

**ADSORBENTY ZE ZWIĄZANYMI CIECZAMI
JONOWYMI I ICH WYKORZYSTANIE
W PRZYGOTOWANIU PRÓBEK
OLIGONUKLEOTYDÓW**

**ADSORBENTS WITH BONDED IONIC LIQUIDS
AND THEIR USE IN THE PREPARATION
OF OLIGONUCLEOTIDES SAMPLES**

**Łukasz Nuckowski, Ewa Zalesińska,
Sylwia Studzińska***

*Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń
e-mail: kowalska@chem.uni.torun.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Przegląd metod przygotowania próbek oligonukleotydów

1.1. Ekstrakcja do fazy stałej

2. Ciecze jonowe

2.1. Budowa i właściwości

2.2. Zastosowanie w ekstrakcji kwasów nukleinowych

3. Synteza i zastosowanie adsorbentów ze związanymi cząsteczkami cieczy jonowych

3.1. Adsorbenty węglowe

3.2. Adsorbenty polimerowe

3.3. Adsorbenty krzemionkowe

3.4. Zastosowanie adsorbentów ze związanymi cząsteczkami cieczy jonowych do ekstrakcji oligonukleotydów

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

Mgr Łukasz Nuckowski – w 2017 r. uzyskał stopień zawodowy magistra chemii w Katedrze Chemii Nieorganicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Obecnie pracuje nad doktoratem w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod opieką promotora dr hab. Sylwii Studzińskiej, prof. UMK. Tematem pracy jest opracowanie metod przygotowania próbek oligonukleotydów antysensownych z wykorzystaniem klasycznych i nowego typu adsorbentów. Jest autorem 11 publikacji, w tym 8 z listy JCR.



<https://orcid.org/0000-0003-2094-0182>

Ewa Zalesińska – w 2019 roku uzyskała tytuł zawodowy licencjata chemii w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Obecnie jest magistrantką w tym wydziale.



<https://orcid.org/0000-0001-5413-0749>

Dr hab. Sylwia Studzińska, prof. UMK - stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w 2009 r. za pracę nad wpływem cieczy jonowych na środowisko oraz ich chromatograficzną analizą. Pracę wykonała w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydziału Chemii, UMK w Toruniu pod kierunkiem prof. Bogusława Buszewskiego. Praca została nagrodzona w ogólnopolskim konkursie Komitetu Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk za najlepszą rozprawę doktorską z chemii analitycznej w 2010 r. Stypendystka Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, laureatka prestiżowego stypendium naukowego Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców oraz Komisji Analizy Chromatograficznej KChA PAN dla młodych pracowników nauki w dziedzinie metod rozdzielania. Od 2014 r. jest adiunktem w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky na Wydziale Chemii UMK w Toruniu, a w 2016 roku uzyskała tytuł doktora habilitowanego. Prowadzi badania nad chromatograficzną analizą i metabolizmem oligonukleotydów antysensownych w układach *in vitro* oraz *in vivo*.



<https://orcid.org/0000-0002-4658-7092>

ABSTRACT

Oligonucleotides are short fragments of nucleic acids. They have a growing potential in medicine, especially as diagnostic and therapeutic agents. In most cases, these compounds are determined in the complex biological matrix. Thus, the sample preparation step is very important in their bioanalysis. Solid-phase extraction is a predominant technique in this field. However, presently used for this purpose adsorbents have disadvantages. They ensure low extraction effectiveness and procedures using them are labor-intensive or time-consuming.

Ionic liquids, since their discovery, are objects of intensive interest of scientists. Their scientific attractiveness is connected with their unique properties. They are used in separation and sample preparation techniques, such as liquid-liquid extraction using water-immiscible ionic liquids. This approach was also used in the extraction of oligonucleotides.

Adsorbents modified with ionic-liquids have growing potential in extraction techniques. Few types of materials are used, namely carbon, polymers, and silica. A common feature of these materials modified with ionic liquids is the ion exchange character. Nonetheless, carbon nanomaterials are coated or covalently modified with ionic liquids, and they are used mainly for nonpolar compounds. Polymer and silica-based adsorbents are used mainly for acidic compounds. Polymers are characterized by the highest stability of the presented materials. Due to their ion-exchange properties crosslinked poly(ionic liquids) were used also for extraction of unmodified and modified oligonucleotides. The optimized procedure applying the material with bonded zwitterion ionic liquid gives high recoveries. It is concurrent for presently used adsorbents, thus solves problems connected with their usage. Moreover, it can be used for biological samples without any pre-purification.

