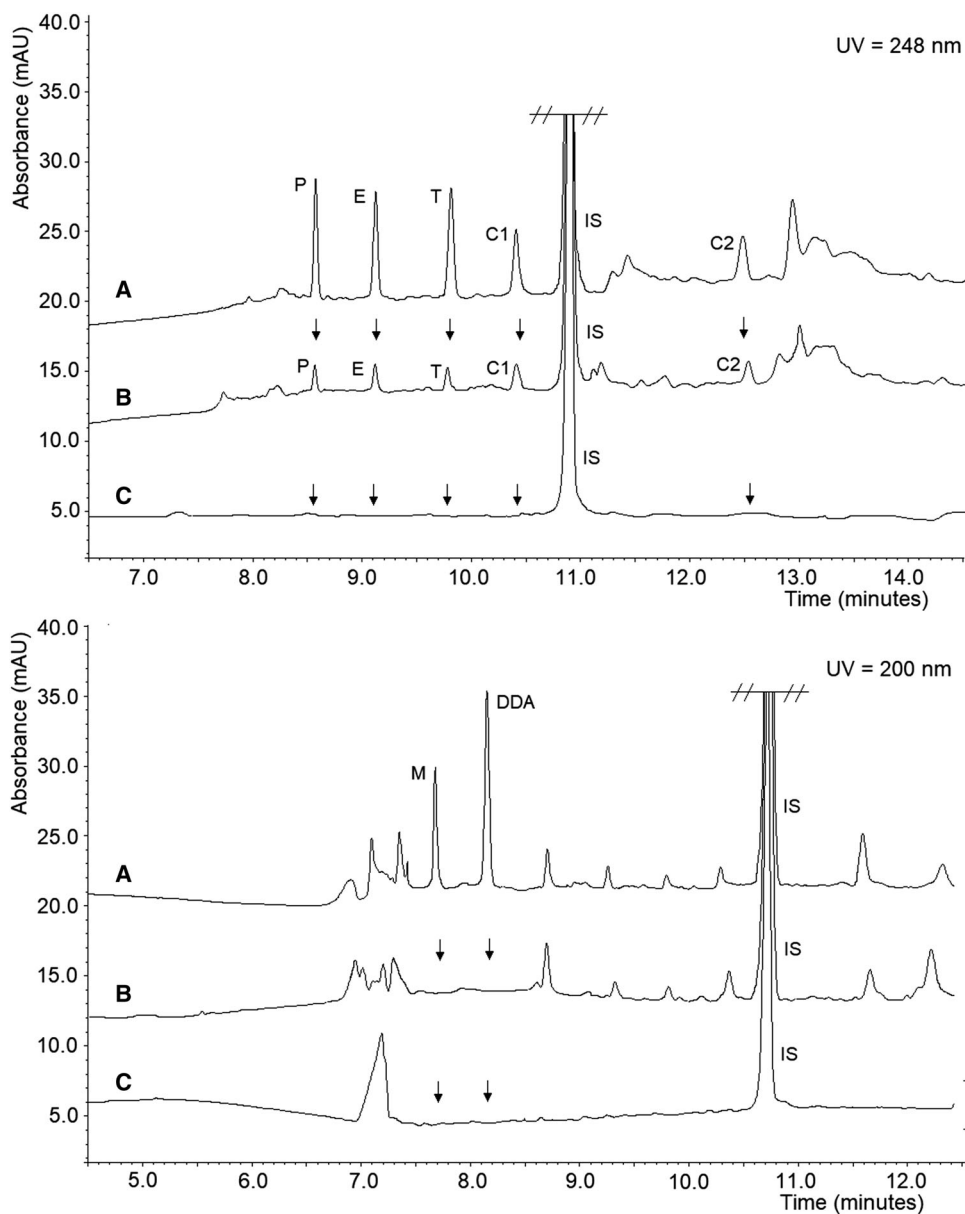


Figure 4. Representative electropherograms for random 5 mL urine samples from healthy volunteers spiked with (A) 25 ng/mL, (B) random 5 mL blank urine samples from healthy volunteers, and (C) 5 mL blank synthetic urine samples. All samples were spiked with 100 ng/mL of the internal standard. Analytical wavelength: 248 nm for steroids and 200 nm for mitotane and DDA. Other conditions are the same as in Fig. 2D.

quantification) concentration (1500 ng/mL and 1000 ng/mL for cortisone and rest of the analytes, respectively) and was diluted 5 times and 10 times with blank synthetic urine ($n = 6$) to obtain a concentration of 300 ng/mL and 150 ng/mL for cortisone, as well as 200 ng/mL and 100 ng/mL for other analytes. Diluted samples were assayed alongside the determined calibration curve. The results of dilution integrity investigation were within acceptable limits. The accuracy (%) and precision (%CV) were found to be in 93.0–106.4 and 5.5–8.1 range, respectively, which is within the limit of the standard accepted by the guidelines, that is, $\pm 15\%$. Carry-over effects were assessed by injecting to the capillary three blank synthetic urine samples, one before, and two after ULOQ calibration standard (750 ng/mL for cortisone and 500 ng/mL

for other analytes) injection, consequently no carry-over effects were observed.

3.4.5 Stability

During the validation process, the stability of the analytes in stock solutions and urine samples was tested in triplicate ($n = 3$) LQC and HQC. All stability determinations were analyzed against a freshly prepared calibration curve to obtain sample concentrations. The samples have been subjected in short-term stability at room temperature for 6 h; postpreparative stability for 24 h at room temperature; after three cycles of freeze (-70°C) and thaw; long-term stability

Table 2. Statistical parameters of the RP-sweeping-CD-MEKC-DLLME method

Analyte	Linear range(ng/mL)	Equation	R ²	LOD(ng/mL)	LOQ(ng/mL)
Mitotane	5–500	$y = (0.0337 \pm 0.0005)x - (0.0821 \pm 0.1045)$	0.9990	1.5	5.0
DDA	5–500	$y = (0.0479 \pm 0.0004)x - (0.1186 \pm 0.0892)$	0.9996	1.5	5.0
Progesterone	5–500	$y = (0.0234 \pm 0.0004)x + (0.0177 \pm 0.0785)$	0.9988	1.5	5.0
Epitestosterone	5–500	$y = (0.0326 \pm 0.0003)x + (0.0046 \pm 0.0716)$	0.9995	1.5	5.0
Testosterone	5–500	$y = (0.0275 \pm 0.0003)x + (0.0069 \pm 0.0619)$	0.9995	1.5	5.0
Corticosterone	5–500	$y = (0.0248 \pm 0.0002)x + (0.0021 \pm 0.0483)$	0.9996	1.5	5.0
Cortisol	10–750	$y = (0.0118 \pm 0.0002)x + (0.0215 \pm 0.0582)$	0.9990	3	10.0

Table 3. Precision and accuracy data obtained by the elaborated method

Analyte	Nominal concentration	Within-run (<i>n</i> = 5)			Between-run (<i>n</i> = 6)		
		Observed-concentration (ng/mL) (mean ± SD)	Accuracy (%)	Precision (CV%)	Observed-concentration (ng/mL) (mean ± SD)	Accuracy (%)	Precision (CV%)
Mitotane	LLOQ	4.78 ± 0.54	93.6	11.6	4.60 ± 0.45	92.1	9.9
	LQC	15.66 ± 1.25	104.4	8.0	14.00 ± 1.19	93.3	8.5
	MQC	197.15 ± 13.87	98.6	7.0	213.31 ± 14.31	106.7	6.7
	HQC	461.89 ± 30.97	102.6	6.7	475.92 ± 21.23	105.8	4.5
DDA	LLOQ	5.34 ± 0.71	106.8	13.4	4.84 ± 0.63	96.8	12.9
	LQC	16.03 ± 1.00	106.9	6.3	15.77 ± 1.05	105.1	6.7
	MQC	202.38 ± 9.69	101.2	4.8	211.66 ± 14.80	105.8	7.0
	HQC	440.21 ± 23.19	97.8	5.3	444.30 ± 18.31	98.7	4.1
Progesterone	LLOQ	4.66 ± 0.53	93.1	11.3	5.48 ± 0.61	109.5	11.1
	LQC	14.29 ± 1.41	95.2	9.9	16.34 ± 1.96	108.9	10.1
	MQC	206.17 ± 11.45	103.1	5.6	188.13 ± 11.54	94.1	6.2
	HQC	474.97 ± 24.89	105.6	5.2	456.37 ± 24.54	101.4	5.4
Epitestosterone	LLOQ	4.61 ± 0.68	92.2	14.7	5.38 ± 0.48	107.5	9.0
	LQC	15.85 ± 1.36	105.7	8.6	15.15 ± 0.77	101.0	5.1
	MQC	206.87 ± 14.30	103.4	6.9	209.00 ± 9.56	104.5	4.6
	HQC	461.02 ± 15.18	102.5	3.3	445.00 ± 13.55	98.9	3.1
Testosterone	LLOQ	5.40 ± 0.65	108.1	12.1	4.72 ± 0.56	94.4	11.8
	LQC	14.66 ± 1.13	97.7	7.7	14.42 ± 1.47	96.1	10.2
	MQC	211.17 ± 15.40	105.6	7.3	210.90 ± 17.88	105.5	8.5
	HQC	462.95 ± 22.75	102.9	4.9	453.45 ± 18.81	100.8	4.2
Corticosterone	LLOQ	4.59 ± 0.60	91.9	13.1	4.75 ± 0.40	95.1	8.5
	LQC	14.27 ± 1.41	95.1	9.9	14.30 ± 1.23	95.3	8.6
	MQC	209.19 ± 6.84	104.6	3.3	199.78 ± 16.98	99.9	8.5
	HQC	461.61 ± 26.75	102.6	5.8	424.38 ± 20.17	94.3	4.8
Cortisol	LLOQ	10.55 ± 1.20	105.5	11.4	9.19 ± 0.85	92.0	9.2
	LQC	31.23 ± 3.05	104.1	9.8	32.36 ± 2.59	107.9	8.0
	MQC	289.19 ± 25.69	96.4	8.9	313.43 ± 19.25	104.5	6.1
	HQC	616.82 ± 24.67	94.90	4.0	665.41 ± 28.44	102.4	4.3

CV: coefficient of variation; LLOQ: lower limit of quantification (10.0 ng/mL for cortisol, 5.0 ng/mL for other analytes); LQC: lower quality control quantification (30.0 ng/mL for cortisol, 15.0 ng/mL for other analytes); MQC: medium quality control quantification (300.0 ng/mL for cortisol, 200.0 ng/mL for other analytes); HQC: high-quality control quantification (650.0 ng/mL for cortisol, 450.0 ng/mL for other analytes).

at −70°C; stock solutions of analytes stored for 120 days at −20°C; and IS solution stored for 30 days at 4–8°C. The stability study of mitotane and steroids in stock solutions and urine samples showed reliable stability as the mean of the

test samples results was within the acceptance criteria ±15% of the initial control values. These results indicate that the analytes can be handled under normal laboratory conditions without significant losses in routine analysis.

4 Concluding remarks

Mitotane is a highly lipophilic drug that has been determined in biological samples by HPLC and GC methods. However, the aim of the study was to develop the first electrophoretic method for the determination of mitotane and its metabolite o, p'-DDA in urine samples. Due to the inhibition of steroidogenesis by mitotane, beside of the main drug and its metabolite five additional steroids were determined simultaneously. Likewise, for the first time the use of β -CD₂SDS₁ complexes in CE to dissolve strongly hydrophobic analytes in a (water-based) sample matrix has been described. Therefore, β -CD₂SDS₁ solubilization allowed the use of low concentrations of SDS in the sample that did not cause the phenomenon of destacking of the analyte peaks. Moreover, dispersive liquid–liquid microextraction provided an off-line signal amplification, low consumption of organic solvents, and the technique was significantly less expensive than *liquid–liquid extraction* or SPE (liquid–liquid extraction reagents or SPE columns) used in the determination of mitotane in biological samples. The developed method is simple, sensitive, and economical, with high throughput as well as environmental friendly. In addition, we conducted a full validation confirming that the precision and accuracy of the method meets the criteria of the guidelines, and therefore can be used in clinical practice and routine analyses. Obtained parameters such as LOQ = 5 ng/mL and LOD = 1.5 ng/mL proved to be competitive with standard methods based on HPLC in combination with UV detection (Table 1).

The authors have declared no conflict of interest.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

5 References

- [1] Paragliola, R. M., Torino, F., Papi, G., Locantore, P., Pontecorvi, A., *Eur. Endocrinol.* 2018, 14, 62–66.
- [2] Else, T., Kim, A. C., Sabolch, A., Raymond, V. M., Kandathil, A., Caoili, E. M., Jolly, S., Miller, B. S., Giordano, T. J., Hammer, G. D., *Endocr. Rev.* 2014, 35, 282–326.
- [3] Mizdrak, M., Tičinović Kurir, T., Božić, J., *Biomedicines* 2021, 9, 174.
- [4] Ghataore, L., Chakraborti, I., Aylwin, S. J., Schulte, K.-M., Dworakowska, D., Coskeran, P., Taylor, N. F., *Endocr. Connect.* 2012, 1, 37–47.
- [5] Veytsman, I., Nieman, L., Fojo, T., *J. Clin. Oncol.* 2009, 27, 4619–4629.
- [6] Garg, M. B., Sakoff, J. A., Ackland, S. P., *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2011, 879, 2201–2205.
- [7] De Francia, S., Pirro, E., Zappia, F., De Martino, F., Sprio, A. E., Daffara, F., Terzolo, M., Berruti, A., Di Carlo, F., Ghezzi, F., *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2006, 837, 69–75.
- [8] Luci, G., Cucchiara, F., Ciofi, L., Mattioli, F., Lastella, M., Danesi, R., Di Paolo, A., *Separations* 2021, 8, 63.
- [9] Mornar, A., Sertić, M., Turk, N., Nigović, B., Koršić, M., *Biomed. Chromatogr.* 2012, 26, 1308–1314.
- [10] Jančić-Stojanović, B., Vemić, S., Elezović, V., Petrović, A., Sinadinović, Z., Ivanović, D., Damjanović, S., Miljković, B., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2015, 38, 1371–1378.
- [11] Ando, M., Hirabatake, M., Yasui, H., Fukushima, S., Sugioaka, N., Hashida, T., *Biomed. Chromatogr.* 2020, 34, 3.
- [12] Chen, Z., Maartens, F., Vega, H., Kunene, S., Gumedede, J., Krieger, R. I., *Int. J. Toxicol.* 2009, 28, 528–533.
- [13] Cazaubon, Y., Talineau, Y., Feliu, C., Konecki, C., Russello, J., Mathieu, O., Djerada, Z., *Pharmaceutics* 2019, 11, 566.
- [14] Brocos, P., Banquy, X., Díaz-Vergara, N., Pérez-Casas, S., Piñeiro, Á., Costas, M., *J. Phys. Chem. B* 2011, 115, 14381–14396.
- [15] Jiang, L., Peng, Y., Yan, Y., Deng, M., Wang, Y., Huang, J., *Soft Matter* 2010, 6, 1731–1736.
- [16] Lin, C.-E., Huang, H.-C., Chen, H.-W., *J. Chromatogr. A* 2001, 917, 297–310.
- [17] European Medicines Agency (EMA), *Guideline on bioanalytical method validation*, EMA, London 2012.



Nanoemulsion supported microemulsion electrokinetic chromatography coupled with selected preconcentration techniques as an approach for analysis of highly hydrophobic compounds

Michał Pieckowski^a, Piotr Kowalski^{a,*}, Ilona Olędzka^a, Anna Roszkowska^a, Alina Plenis^b, Tomasz Bączek^a

^a Department of Pharmaceutical Chemistry, Medical University of Gdańsk, Hallera 107, Gdańsk 80-416, Poland

^b Department of Analytical Chemistry, Medical University of Gdańsk, Hallera 107, Gdańsk 80-416, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 April 2022

Revised 11 July 2022

Accepted 11 July 2022

Available online 14 July 2022

Keywords:

Nanoemulsion

Microemulsion electrokinetic chromatography

Hydrophobic compounds

On-line preconcentration techniques

Low-energy emulsification

ABSTRACT

In this paper, an oil-in-water (O/W) nanoemulsion (NE) prepared by water cold dilution of an O/W microemulsion (ME) was introduced as a sample matrix in microemulsion electrokinetic capillary chromatography (MEEKC) for the highly hydrophobic compounds analysis. Several model compounds with log $P_{O/W}$ values in the 4.1–10.9 range, from different chemical groups, including retinol, α -tocopherol, cholecalciferol, phylloquinone, menaquinone-7, dichlorodiphenyltrichloroethane, ivermectin have been tested. As a proof of the concept of NE formation, a dynamic light scattering technique was employed to determine the size distribution profile of NE particles. Moreover, due to relatively low conductivity of the NE matrix (50–100 times lower in comparison to the separation buffer) and a negative electric charge provided to hydrophobic compounds through NE dispersed phase, NE matrices have been combined with preconcentration techniques based on electrokinetic dosing, namely field amplified sample injection (FASI) and pressure assisted electrokinetic injection (PAEKI). The detection limits for vitamin K₁ and K₂-MK7 in the NE matrix in combination with FASI (NE-MEEKC-FASI) as well as PAEKI (NE-MEEKC-PAEKI) were up to 42.9 and 12.1 ng mL⁻¹, respectively. In comparison to standard hydrodynamic injection for microemulsion sample matrix NE-MEEKC-PAEKI grant 45-fold improvement in signal sensitivity. The study presents an innovative approach, as it enables the use of preconcentration techniques for highly hydrophobic compounds (log $P_{O/W}$ > 4), which was not previously possible for implementation in the electromigration techniques. Likewise, the use of organic solvents has been reduced by using ME as a solvent for stock solutions and diluting with water prior to the analysis. The application to real samples was investigated using a dietary supplement containing vitamin K₂-MK7 obtained from the fermentation product of soybeans.