Keywords: sample preparation, oligonucleotides, ionic liquids, adsorbents

Słowa kluczowe: przygotowanie próbek, oligonukleotydy, ciecze jonowe, adsorbenty

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

GO	– tlenek grafenu (ang. <i>Graphene Oxide</i>)
IL	– ciecz jonowa (ang. <i>Ionic Liquid</i>)
IPR	– odczynnik do tworzenia par jonowych (ang. <i>Ion Pair Reagent</i>)
LLE	– ekstrakcja ciecz-ciecz (ang. <i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
LNA	– zablokowany kwas nukleinowy (ang. <i>Locked Nucleic Acid</i>)
MIL	– magnetyczna ciecz jonowa (ang. <i>Magnetic Ionic Liquid</i>)
siRNA	– mały interferujący RNA (ang. <i>small interfering RNA</i>)
SPE	– ekstrakcja do fazy stałej (ang. <i>Solid-Phase Extraction</i>)
SPME	– mikroekstrakcja do fazy stałej (ang. <i>Solid Phase Microextraction</i>)

WPROWADZENIE

Oligonukleotydy to biopolimery, będące fragmentami kwasów nukleinowych. Mogą występować naturalnie, ale również syntezowane są celem szerokiego zastosowania. Związki te są obiektem badań, jako potencjalny czynnik diagnostyczny (mikroRNA) czy terapeutyczny (oligonukleotydy antysensowne) [1,2].

Oznaczanie oligonukleotydów jest istotnym zadaniem w kontekście badań klinicznych i potencjalną metodą diagnostyczną. Najczęściej wykorzystywaną w tym celu techniką jest chromatografia cieczowa [3]. Ze względu na to, że są one często oznaczane w złożonych matrycach stosowane są różne metody przygotowania próbek. Procedura przygotowania próbki powinna ona być możliwie prosta i zapewnić maksymalny odzysk analitu. Najpopularniejsze techniki oczyszczania próbek oligonukleotydów to strącanie białek, trawienie enzymatyczne, ekstrakcja ciecz-ciecz i ekstrakcja do fazy stałej [4]. Stosowane dotychczas metody przygotowania próbek posiadają swoje wady, m.in. niskie wartości odzysku, czasochłonność czy niska selektywność. Z tego względu koniecznym wydaje się poszukiwanie nowych materiałów do ekstrakcji oligonukleotydów do fazy stałej. Obiecującym w tym temacie jest zastosowanie adsorbentów ze związanymi na powierzchni cząsteczkami cieczy jonowych.

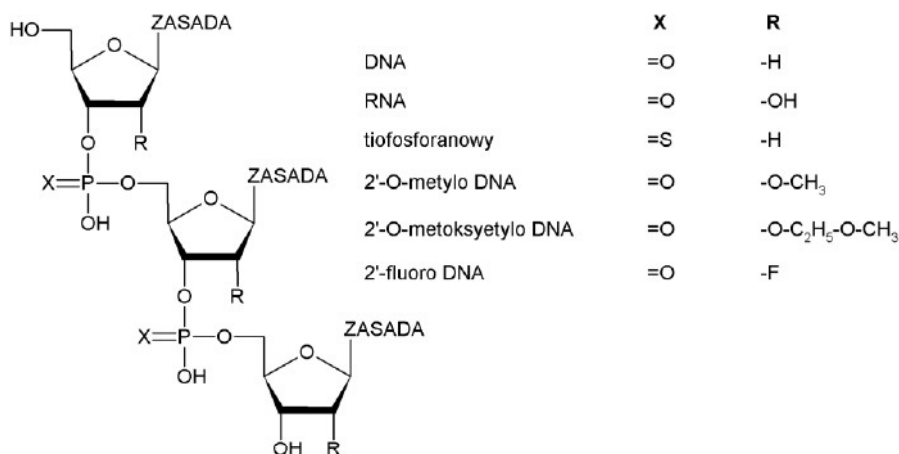
Ciecze jonowe to substancje w stanie ciekłym składające się wyłącznie z jonów: rozbudowanego organicznego kationu oraz nieorganicznego lub organicznego anionu [5]. Ze względu na swoją różnorodność ciecze jonowe charakteryzują się niezwykle wielorakimi właściwościami. Są one wykorzystywane w różnych dziedzinach nauki, w tym także w chemii analitycznej: technikach separacyjnych czy przygotowaniu próbek [6].

Adsorbenty modyfikowane cząsteczkami cieczy jonowych łączą zalety stałego nośnika i cieczy jonowej. Modyfikowane są takie materiały jak krzemionka, nośniki polimerowe, węglowe czy nanocząstki magnetyczne. Ich odpowiedni dobór pozwala na uzyskanie dużej pojemności sorpcyjnej, selektywności oraz zastosowanie ich do oczyszczania i zateżania analitów ze złożonych próbek [7].

1. PRZEGLĄD METOD PRZYGOTOWANIA PRÓBEK OLIGONUKLEOTYDÓW

Oligonukleotydy zbudowane są z monomerów, zwanych nukleotydami. Na pojedynczy oligonukleotyd składa się kilkanaście do kilkudziesięciu tych podstawowych jednostek, podczas gdy do budowy jednej nici kwasu nukleinowego potrzebnych jest ich kilka miliardów. Nukleotydy to estry fosforanowe nukleozydów, które zbudowane są cukru z grupy pentoz (rybozy lub deoksyrybozy) oraz zasady azotowej [8]. Podobnie jak w kwasach nukleinowych, w oligonukleotydach monomery łączą się ze sobą wiązaniem 3',5'-fosfodiastro-

wym. Anion ortofosforanowy łączy się z grupami hydroksylowymi w pozycji 3' jednej pentozy i 5' drugiej tworząc w ten sposób ujemnie naładowany rdzeń fosfocukrowy, do którego przyłączone są zasady azotowe (Rysunek 1) [8].



Rysunek 1. Fragment struktury oligonukleotydów i wybrane modyfikacje chemiczne
Figure 1. Fragment of a structure oligonucleotide and selected chemical modifications

Naturalnie występujące oligonukleotydy pełnią różne funkcje biologiczne. Przede wszystkim są prekursorami kwasów nukleinowych i produktami pośrednimi ich degradacji. Wpływają na przebieg wielu szlaków reakcji biologicznych. Można je także stosować jako startery do sekwencjonowania DNA. Ważną grupą naturalnie występujących oligonukleotydów są mikroRNA, które pełnią funkcję regulującą i mają istotne znaczenie dla onkogenezy. Są badane pod kątem diagnostycznym.

Naturalnie występujące oligonukleotydy są nietrwałe w układach biologicznych. Aby zwiększyć ich chemiczną stabilność syntezuje się oligonukleotydy, których struktura jest zmodyfikowana [9]. Mogą być to zmiany w obrębie zarówno grupy fosforanowej (np. oligonukleotydy tiofosforanowe), cukru (np. 2'-O-metylo DNA) i zasad azotowych (Rysunek 1) [10]. Chemicznie zmodyfikowane oligonukleotydy mogą komplementarnie wiązać się ze specyficznym fragmentem mRNA i tym samym blokować biosyntezę białek. Proces ten został wykorzystany w terapii antysensownej, stosowanej w leczeniu m.in. chorób metabolicznych, zapalnych, zakaźnych, neurologicznych i nowotworowych [11]. Poza terapeutycznym wykorzystaniem syntetycznych oligonukleotydów, stosowane są one także jako startery w reakcji łańcuchowej polimerazy, sondy oraz mikromacierze [12].

Oznaczanie oligonukleotydów antysensownych, jak i ich metabolitów jest niezbędnym elementem badań klinicznych. Pozwalają one ocenić czystość, ale także dostarczają informacji o aktywności leku. Oligonukleotydy zwykle oznaczane są w złożonych matrycach biologicznych. Przed chromatograficzną analizą niezbędne jest ich oczyszczenie [4]. Ekstrakcja analitu z matrycy biologicznej jest pierwszym krokiem we wszystkich metodach bioanalitycznych. Etap ten ma na celu przede wszystkim usunięcie związków przeszkadzających, ale także zatężenie analitu. Najczęściej stosowanymi technikami przygotowania próbek w analizie omawianych związków są: strącanie białek, trawienie enzymatyczne, ekstrakcja ciecz-ciecz oraz ekstrakcja do fazy stałej [4].

Oligonukleotydy wykazują duże powinowactwo do białek. Pozwala to na dystrybucję leków antysensownych w organizmie, ale skutecznie utrudnia analizę tych związków. Wszystkie stosowane metody ekstrakcji powinny umożliwić usunięcie białek z próbki. Najprostszą techniką używaną w tym celu jest strącanie białka za pomocą metanolu, octanu amonu lub acetonitrylu [4]. Jest ona stosowana do próbek osocza i homogenatów tkanek [13,14]. Uzyskane w tej technice wartości odzysku zwykle są niskie, co spowodowane jest niskim stężeniem oligonukleotydów i ich współstrącaniem z białkami. Wydajność tej metody zależy od wielkości i długości sekwencji oligonukleotydów [15].

Rozkład enzymatyczny jest kolejną techniką przygotowania próbek oligonukleotydów do analizy. Polega na enzymatycznym rozkładzie białek do aminokwasów z udziałem proteiny K. Technika ta znalazła zastosowanie w oczyszczaniu próbek osocza czy komórek nowotworowych zawierających siRNA [16,17]. Rozkład enzymatyczny białek nie jest jednak kompleksową metodą oczyszczania próbek oligonukleotydów. Ta technika pozwala usunąć jedynie białka. Aby próbkę oczyścić z innych związków należy użyć dodatkowych etapów przygotowania próbki [4].

Ekstrakcja ciecz-ciecz (ang. LLE, *Liquid-Liquid Extraction*) jest popularną i szeroko stosowaną techniką przygotowania próbek w chemii analitycznej, także w bioanalizie [4]. W przypadku przygotowania próbek oligonukleotydów za pomocą LLE stosuje się mieszaninę fenolu i chloroformu z dodatkiem alkoholu izoamyłowego [4]. Technika ta została z powodzeniem zastosowana do ekstrakcji oligonukleotydów z homogenatów różnych tkanek czy osocza różnych gatunków zwierząt [4,18,19]. Uzyskiwane wartości odzysków mieszczą się w granicach 80-95% [4,18,19]. LLE w analizie oligonukleotydów można stosować, jako prostą, jednoetapową metodę lub łączyć ją z innymi technikami oczyszczania próbek [4].

1.1. EKSTRAKCJA DO FAZY STAŁEJ

Ekstrakcja do fazy stałej (SPE, ang. *Solid Phase Extraction*) jest techniką szeroko stosowaną do ekstrakcji, oczyszczania i zateżnienia oligonukleotydów z próbek biologicznych. Są to polarne, anionowe związki, dlatego też najczęściej stosowane są dwa tryby: par jonowych i wymiany jonowej [4].