© 2022 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Recently, nanoemulsions (NE) have gained interest in the field of pharmacy, cosmetics, food, and agrochemical industry as novel drug delivery systems that increase in the bioavailability of active agents [1]. The term "nanoemulsion" was first introduced by Nakajima et al. [2] and refers to the particle size of dispersed phase, which, according to various literature data, ranges from 20 up to 1000 nm. In comparison to microemulsions (ME), NEs are thermodynamically unstable and require lower concentrations of surfactant for their formation [3,4]. Taylor and Ottewill [5] presented the formation of NE by spontaneous emulsification through diluting an

oil-in-water (O/W) ME for the first time, a process also termed a cold dilution, considered as a low energy method. As shown in Fig. 1, the molecular mechanism of this phenomenon involves the diffusion of co-surfactant molecules from the oil droplets into the water phase. In these conditions, the surfactant does not provide a low surface tension as a result of the decrease in concentration, the system is thermodynamically unstable, which appears in the formation of a nanoemulsion [3]. A further study on the dilution of MEs was conducted by Solè et al., which demonstrated that a single or multiple dilution of the O/W ME with water does not affect the final oil droplet size of the NE [6].

Microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) is a well-known mode of electromigration technique [7–10], in which the pseudostationary phase is the dispersed phase of the ME. Despite the higher resolution potential than capillary zone elec-

* Corresponding author.

E-mail address: piotr.kowalski@gumed.edu.pl (P. Kowalski).

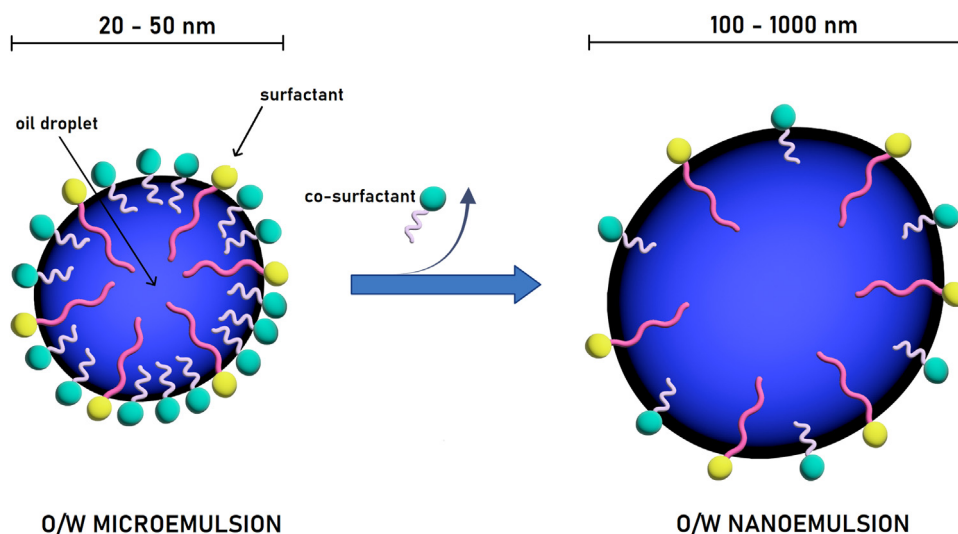


Fig. 1. Mechanism of forming NEs by means of cold dilution of microemulsion with water.

trophoresis (CZE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) techniques [11–13], on-line preconcentration methods in combination with O/W MEEKC have not been studied so far during the analysis of highly hydrophobic compounds ($\log P_{O/W} > 4$). The development of a sample matrix (SM) for high $\log P_{O/W}$ compounds is problematical due to the instability of the ME to changes in composition between the sample and the separation buffer zone; samples with a high concentration of organic solvents can lead to ME collapse and current disturbance. For this reason, separations of hydrophobic compounds by O/W MEEKC technique are based on the matrices prepared by dissolving the samples with a background electrolyte (BGE). This can lead to the inability of the application of such sample matrices in combination with preconcentration techniques [14–16]. Another advantage of proposed method over CZE and MEKC separations is that MEs have significantly higher solubility potential as they function as versatile solvents, therefore complex matrices consisting of both hydrophobic and hydrophilic compounds, separated under MEEKC conditions are common in the literature [17–20]. The development of new methods for the separation highly hydrophobic compounds due to the composition of the sample matrix, and the possibility of combining them with on-line preconcentration techniques will advance the progress in the field of capillary electromigration methods.

Here, the development of sample matrix composition based on O/W NE prepared by cold dilution of O/W ME with water (Fig. 1) as a sample matrix for highly hydrophobic compounds has been presented. The aim of the study was to demonstrate that the NE matrix ensures the solubility of highly hydrophobic analytes, while providing them with a sufficient electric charge for the electrokinetic injection (EKI). Secondly, due to the low conductivity of NE matrices, the possibility of applying preconcentration methods based on EKI in an enhanced electric field for hydrophobic compounds was investigated. The prepared NEs were verified by dynamic light scattering technique to measure the particle size distribution, and the concentration sensitivity enhancement factor has been determined for menaquinone-7 (VK2) as exemplary sample.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Retinol (VA), α -tocopherol (VE), cholecalciferol (VD), phyloquinone (VK1), VK2, dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), ivermectin (IVE), sodium tetraborate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), and sodium dodecyl

Table 1

$\log P_{O/W}$ values and water solubility of model compounds.

Name	S_w (water solubility) ¹ [mg mL ⁻¹]	$\log P_{O/W}$ ¹
Retinol	7.58×10^{-3}	6.38
α -Tocopherol	7.04×10^{-6}	8.84
Cholecalciferol	3.8×10^{-4}	7.98
Phylloquinone	5.92×10^{-5}	8.48
Menaquinone-7	2.29×10^{-4}	9.58
Dichlorodiphenyltrichloroethane	3.52×10^{-6}	6.29
Ivermectin	6.14×10^{-3}	4.37

¹ – Values generated by ALOGPS 2.1

sulphate (SDS) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The $\log P_{O/W}$ and solubility values for the analytes used in the study are summarized in Table 1. All other chemicals were of reagent grade.

2.2. CE apparatus

All electropherograms were obtained using PACE/MDQ capillary electrophoresis system (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) equipped with a spectrophotometric diode array detector (DAD) and controlled with 32 Karat 8.0 software. Separation and preconcentration experiments were performed in the following fused silica capillaries 50 μm i.d. and 40 total length cm (30 cm effective length), 50 cm (40 cm effective length) and 60 cm (50 cm effective length) obtained from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). The capillaries were thermostated at 25.0 (± 0.1)°C during all experiments. On-line ultraviolet (UV)–absorption detections were performed at 208, 266, 277, and 340 nm wavelengths, for which signal to noise ratio of the analytes showed the highest values.

2.3. General electrophoresis procedure

To ensure good repeatability of analyses, the new capillary was conditioned with 1 M NaOH (10 min), with deionized water (10 min), and with the separation buffer (10 min) prior to use. Between each run, the capillary was washed with 0.1 M NaOH (2 min), deionized water (2 min), and finally with the separation buffer for 2 min. All rinsing solutions (20 psi = 137.9 kPa) were injected at the inlet end of the capillary (farthest distance to the detector).

Table 2

The compositions of the microemulsions used in the study.