W trybie par jonowych stosowane są adsorbenty hydrofobowe, zarówno modyfikowana krzemionka, jak i polimery [4, 20–25]. Wykorzystywanymi są: Oasis HLB®, SDVB, żel krzemionkowy modyfikowany grupami alkilowymi (C18, C8, C2) czy fenylowymi [4, 20–25]. Aby umożliwić adsorpcję oligonukleotydów adsorbent poddaje się dynamicznej modyfikacji odczynnikiem do tworzenia par jonowych (IPR, ang. *Ion-Pair Reagent*). Najczęściej jest to sól alkiloaminy, którą kondycjonuje się złoże przed naniesieniem na nie próbki. Sprotonowana amina adsorbowana jest na powierzchni hydrofobowej fazy stałej tworząc rodzaj dynamicznego, słabego wymiennicza jonowego. Może on elektrostatycznie oddziaływać z anionowym oligonukleotydem. Jednocześnie, polarny analit z alkiloaminą tworzy parę jonową, która dzięki hydrofobowej grupie alkilowej jest zatrzymywana na powierzchni niepolarnego adsorbentu [4].

Jako IPR stosowane są m.in. wodorosiarczany tetrabutylaminy oraz mieszaniny 1,1,1,6,6,6-heksafluoroizopropanolu z trietyloaminą, tetrabutylaminą, heksyloaminą i dimetylobutylaminą [20–22,25]. Długi łańcuch alkiloaminy pozwala skutecznie zatrzymać oligonukleotyd, lecz zastosowanie np. heksyloaminy może utrudniać późniejszą elucję tego analitu ze złoża [20, 21]. W etapie wymywania zaadsorbowanego związku ze złoża stosowane są mieszaniny IPR i rozpuszczalnika organicznego. Na wartości odzysku największy wpływ mają pH tego roztworu i duża (50-90%) zawartość procentowa rozpuszczalnika organicznego [20–22]. SPE w trybie par jonowych stosowane jest do ekstrakcji oligonukleotydów o różnych modyfikacjach chemicznych, m.in. tiofosforanowych czy 2'-O-(metoksyetylowych) [4, 20–25]. Technika ta jest stosowana do izolacji i oczyszczania tych związków z próbek osocza, moczu, homogenatów tkanek [4, 20–25]. Użycie IPR w ekstrakcji oligonukleotydów wydłuża etap przygotowania próbek, ze względu na długi czas kondycjonowania złoża. Uzyskiwane wartości odzysku zwykle mieszczą się w granicach 65-90%, jednak silnie zależą od właściwości adsorbentu i analitu [4, 20–25].

W trybie wymiany jonowej stosowanej do ekstrakcji oligonukleotydów antysensownych wykorzystywane są głównie polimerowe adsorbenty ze związanymi grupami obdarzonymi ładunkami dodatnimi. Retencja oligonukleotydów jest możliwa dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym między tymi grupami, a ujemnie naładowanym łańcuchem fosforocukrowym [4]. Stosowane są komercyjnie dostępne adsorbenty, takie jak Clatiry OTX® i Oasis

WAX® [4, 26–29]. Anality nanoszone są na złożę w roztworze buforu o niskim pH (5,5), które umożliwia ich wiązanie. Do elucji oligonukleotydów z kolumnienki stosuje się bufor o wysokim pH (9,5) w mieszaninie z rozpuszczalnikiem organicznym (acetonitryl i tetrahydrofuran) [4,26–29]. pH roztworu używanego do elucji jest czynnikiem krytycznym w uzyskaniu wysokich wartości odzysku [26]. SPE w trybie wymiany jonowej stosowany jest do ekstrakcji oligonukleotydów antysensowych z próbek biologicznych, takich jak osocze i tkanki małp, szczurów i ludzi [4,26–29]. Wartości odzysków dla tych związków mieszczą się z zakresie 70-80% [26]. Podobnie jak w przypadku trybu par jonowych uzyskanie zadowalających wartości odzysku wymaga starannej optymalizacji parametrów ekstrakcji. W trybie wymiany jonowej często wykorzystywane są wysokie stężenia soli do elucji związków, co może utrudniać analizę otrzymanych próbek.

SPE może być stosowana jako pojedyncza technika przygotowania próbki, jednak częściej jest jednym z etapów złożonych procedur. Bez wstępnego oczyszczenia za pomocą rozkładu enzymatycznego czy LLE mieszaniną fenol/chloroform uzyskiwane są niskie wartości odzysku lub ekstrakcja jest niemożliwa. Kluczowym jest odpowiedni dobór adsorbentu, ponieważ od jego właściwości i właściwości analitu zależy efektywność ekstrakcji. Ponadto bez optymalizacji, wartości odzysku są niskie. Wadą obu trybów ekstrakcji są używane odczynniki. IPR wydłużają czas przeprowadzenia etapu przygotowania próbki, a tryb wymiany jonowej wykorzystuje często wysokie stężenia soli. Należy poszukiwać nowych materiałów, które można wykorzystać w ekstrakcji oligonukleotydów. Ze względu na swoje właściwości przydatnym w tym celu może okazać się zastosowanie adsorbentów ze związanymi cząsteczkami cieczy jonowych.