Microemulsion	Oil phase (v ^{v-1})	Surfactant(SDS)	Co-surfactant (v ^{v-1})	Electrolyte (Na ₂ B ₄ O ₇)	Application
ME-1	1.22 % n-hexane	40 mM	21 % butan-1-ol	20 mM	BGE, stock solution, sample matrix (diluted with water)
ME-2	1.22 % n-octan		18 % ACN		
ME-3	1.22 % ethyl acetate				
ME-4	1.22 % n-hexane	80 mM	15 % butan-1-ol		stock solution, sample matrix (diluted with water)

2.4. On-line preconcentration

Field amplified sample injection (FASI) experiments were performed as follows: the capillary was first filled with background electrolyte (BGE) and then a water plug was introduced into the capillary by hydrodynamic injection (45 s, 0.5 psi). Sample was then introduced into the capillary by electrokinetic injection (EKI) at -5 kV (reversed polarity) during 20 s. In pressure assisted electrokinetic injection (PAEKI) mode, after BGE injection, sample was introduced into the capillary by EKI at -8 kV during 1 min under pressure 0.4 psi. Injection parameters have been optimized for preconcentration method. All electrophoretic separations were conducted by applying 25 kV (at normal polarity) to the capillary.

2.5. Separation buffer and analytes standard solutions

All BGE solutions were prepared on the basis of an O/W microemulsion: ME-1, ME-2 or ME-3 depending on the experiment (the compositions are indicated in Table 2), while ME-4 was employed as stock solution and sample matrix. Individual analytes stock solutions at a concentration of 2 mg mL⁻¹ were prepared in ME-1, ME-2, ME-3, and ME-4 depending on the type of SM. Analytes stock solutions were stored at -20°C in dark containers. Standard and working solutions (20, 5, 2, 1, 0.5 μg mL⁻¹) were freshly prepared in each working session from stock solutions by appropriate dilution with high purity water (deionized), which was obtained from a Milli-Q apparatus (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.6. Droplet size

The mean droplet sizes of NEs were measured at room temperature by Dynamic Light Scattering (DLS) method, using Malvern Zetasizer Nano ZS apparatus, which measures particle size (range from 0.3 nm to 10 μm) and scattering angle was set at 90°. The Cumulants method was used as mathematical approach to get the size distribution profiles.

3. Results and discussion

3.1. The theory of NE application in the electrokinetic chromatography (EKC)

The solubilization of analytes in the sample matrix can be determined using two descriptors, namely the molar solubilization ratio, MSR, and the micelle-water partition coefficient, K_M . The MSR value is defined as the number of moles of solute that one mole of micellar surfactant can dissolve, while the K_M is the ratio of the solute concentration in the micelle to the solute concentration in the water [21]. For a given surfactant with a defined critical micellar concentration (*cmc*) the general equation for MSR is:

$$MSR = \frac{S_{surf} - S_{cmc}}{C_{surf} - cmc} \quad (1)$$

where S_{surf} is solubility for a given solute at surfactant concentration C_{surf} ($C_{surf} > cmc$), and S_{cmc} is solubility for a given solute at *cmc*. The MSR value can be determined from the slope when the

solute concentration is plotted against the surfactant concentration above the *cmc*, thus is not related to its water solubility. K_M is calculated as:

$$K_M = \frac{X_m}{X_a} \quad (2)$$

where X_m and X_a are the molar fractions of solute in micelles and water, respectively. For saturated systems, i.e., those in which micellized surfactant phase and the aqueous phase are in the equilibrium X_m can be calculated as $X_m = MSR/(1 + MSR)$, and X_a can be expressed as $X_a = S_{cmc}V_w$, where $V_w = 0.0180$ L mol⁻¹ is the molar volume of water. Consequently, K_M is related to MSR according to:

$$K_M = \frac{MSR}{S_{cmc}V_w(1 + MSR)} \quad (3)$$

It can be concluded that the less soluble the analyte, the higher the concentration of surfactant needed for it to dissolve in the sample. Therefore, the dissolution of compounds with a high log $P_{O/W}$ requires higher surfactant concentrations in aqueous solutions, which is disadvantageous when using preconcentration techniques in an enhanced electric field. Hence, ionic surfactants, by increasing the conductivity of the sample, cause the ratio of conductivities of SM and BGE to be closer to 1, which consequently reduces the signal height. Thus, the selection of a surfactant in SM in combination with a preconcentration technique based on an enhanced electric field and optimal parameters is a compromise between the lowest surfactant concentration that provides analyte solubilization and the signal amplification effect. This relation can be noticed in the paper described by Félez et al. [22], where the online preconcentration FASI-MEKC was used for separation of several benzophenones with different log $P_{O/W}$ values, and the sample matrix was 10 mM SDS. The determined sensitivity enhancement coefficients were lowering with an increase in the log $P_{O/W}$ value of the benzophenones. Moreover, increasing concentration of SDS in the sample resulted in decreased signal strength, which was associated with an increase in the conductivity of the sample.

The mechanism of preconcentration for hydrophobic analytes in the NE matrix with the simultaneous application of the FASI and PAEKI techniques is to grant an electric charge to the hydrophobic compounds through negatively charged surfactant groups of the NE oil droplets. The distribution of analytes into micelles and dispersed phase droplets of MEs are similar, however, hydrophobic compounds can penetrate droplets more easily as they are larger and more flexible than common micelles [22]. Based on this assumption, the NE droplets will exhibit similar characteristics as micellar solutions (MS). As the main feature of NE is a low concentration of surfactant, it is possible to use them as a matrix for hydrophobic compounds to obtain samples with lower conductivity than MS and to enable dissolution of hydrophobic compounds. Due to the high solubility potential of the ME and its use as a solvent for stock solutions, it allows for the simple preparation of a NE-based sample matrix prior to electrophoretic analysis.

Table 3

Values of Z-Average and polydispersity index for diluted MEs collected by DLS technique.

Nanoemulsion	Oil phase	Z-Average [nm]	Polydispersity index
2 % ME-1 ¹	n-hexane	172.3	0.206
2 % ME-2 ¹	n-octane	425.0	0.654
2 % ME-3 ¹	ethyl acetate	956.9	0.805
1 % ME-4 ²	n-hexane	218.7	0.340

¹0.0244 % oil phase, 0.042 % butan-1-ol, 0.036 % ACN, 0.8 mM SDS, 0.4 mM Na₂B₄O₇

²0.0122 % oil phase, 0.015 % butan-1-ol, 0.8 mM SDS, 0.2 mM Na₂B₄O₇

Z-Average – the intensity weighted mean hydrodynamic size of the ensemble collection of particles measured by DLS

Polydispersity index – measure of the heterogeneity of a sample based on size

3.2. Experimental verification of the NE sample matrices

3.2.1. DLS of NE matrices

In DLS analysis of NEs prepared by cold dilution of MEs, a cumulants method was used, which provides average values of the diffusion coefficient, but it does not provide the distribution of the diffusion coefficients. The cumulants calculation is the best starting point for an unknown sample as it does not require a priori information about SM components. It uses a polynomial to fit a log-normalized correlation function to obtain a monomodal distribution.

The data presented in Table 3 show that NE based on n-octane had the smallest diameter of the dispersed phase and the polydispersity index. In the case of ethyl acetate, the droplets swelled by Ostwald ripening due to overly high surface tension.

3.2.2. Cold dilution of the MEs samples coupled with FASI and PAEKI

The first attempt for the separation of DDT and vitamin E samples by developed NE-MEEKC (nanoemulsion supported microemulsion electrokinetic chromatography) method was the application of different dilutions of ME-1 used as BGE. The tested samples contained 10%, 5%, and 2% (v/v) of ME-1 diluted with deionized water, respectively (Fig. 2). The injection time in all samples was kept constant at 1 min and applied voltage during EKI was fixed at -5 kV for FASI, while for PAEKI at 1 min, -8 kV and 0.4 psi.

The obtained results of ME-1 dilution indicate that the signal strength of the dosing in the enhanced electric field of hydrophobic compounds with high affinity for dispersed phase is inversely proportional to sample conductivity and SDS concentration. When a 2% ME-1 was used at the surfactant concentration of 0.8 mM (10-fold lower than its *cmc* value), the solubilization of the analytes with nanoemulsion droplets was implied. Using the same separation buffer as in the previous analysis, whilst the samples were diluted with ME-4, comparable results as in 2 % ME-1 were obtained, whereas maintaining a concentration of 1 % ME-4 (0.8 mM SDS, 1.22 % n-hexane, 0.15 % butanol-1, 0.2 mM Na₂B₄O₇) in SM.

3.2.3. Effect of dispersed phase on signal amplification

The type of oil phase in the ME influences the dissolution of the hydrophobic compound, therefore two solvents with significantly different polarity, i.e., n-octane (dipole moment = 0) and ethyl acetate (dipole moment = 1.78), were selected for the evaluation of the type of oil phase effect on the on-line preconcentration technique. Two microemulsions: ME-2 and ME-3, which differ in the oil phase (*n-octane and ethyl acetate, respectively*) have been tested. The sample matrix was a NE prepared by diluting the ME-2 or ME-3 with deionized water and was kept constant at a concentration of 2% ME, while the model compounds selected for this analysis were IVE and VA.