2. CIECZE JONOWE

Ciecze jonowe (ILs, ang. *Ionic Liquids*,) to związki organiczne, które charakteryzują się budową jonową, jednak niektóre definicje podają dodatkowo zakres temperaturowy, w której substancja musi mieć postać ciekłą, żeby być uznana za ciecz jonową, np. poniżej 100 °C, ale nie jest to konieczne. ILs, których temperatura topnienia wynosi mniej niż 30 °C nazywane są niskotemperaturowymi cieczami jonowymi (RTIL, ang. *Room-Temperature Ionic Liquids*) [30].

Różnorodność budowy jonów stosowanych w syntezie ILs pozwala na utworzenie wielu kombinacji kation-anion. Szacuje się, że można utworzyć aż 10^{18} różnych ILs. Praktycznie nieograniczone możliwości i wielki potencjał badawczy są jednymi z powodów intensywnego zainteresowania naukowców tymi substancjami [5]. Innym, równie ważnym powodem są niezwykle właściwości cieczy jonowych. Każde połączenie dwóch różnych jonów w IL powoduje otrzymana-

nie produktu o innych właściwościach. Dzięki temu można stworzyć substancję o pożądanym cechach [5].

2.1. BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI

ILs to obojętne pary jonowe składające się z rozbudowanego i niesymetrycznego kationu organicznego i anionu, zwykle o niewielkich rozmiarach. Kation w swojej strukturze zawiera atomu azotu, fosforu, siarki lub tlenu. Dodatni ładunek cząsteczki jest spowodowany obecnością czwartorzędowego atomu azotu lub fosforu. Istnieją również sulfoniowe i oksoniowe ILs, w których ładunek dodatni znajduje się na trzeciorzędowym atomie siarki lub tlenu [5]. Do syntezy najczęściej wykorzystywanych ILs stosuje się głównie heterocykliczne kationy: N,N'-dialkiloimidazoliowy i N-alkilopirydyniowy.

ILs charakteryzują się niskimi wartościami prężności par. Ponieważ nie emitują toksycznych par do środowiska i są dobrymi rozpuszczalnikami dla związków organicznych, coraz częściej zastępują klasyczne rozpuszczalniki organiczne [5].

Większość z ILs posiada niską temperaturę topnienia. Wartość ta zależy m.in. od rozkładu ładunku w jonach, symetrii jonów i możliwości tworzenia wiązań wodorowych [31]. Niskie wartości temperatur topnienia i wysokie wartości temperatur rozkładu ILs są przyczyną szerokiego zakresu temperatur, w którym ILs pozostają cieciami. Żaden klasyczny rozpuszczalnik nie jest cieczą w tak dużym zakresie temperatur, jak ILs. Rozpuszczalność tych związków w wodzie lub rozpuszczalnikach organicznych jest silnie skorelowana z ich temperaturami topnienia [32].

ILs są uznawane za rozpuszczalniki polarne. Właściwość ta dla popularnych, dialkiloimidazoliowych ILs jest zbliżona do niższych alkoholi. Rośnie ona wraz ze skróceniem podstawionych łańcuchów alkilowych oraz zmniejszaniem rozmiarów anionu [33,34]. Ze względu na budowę jonową ILs mogą przewodzić prąd elektryczny. Stosowane są jako elektrolity i modyfikatory elektrochemiczne. Zakres przewodnictwa cieczy jonowych waha się od 0,1 do 20 mS [33].

Gęstość ILs zależy przede wszystkim od długości łańcucha alkilowego kationu. Im więcej atomów węgla znajduje się w łańcuchu alkilowym, tym niższa jest gęstość. Dla RTIL gęstość zwykle jest wyższa niż gęstość wody i wynosi około 1,0-1,6 g·cm⁻³ [33]. Lepkość RTIL jest natomiast wyższa niż lepkość wody i również prawie dwa razy większa niż lepkość rozpuszczalników organicznych. Jej wartości zbliżone są do wartości charakteryzujących oleje [33]. Omawiana grupa związków należy do nietlonych i niepalnych. Jednak zapaleniu mogą ulegać produkty ich rozkładu, np. pochodne imidazolu [33, 35].

2.2. ZASTOSOWANIE W EKSTRAKCJI KWASÓW NUKLEINOWYCH

Ciecze jonowe dzięki różnym, nietypowym właściwościom znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach nauki, m.in. farmacji, biotechnologii, ekstrakcji rozpuszczalnikiem, elektrochemii, syntezie organicznej, katalizie, a także w technikach separacyjnych i przygotowaniu próbek [5,36]. Można je stosować jako modyfikatory powierzchni chromatograficznych faz stacjonarnych, dodatki do fazy ruchomej lub elektroosmotyczne modyfikatory przepływu. Powleka się nimi także ściany kapilary w elektroforezie kapilarnej i micelarnej chromatografii elektrokinetycznej [36,37]. Stosowane są w LLE prostych kationów nieorganicznych, ale także wielu związków organicznych i biocząsteczek. Wśród nich znajdują się kwasy nukleinowe i syntetyczne oligonukleotydy.