Both IVE and VA are soluble in n-octane and ethyl acetate. However, significant differences in signal intensity from IVE were obtained, while the VA signal strength was similar in all electro-

pherograms (Fig. 3). The highest peak for IVE was achieved when the sample matrix was NE consisting of ethyl acetate and the separation buffer with n-octane as the oil phase (Fig. 3 D). On the other hand, the lowest peaks were obtained when both the NE and the ME were composed of ethyl acetate as the oil phase.

3.2.4. NE in comparison to micellar solution

To confirm the influence of NE matrices on the signal amplification effect for hydrophobic compounds, NEs were compared with micellar solutions (MS) in terms of solubilization ability and improvement the peak height of analytes. For this purpose, model compounds with ionizable groups (VE, as shown in Fig. 4) or the lack of those groups (VK1, VK2, as shown in Fig. 5) were used. Dilutions of ME-4 and MS (80 mM SDS, 20 mM Na₂B₄O₇) matrices were employed and combined with PAEKI preconcentration to demonstrate the expected enhancement effect.

Although VE was insoluble in SDS solutions in the range of 10–100 mM concentrations, it has been observed that the addition of Na₂B₄O₇ to SDS solution resulted in complete dissolution of this analyte. VE contains a hydroxyl group in its structure and was dissolved in the presence of both Na₂B₄O₇ and a surfactant, enabling the preparation of stock solutions with a concentration of 1 mg mL⁻¹ of VE in 80 mM SDS and 20 mM Na₂B₄O₇. As presented in Fig. 4, a reduction of the conductivity of NE by lowering the surfactant concentration (in the sample matrix without Na₂B₄O₇) resulted in increase of the strength of the VE signal (Fig. 4A and 4B). However, changing the sample composition by addition of Na₂B₄O₇ resulted in further improvement of peak intensity. When comparing the electropherograms presented in Fig. 4A–C), the hydrophobic interactions are weaker in terms of signal increase than the interaction between Na₂B₄O₇ molecules and the hydroxyl group of VE. On the other hand, the use of Na₂B₄O₇ as a NE component allowed to obtain a significant increase in peak height (Fig. 4D) than in the corresponding MS matrix with Na₂B₄O₇ (Fig. 4C). According to a study presented by Cao et al. [23], the charge density on the surface of the dispersed phase decreases as the radius of the oil droplets increase, which is related to the distance between the negatively charged SDS groups, while the surfactant to oil ratio does not change. Lowering the concentration of surfactant (SDS) reduces the zeta potential of the dispersed phase droplets making them more flexible than common micelles, simultaneously promoting the partitioning of the hydrophobic compounds in the core of the droplets. Moreover, low zeta potential ensures stronger van der Waals interactions between the analytes, and the presence of Na₂B₄O₇ influenced the solubilization of the VE hydroxyl group.

A similar dependence of the signal strength on the conductivity of the sample can be noted in Fig. 5, which shows the influence of the sample matrix composition on the signal strength of hydrophobic compounds without ionizable groups, namely VK1 and VK2. Micellar solutions, even at concentrations above 100 mM of SDS did not dissolve the K group vitamins, and on the other hand, the dispersed phase of the microemulsion proved an excellent solvent. After the sample matrix dilution with deionized water, the signal strength increased with the decrease in conductivity (Fig. 5A, B, D). However, the presence of electrolyte in the sample reduces the peak height of the analytes (Fig. 5C), confirming the theory regarding the influence of NE matrix conductivity on the signal strength. Only hydrophobic interactions between analytes and the dispersed phase provide an electric charge for strongly hydrophobic compounds without ionizable groups.

3.2.5. Reproducibility, linearity, and limit of detection

The reproducibility and linearity of the NE-MEEKC method coupled with PAEKI and FASI preconcentration techniques were assessed using VK1 and VK2 as test analytes by measuring peak heights at the wavelength of maximum absorbance of 208 nm. The

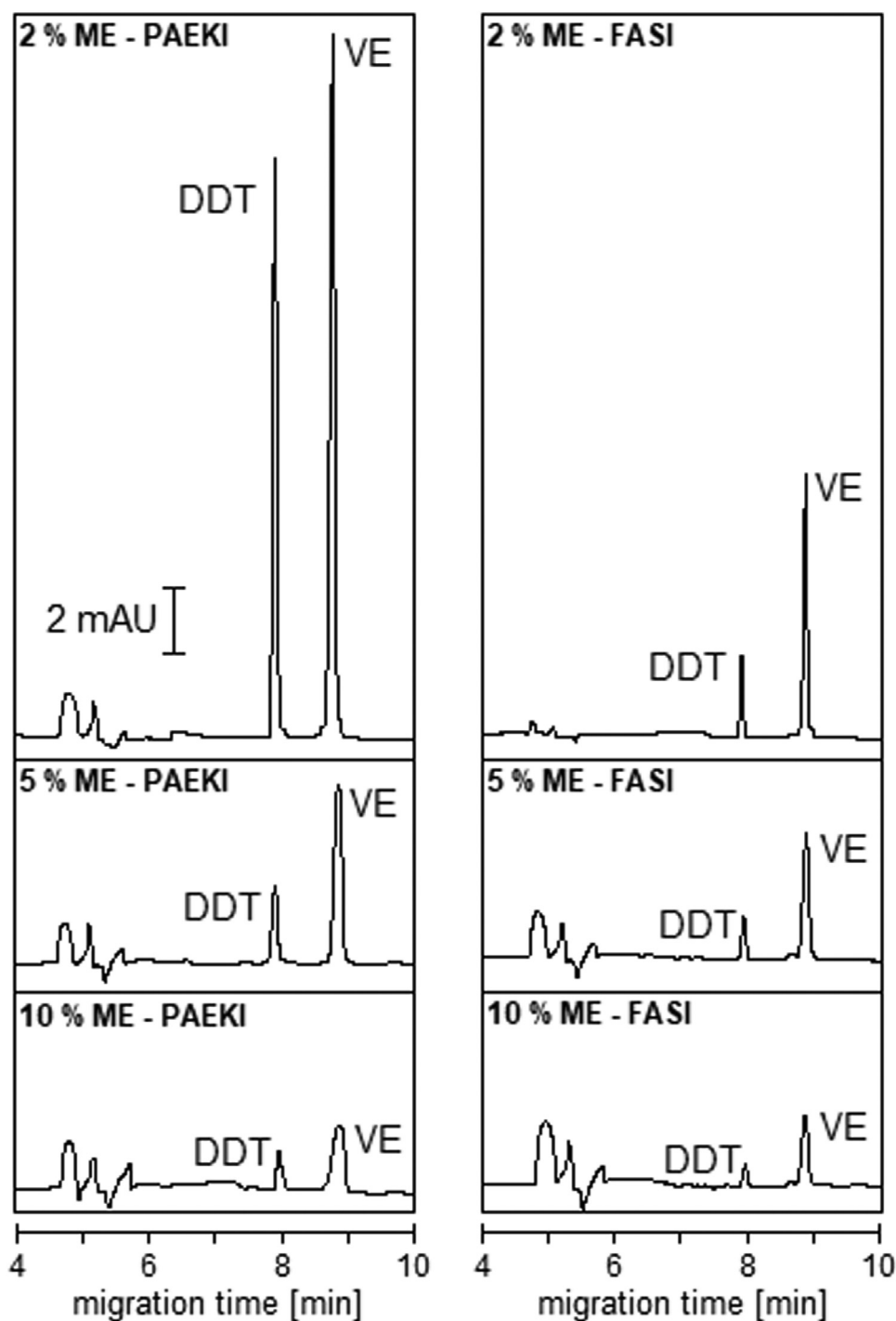


Fig. 2. Effect of cold dilution of the ME-1 BGE in the samples in combination with on-line pre-concentration FASI and PAEKI. Analytes concentration $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$; UV: 208 nm; capillary 40 cm, $50 \mu\text{m}$; other conditions are indicated in the Sections 2 and 3.2.1.

linearity of the method was determined in the range of concentrations for each analyte at $200\text{--}1500 \text{ ng mL}^{-1}$ for the NE-MEEKC-FASI and at $50\text{--}1000 \text{ ng mL}^{-1}$ for the NE-MEEKC-PAEKI in six replications ($n = 6$) for each concentration point. The calibration curves (Table 4) were obtained by least squares linear regression analysis and obtained coefficients of determination were excellent ($R^2 \geq 0.9957$)

Fig. 6 shows the electropherograms obtained for the analyte concentration of $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ used in the linearity study of the NE-MEEKC-PAEKI and NE-MEEKC-FASI methods. Methods applying NE matrices were compared to a 40-fold more concentrated sam-

ple ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) in the 100 % ME-1 matrix for the conventional hydrodynamic injection (HDI) method (0.5 psi, 5 sec). It should be noted that the HDI method shows a pre-concentration effect under the enhanced electric field due to the absence of $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ in the sample. The limit of quantification (LOQ) was calculated as the lowest concentration which the analyte signal was 10 times higher than that of the background noise (signal to noise S/N) whereas a precision and an accuracy was in range 80–120 % and <10%, respectively (Table 4). The limit of detection (LOD, $S/N = 3.3$) for VK1 using NE-MEEKC-FASI and NE-MEEKC-PAEKI was 66.0 and 17.6 ng mL^{-1} , respectively. For VK2, the LOD was 42.9 and

Table 4Selected validation parameters of the NE-MEEKC methods for the VK1 and VK2 determination ($n = 6$).

Analyte	Linear range (ng mL ⁻¹)	Equation	R ²	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)
NE-MEEKC-FASI					
VK1	200 – 1500	$y = (4.40 \pm 0.09)x - (83.26 \pm 71.39)$	0.9972	66.0	200.0
VK2	200 – 1500	$y = (7.96 \pm 0.13)x + (122.72 \pm 110.73)$	0.9985	42.9	130.0
NE-MEEKC-PAEKI					
VK1	50 – 1000	$y = (19.27 \pm 0.64)x - (351.77 \pm 301.28)$	0.9987	17.6	53.3
VK2	50 – 1000	$y = (25.77 \pm 0.46)x - (264.26 \pm 216.06)$	0.9957	12.1	36.6

x – analyte concentration, y – peak height

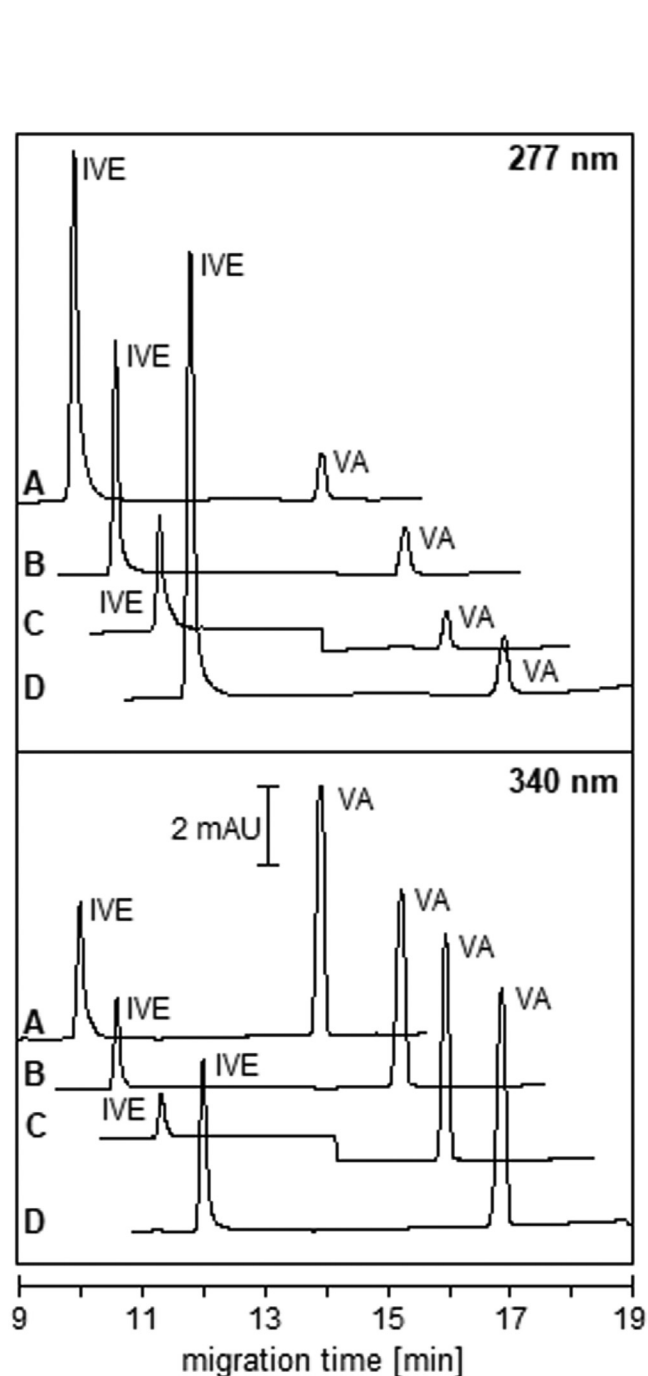


Fig. 3. The effect of the oil phase on the FASI preconcentration of hydrophobic analytes. A: SM – 2% ME-2, BGE – ME-2; B: SM – 2% ME-2, BGE – ME-3; C: SM – 2% ME-3, BGE – ME-3; D: SM – 2% ME-3, BGE – ME-2. Analyte concentration: 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; UV: 277 and 340 nm; capillary 40 cm, 50 μm ; FASI conditions are the same as indicated in Section 2; other conditions are indicated in the Section 3.2.2.

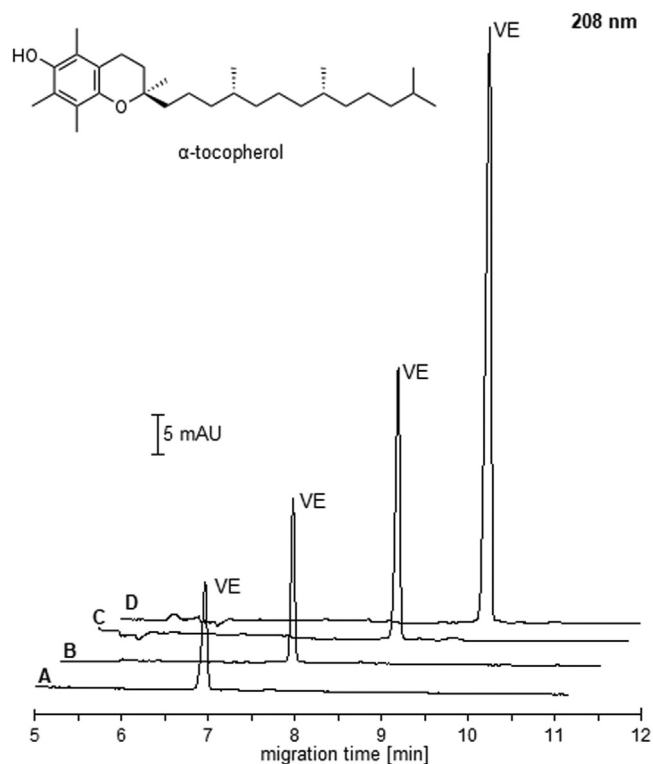


Fig. 4. Effect of sample matrix composition on the signal strength of vitamin E. A: 2% ME-4 without $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$; B: 1% ME-4 without $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$; C: 1% MS with $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$; D: 1% ME-4 with $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$. Analyte concentration: 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; UV: 208 nm; capillary: 40 cm, 50 μm , BGE: ME-1; PAEKI conditions are the same as indicated in Section 2.

12.1 ng mL^{-1} , correspondingly for each preconcentration method used.

3.2.6. Analysis of commercial tablet formulation and sensitivity enhancement

SM composition effect on NE-MEEKC-PAEKI method efficiency was investigated using a dietary supplement containing VK2 obtained from the fermentation product of soybeans. Removal of tablet excipients at the extraction stage prior to analysis was not necessary as the NE-MEEKC-PAEKI method provided adequate reproducibility. Hard tablet with a total mass of 0.4 g and a dose of 75 μg VK2 declared by the manufacturer was initially pulverized in a mortar, then 1 mg of the powder was transferred to an Eppendorf tube and dissolved in 1 mL of 2% ME-2 to give a concentration of 1 mg mL^{-1} of the test sample. For 10%, 50%, or 100% ME-2 concentrations, the sample was reconstituted in concentrated ME-2, then diluted with deionized water to a concentration of 2% ME-1 and 1 mg mL^{-1} .

As shown in Table 5, there is a strong linear correlation ($R^2 = 0.970$) between the mean recovery and the ME-1 concentration used to reconstitute the sample, with the best results obtained

Table 5

Average recovery and migration time values for VK2 analysed in the dietary supplement with using different concentrations of ME-2 for sample reconstitution. Note that all samples have a final concentration of 2% ME-2 prior to analysis ($n = 6$).