Wang i współpracownicy [38] do ekstrakcji DNA za pomocą LLE wykorzystali heksafluorofosforan 1-butylo-3-metyloimidazoliowy, który słabo miesza się z wodą. W trakcie ekstrakcji prawdopodobnie powstają addukty pomiędzy grupami fosforanowymi kwasu nukleinowego, a kationem 1-butylo-3-metyloimidazoliowym i w tej postaci cząsteczka ekstrahowana jest do fazy organicznej. Pomimo prostoty i dużej wydajności ekstrakcji DNA do IL, nadal występują problemy z odzyskaniem analitu z fazy organicznej [38].

Anderson i współpracownicy [39] do ekstrakcji syntetycznych oligonukleotydów, podwójnych nici DNA i DNA łososia zastosowali magnetyczne ciecze jonowe (MIL, ang. *Magnetic Ionic Liquids*). MIL to grupa związków, które poza właściwościami klasycznych ILs wykazuje silne oddziaływanie z polem magnetycznym. Autorzy zastosowali dwie techniki ekstrakcji [37]. Pierwsza polegała na zawieszeniu kropli MIL na pręcie magnetycznym, a druga na wytrząsaniu próbki z MIL i umieszczeniu próbki w polu magnetycznym w celu separacji faz. Wydajność ekstrakcji zależała od rodzaju MIL i analitu, co pozwalała na dostosowywanie MIL do potrzeb ekstrakcji danej cząsteczki DNA i zwiększenie jej selektywności. Oligonukleotydy odzyskiwano przez rozpuszczenie MIL w roztworze octanu potasu i oczyszczenie na sorbencie krzemionkowym, a następnie strącenie oligonukleotydów etanolem. Wartość odzysku DNA łososia wynosiła $57 \pm 6\%$ [39].

Duża lepkość ILs może znacznie utrudniać separację faz w LLE. Zastosowanie MIL ułatwia ten proces, jednak nadal dużym problemem pozostaje częściowa rozpuszczalność IL, która utrudnia a nawet uniemożliwia analizę oligonukleotydów. Rozwiązaniem może być zastosowanie SPE z użyciem adsorbentów ze związanymi cząsteczkami ILs.

3. SYNTEZA I ZASTOSOWANIE ADSORBENTÓW ZE ZWIĄZANymi CZĄSTECZKAMI CIECZY JONOWYCH

Wiele badań koncentruje się na kowalencyjnym unieruchomieniu ILs na powierzchni różnych typów adsorbentów. W ten sposób przestają być one cieczą, ale zachowują wiele charakterystycznych właściwości [40]. Materiały modyfikowane ILs, takie jak krzemionka, nośniki polimerowe, nanocząsteczki magnetyczne lub nanorurki węglowe od lat z powodzeniem są stosowane do ekstrakcji różnych związków chemicznych [41].

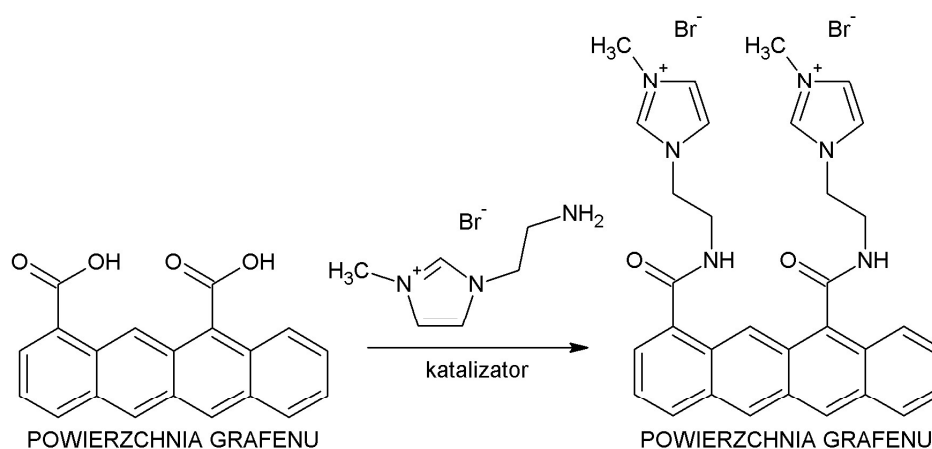
3.1. ADSORBENTY WĘGLOWE

W technikach ekstrakcyjnych zastosowanie znalazły różne rodzaje materiałów węglowych: fullereny, nanorurki węglowe, nanowłókna, nanorogi i grafen [42]. Materiały te, funkcjonalizowane ILs, wykorzystywane są do ekstrakcji różnych związków: pochodnych benzenu i fenolu [43–45], ftalanów [46], barwników [47,48], tiochromanonów [49], herbicydów [50], steroidów i β -blokerów [51]. Najczęściej są to próbki środowiskowe [43–45,50,51], ale także żywności [47], polimerów [46] i biologiczne [48,49]. Wartości odzysku analitów przy użyciu materiałów węglowych modyfikowanych ILs zależą głównie od polarności związków i są wyższe dla związków bardziej polarnych. Zwykle mieszczą się w granicach 80-100%. Są to wartości porównywalne, lub nawet wyższe niż te uzyskiwane przy zastosowaniu innych adsorbentów [46, 47, 51].

Niezemodyfikowane adsorbenty węglowe nie posiadają grup funkcyjnych na powierzchni i ich modyfikacja może polegać jedynie na niekowalencyjnej adsorpcji IL na powierzchni [41]. Testowano wpływ struktury kationów IL, którymi pokrywano nanorurki węglowe na wartości odzysków [45]. Użyto trzech popularnych związków: heksafluorfosforan butylo-, heksylo- i oktyloimidazoliowy. Najniższe wartości odzysku uzyskano dla IL z najdłuższym łańcuchem alkilowym. Jego długość może mieć niekorzystny wpływ na zdolność przenoszenia masy. Najlepsze wyniki uzyskano dla ILs z łańcuchem butylowym [47].

Dużo większe możliwości modyfikacji dają materiały węglowe modyfikowane, takie jak tlenek grafenu (GO, ang. *Graphene Oxide*). Umożliwiają one kowalencyjne przyłączenie ILs do powierzchni. Przykładowo, powierzchnia GO została zmodyfikowana przez reakcję amidowania, zachodzącą pomiędzy grupami aminowymi IL, a grupami karboksylowymi GO (Rysunek 2). Shi i współpracownicy [46] porównali wpływ kationu IL i przeciwjonu na wartości odzysków analitów (ftalanów). GO modyfikowany był bromkami i bis(trifluorometylosulfonylo)imidkami 1-aminoetylo-3-metyloimidazoliowymi i 1-aminopropylo-3-metyloimidazoliowymi. Zarówno przeciwjon jak i długość łańcucha alkilowego miały wpływ na wydajność ekstrakcji. Dłuższy łańcuch

i większy, bardziej hydrofobowy anion pozwalały uzyskać mniejsze wartości odzysku [46]. Tendencje są podobne do tych zaobserwowanych przy niekowalencyjnej modyfikacji materiałów węglowych, zatem są niezależne od sposobu modyfikacji [46,50]. Omawiane adsorbenty charakteryzują się ponad dziesięciokrotnie większą pojemnością sorpcyjną niż niezmodyfikowany GO. Zastosowanie ich do przygotowania próbek pozwoliło na zwiększenie czułości metody analitycznej względem dotychczas prezentowanych w literaturze wyników [46].



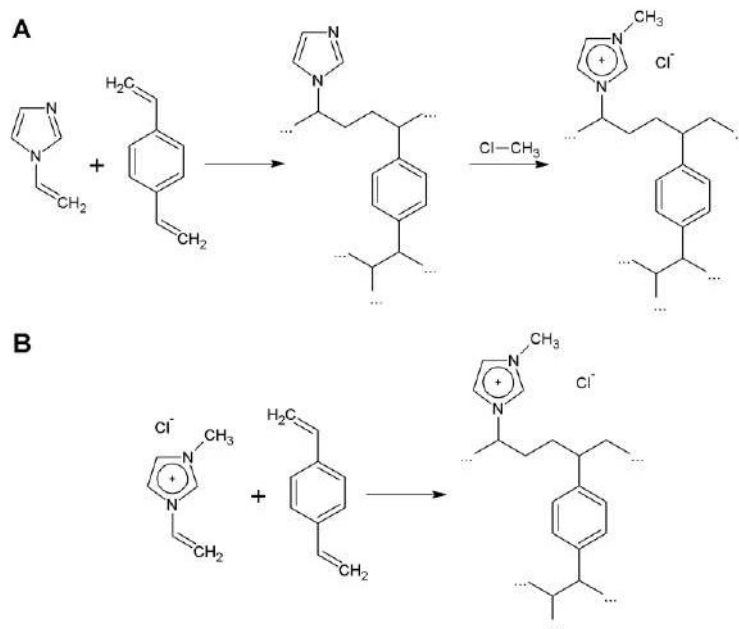
Rysunek 2. Sposób modyfikacji powierzchni tlenku grafenu cieczami jonowymi (na podstawie [46])
Figure 2. Modification of the graphene oxide surface with ionic liquids (based on [46]).

Materiały węglowe modyfikowane ILs charakteryzuje wiele zalet. Poza wysokimi wartościami odzysku umożliwiają uproszczenie procedur ekstrakcji i skrócenie jej czasu. Niestety, materiały te mogą być podatne na destabilizację struktury i zmianę właściwości mechanicznych.

3.2. ADSORBENTY POLIMEROWE

Materiały polimerowe mają kilka zalet, które mogą je wyróżniać wobec innych materiałów stosowanych w SPE. Charakteryzują się większą gęstością pokrycia grupami funkcyjnymi i szerszym zakresem stabilności w zależności od pH w porównaniu z adsorbentami syntezowanymi na bazie krzemionki. Ich właściwości mogą być polepszone dzięki ich modyfikowaniu cząsteczkami ILs.

Polimerowe adsorbenty z wbudowanymi ILs mogą być syntezowane na dwa sposoby (Rysunek 3). Pierwszy to modyfikacja powierzchni polimeru (Rysunek 3A), drugi to polimeryzacja polimeryzowalnej IL (Rysunek 3B).