Concentrations of ME-2 used for sample reconstitution [$v v^{-1}$]	C foundAVG [μg]	RecoveryAVG [%]	RSD [%]	TmAVG [min]	TmRSD [%]	SEF
2 %	16.00	21.33	8.08	14.94	1.00	
10 %	25.43	33.91	7.73	14.93	1.02	
50 %	54.49	71.32	7.19	14.89	1.04	
100 %	72.58	96.78	6.94	14.91	1.01	45

C – concentration, AVG – average, RSD – relative standard deviation, Tm – migration time

SEF – compared to standard HDI method (0.5 psi, 5 s), whereas $\text{LOD}_{\text{HDI}} = 545 \text{ ng mL}^{-1}$ and the sample was not diluted with water prior to analysis (dilution factor = 50)

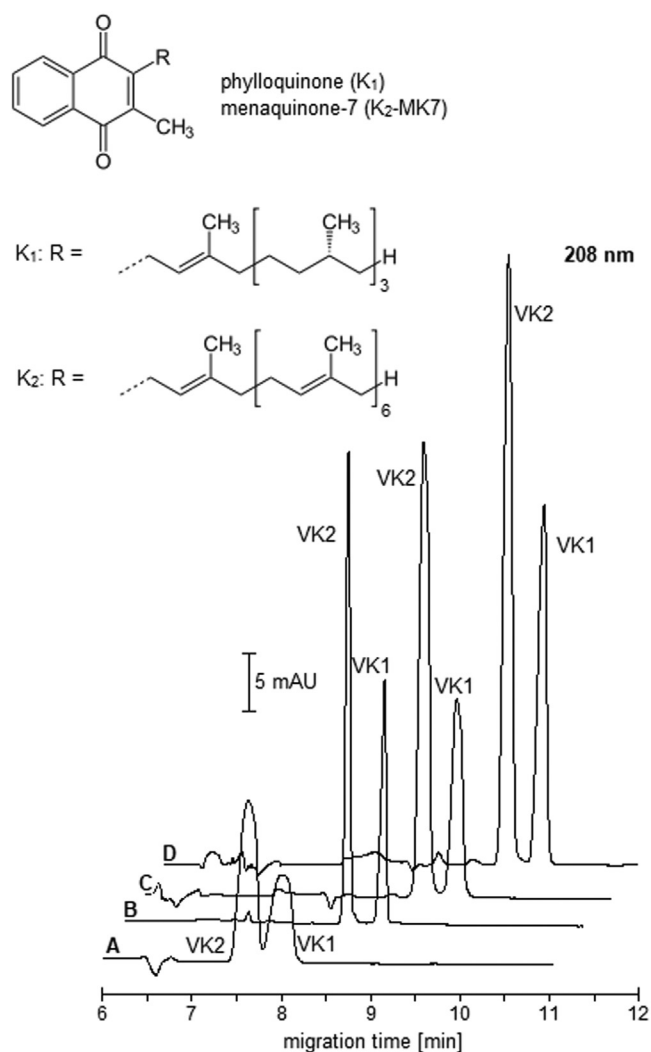


Fig. 5. Effect of sample matrix composition on the signal strength of vitamins K1 and K2. A: 5 % ME-4 with $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$; B: 2 % ME-4 without $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$; C: 2 % ME-4 with $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$; D: 1 % ME-4 without $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$. Analyte concentration: $1 \mu\text{g mL}^{-1}$; UV: 208 nm; capillary: 40 cm, 50 μm , BGE: ME-1; PAEKI conditions are the same as indicated in Section 2.

with 100% ME-1. This points to the conclusion that the lower the concentration of ME, the less reconstitution of highly hydrophobic compounds in the sample is. However, this problem was overcome by using initially concentrated ME-1 and converting it into NE (2% ME-1), which confirms that when the hydrophobic compound is dissolved in ME, it remains in a dispersed phase therein as it is diluted with water. The signal enhancement factor (SEF) for NE-MEEKC-PAEKI technique was determined as the ratio of the LODs to HDI method and 100 % ME for the weight concentrations of the

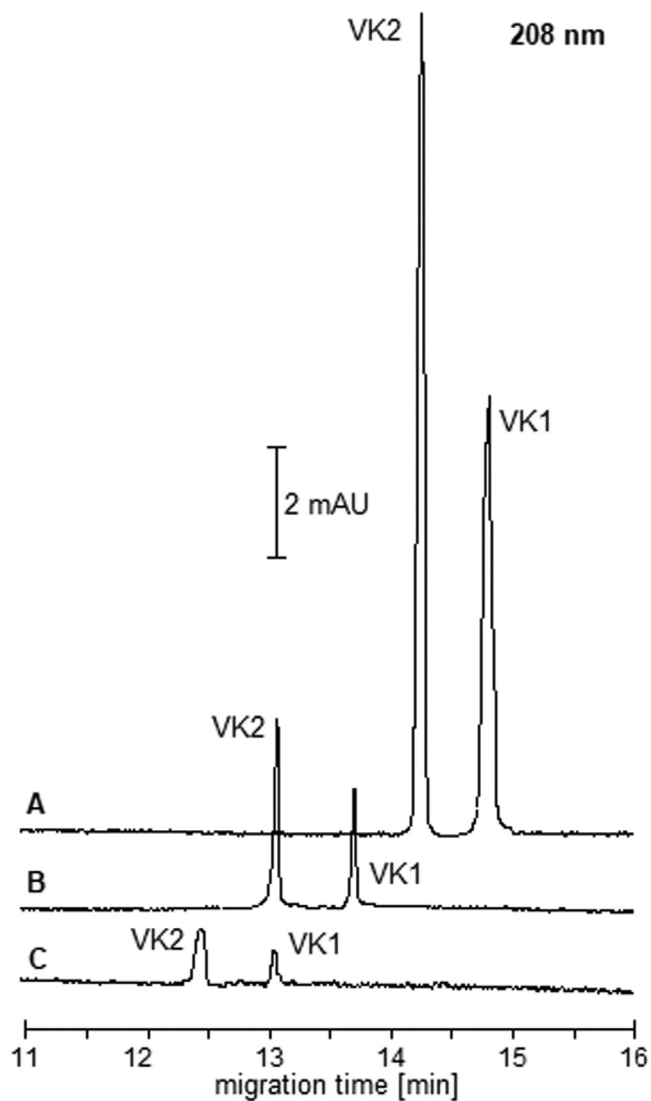


Fig. 6. Comparison of the amplification effect of PAEKI (A) and FASI (B) in combination with the NE matrix in relation to the typical HDI (C) and ME matrix. A: 2 % ME-1; B: 2 % ME-1; C: 100 % ME-1 without $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$; Analyte concentration A, B: 500 ng mL^{-1} ; C: $20 \mu\text{g mL}^{-1}$; UV: 208 nm; capillary: 50 cm, 50 μm , BGE: ME-1; HDI: 0.5 psi, 5 s; PAEKI and FASI conditions are the same as indicated in Section 2.

analyte in the powdered tablet, while the dilution factor was 50 (Table 5).

4. Conclusion

In this study, a sample matrix based on simple NE composition combined with MEEKC separation buffer solutions was introduced

for the first time to enhance the signal of highly hydrophobic compounds. The mechanism of NE formation relies on the dilution of the ME (used as a separation buffer) with water and diffusion of the co-surfactant molecules from the NE droplets into the aqueous phase. In consequence, the surface tension of the dispersed phase increased, resulting in the formation of larger NE droplets. Due to the interaction of hydrophobic compounds with the interior of NE droplets, possessing a negative charge on their surface, it was possible to apply in this study the preconcentration techniques based on electrokinetic injection, such as the FASI and PAEKI methods. Likewise, other techniques, such as anion-selective excessive injection (ASEI) and sweeping would be expected to be equally easy apply with NE-based matrices in the analysis of hydrophobic compounds. Moreover, in this study the relation between the presence of hydroxyl groups in the structure of the analyte and the conductivity of the sample on the signal enhancement capacity for the hydrophobic analyte was also demonstrated, indicating that NE matrices have greater potential for signal enhancement than micellar solutions. The LODs for VK1 using NE-MEEKC-FASI and NE-MEEKC-PAEKI were 66.0 and 17.6 ng mL⁻¹, respectively. For VK2, the LODs were 42.9 and 12.1 ng mL⁻¹, correspondingly for each preconcentration method used. The SEF value improvement in the NE-MEEKC method using PAEKI was 45-fold higher for VK2, than for conventional HDI in the analysis of the dietary supplement containing VK2 obtained from the fermentation product of soybeans.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

CRedit authorship contribution statement

Michał Pieckowski: Conceptualization, Methodology, Investigation, Validation, Visualization, Writing – original draft. **Piotr**

Kowalski: Methodology, Writing – original draft, Supervision. **Ilona Olędzka:** Methodology, Writing – review & editing. **Anna Roszkowska:** Writing – review & editing. **Alina Plenis:** Writing – review & editing. **Tomasz Bączek:** Writing – review & editing, Supervision.