Rysunek 3. Sposoby syntezy polimerowych adsorbentów z wbudowanymi cząsteczkami cieczy jonowych (na podstawie [52, 53])

Figure 3. Methods of synthesis of polymeric adsorbents with embedded particles of ionic liquid (based on [52, 53])

Polimerowe adsorbenty ze związanymi ILs są stosowane do ekstrakcji prostych anionów nieorganicznych [54–56], ale także wielu związków organicznych, m.in. farmaceutyków [53], związków endokrynnie czynnych [52], związków naturalnych [57, 58], czy estrów [59]. Najczęściej adsorbenty te wykorzystywane są do ekstrakcji z próbek wodnych [52–56], ale także produktów spożywczych [56–59] czy matryc biologicznych [52]. Polimery z wbudowanymi cząsteczkami ILs upakowywane są do klasycznych kolumniek SPE [53,57,58], ale także pokrywane są nimi włókna SPME [52, 59], wirujące masy sorpcyjne [54] i nanocząstki magnetyczne [55, 56].

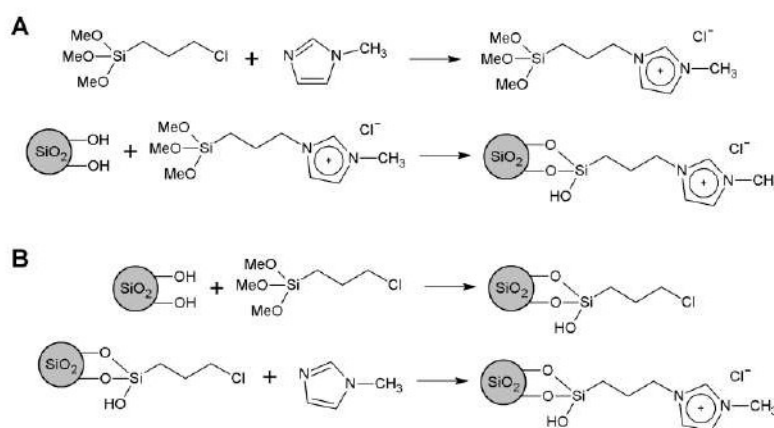
W strukturze tych adsorbentów istnieje ładunek dodatni, dlatego w przypadku ekstrakcji anionów retencja opiera się na oddziaływaniach elektrostatycznych. Do elucji analitów stosowany jest odczynnik o dużej sile elucyjnej dla trybu wymiany jonowej, np. roztwór HNO₃ lub NaOH [54–56]. Wartości odzysku z polimerowych adsorbentów modyfikowanych ILs zależą od kwasowych właściwości ekstrahowanych związków. Związki zasadowe są zwykle eluowane w etapie przemywania złoża, a kwasowe ($pK_a < 5$) są ekstrahowane z wysokimi wartościami odzysku (50-100%) [53].

W przypadku ekstrakcji związków organicznych niejonowych retencja jest możliwa dzięki oddziaływaniom π i hydrofobowym [52]. W takich przypadkach do elucji konieczne jest zastosowanie rozpuszczalników organicznych [52, 57, 60]. Wu i współpracownicy [52] uzyskali wartości odzysku związków endokrynnie czynnych z próbek wody i moczu ludzkiego w granicach od 70,6% do 119%. Uzyskane wartości były większe niż te uzyskane z zastosowaniem krzemionki modyfikowanej grupami oktadecylowymi (C18) czy grafitowanego węgla [52]. Podobne wyniki uzyskali Tian i współpracownicy [57] dla kofeiny i teofiliny.

Zastosowanie polimerowych adsorbentów ze związanymi cząsteczkami ILs do ekstrakcji ma wiele zalet. Procedury są proste. Materiały te zapewniają wysokie wartości odzysku i powtarzalność, efektywną ekstrakcję związków kwasowych, ale także hydrofobowych. Mogą być wykorzystywane wielokrotnie, a uzyskiwane wartości odzysków są porównywalne lub wyższe z adsorbentami komercyjnie dostępnymi [53, 57, 58].

3.2. ADSORBENTY KRZEMIONKOWE

Krzemionka jest modyfikowana ILs w różnych celach, m.in. do zastosowania w technikach separacyjnych i ekstrakcji [40, 61, 62]. Synteza omawianych adsorbentów może odbywać się na dwa sposoby (Rysunek 4). W pierwszej metodzie otrzymywany jest alkoksylan ze związaną cząsteczką IL, którym to następnie modyfikowana jest powierzchnia aktywowanej krzemionki (Rysunek 4A). W innym podejściu najpierw powierzchnia adsorbentu modyfikowana jest alkoksylanem, który później modyfikowany jest do postaci IL (Rysunek 4B).



Rysunek 4. Dwa sposoby modyfikacji powierzchni krzemionki metylimidazoliową cieczą jonową (na podstawie [63, 64])

Figure 4. Two ways to modify the silica surface with methylimidazolium ionic liquid (based on [63, 64])

Zakres stosowania adsorbentów krzemionkowych modyfikowanych ILs obejmuje związki naturalne [60,65–68], herbicydy [63], kwasy organiczne, amidy, aldehydy i estry [64,69,70]. Używane są do ekstrakcji głównie z materiałów roślinnych [60,65–68], ale także próbek wód i gleb [63] czy