References

- [1] S.M. Abdel-Samie, M. Nasr, in: *Drug Delivery Aspects*, Elsevier, 2020, pp. 227–245.
- [2] H. Nakajima, S. Tomomasa, M. Okabe, in: *Proceedings of the 1st World Emulsion Conference*, 1, Paris, EDS, 1993, pp. 1–11.
- [3] C. Solans, I. Solé, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 17 (2012) 246–254.
- [4] N.A.N. Azmi, A.A.M. Elgharabawy, S.R. Motlagh, N. Samsudin, H.M. Salleh, *Processes* 7 (2019) 617.
- [5] P. Taylor, R.H. Ottewill, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. ASP* 88 (1994) 303–316.
- [6] I. Solé, C. Solans, A. Maestro, C. González, J.M. Gutiérrez, *J. Colloid Interface Sci.* 376 (2012) 133–139.
- [7] H. Yang, Y. Ding, J. Cao, P. Li, *Electrophoresis* 34 (2013) 1273–1294.
- [8] L. Yu, K. Chu, H. Ye, X. Liu, L. Yu, X. Xu, G. Chen, *TrAC Trends Anal. Chem.* 34 (2012) 140–151.
- [9] K.D. Altria, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 171–186.
- [10] S.K. Poole, D. Durham, C. Kibbey, *J. Chromatogr. B* 745 (2000) 117–126.
- [11] K. Zang, J. Xia, C. Wu, S. Yang, W. Wang, Z.C. Zeng, L. Zhou, Q. Pu, *J. Chromatogr. A* 1635 (2021) 461729.
- [12] A. Bordagaray, R. Garcia-Arrona, M. Vidal, M. Ostra, *Food Chem.* 262 (2018) 129–133.
- [13] H. Ma, J. Li, H. Yu, Z. Li, X. Gao, Y. Chang, *Electrophoresis* 39 (2018) 2439–2445.
- [14] P. Seelanan, M. Srisa-art, A. Petsom, T. Nhujak, *Anal. Chim. Acta* 570 (2006) 8–14.
- [15] I. Olędzka, P. Kowalski, A. Bałuch, T. Bączek, J. Paradziew-Łukowicz, M. Taciak, B. Pastuszewska, *J. Sci. Food Agric.* 94 (2014) 544–551.
- [16] I. Olędzka, K. Kaźmierska, A. Plenis, B. Kamińska, T. Bączek, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102 (2015) 45–53.
- [17] C. Yin, Y. Cao, S. Ding, Y. Wang, *J. Chromatogr. A* 1193 (2008) 172–177.
- [18] J. Cao, J. Chen, L. Yi, P. Li, L.W. Qi, *Electrophoresis* 29 (2008) 2310–2320.
- [19] L. Suntornsuk, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 29–52.
- [20] R. Ryan, K. Altria, E. McEvoy, S. Donegan, J. Power, *Electrophoresis* 34 (2013) 159–177.
- [21] S. Paria, P.K. Yuet, *Ind. Eng. Chem. Res.* 45 (2006) 3552–3558.
- [22] C. Féliz, A. Molet, O. Núñez, *Chromatography* 2 (2015) 452–471.
- [23] Y. Cao, X. Ni, J. Sheng, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2598–2603.

5. Dorobek naukowy

5.1. Publikacje

1. Kowalski, P., Olędzka, I., Plenis, A., Miękus, N., Pieckowski, M., & Bączek, T. (2019). Combination of field amplified sample injection and hydrophobic interaction electrokinetic chromatography (FASI-HIEKC) as a signal amplification method for the determination of selected macrocyclic antibiotics. *Analytica Chimica Acta*, 1046, 192–198.
Punktacja IF = 5.977. Punktacja MNiSW: 100.
2. Pieckowski, M., Kowalski, P., & Bączek, T. (2020). Combination of large volume sample stacking with polarity switching and cyclodextrin electrokinetic chromatography (LVSS-PS-CDEKC) for the determination of selected preservatives in pharmaceuticals. *Talanta*, 211, 1–6.
Punktacja IF = 6.057. Punktacja MNiSW: 100.
3. Pieckowski, M., Kowalski, P., Olędzka, I., Miękus-Purwin, N., Plenis, A., Roszkowska, A., & Bączek, T. (2022). Simultaneous determination of mitotane, its metabolite, and five steroid hormones in urine samples by capillary electrophoresis using β -CD₂SDS₁ complexes as hydrophobic compounds solubilizers. *Electrophoresis*, 43, 990–997
Punktacja IF = 3.535. Punktacja MNiSW: 70.
4. Pieckowski, M., Kowalski, P., Olędzka, I., Roszkowska, A., Plenis, A., & Bączek, T. (2022). Nanoemulsion supported microemulsion electrokinetic chromatography coupled with selected preconcentration techniques as an approach for analysis of highly hydrophobic compounds. *Journal of Chromatography A*, 1677, 1–8.
Punktacja IF = 4.759. Punktacja MNiSW: 100.

5.2. Doniesienia zjazdowe i konferencje

1. Pieckowski, M., Kowalski, P., & Bączek, T. (2019). An on-line preconcentration strategy for the electrophoretic determination of selected preservatives in pharmaceuticals. W (Red.), *CECE 2019 : 16th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, Gdańsk, Poland, 24-26th September, 2019 : poster abstracts* (s. Abs. PS–19, 23).
2. Pieckowski, M., Kowalski, P., Olędzka, I., Plenis, A., Miękus, N., & Bączek, T. (2019). A field amplified sample injection (FASI) coupled with hydrophobic interaction electrokinetic chromatography (HIEKC) method for the signal enhancement of selected hydrophobic antibiotics. W (Red.), *CECE 2019 : 16th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, Gdańsk, Poland, 24-26th September, 2019 : poster abstracts* (s. Abs. PS–17, 21).

3. Kowalski, P., Pieckowski, M., Olędzka, I., Plenis, A., Miękus, N., & Bączek, T. (2020). Strategie wzmocnienia sygnału w technikach elektromigracyjnych w oparciu o oddziaływania hydrofobowe. W (red.), III Poznańska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa : Współczesna analityka farmaceutyczna i biomedyczna w ochronie zdrowia, on-line, Poznań, 04-05.06.2020 r. : [książka abstraktów] (s. 35). Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego.
4. Kowalski, P., Olędzka, I., Plenis, A., Miękus, N., Pieckowski, M., & Bączek, T. (2020). Elektroforetyczne oznaczanie wybranych grup antybiotyków w tkankach jadalnych zwierząt hodowlanych. W (red.), *XXVIII Ogólnopolskie Sympozjum Bromatologiczne : Innowacyjne podejście do bezpiecznej żywności i racjonalnego żywienia, Gdańsk, 28-29 września 2020 r. : program oraz streszczenia wystąpień konferencyjnych* (s. 42).
5. Pieckowski, M., Kowalski, P., Olędzka, I., Miękus-Purwin, N., Plenis, A., Roszkowska, A., & Bączek, T. (2021). Zastosowanie wzmocnienia sygnału w technikach elektromigracyjnych do oznaczeń śladowych ilości konserwantów. W (red.), *XXIV Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, (on-line), Lublin, 22-24.09.2021 r. : streszczenia wykładów i prezentacji posterowych* (s. 205). Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne.
6. Pieckowski, M., Kowalski, P., & Bączek, T. (2021). Jednoczesne oznaczenie mitotanu, jego metabolitu i siedmiu hormonów steroidowych w próbkach moczu za pomocą elektroforezy kapilarnej. W (red.), XXVI Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, [on-line], Gdańsk, 28-29 stycznia, 2021 : książka abstraktów (s. 72).
7. Kowalski, P., Pieckowski, M., Miękus, N., Olędzka, I., Plenis, A., Roszkowska, A., & Bączek, T. (2021). Preconcentration techniques in electrophoretic analysis of thyroid hormones. W (Red.), V4 Symposium Flow Analysis & Capillary Electrophoresis : FA&CE 2020, [on-line], Krakow, June 28 - July 1, 2021 : abstracts (s. 122). Jagiellonian University in Krakow.

5.3. Stypendia

Stypendysta projektu POWR.03.02.00-00-I014/17-00 współfinansowanego ze środków Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego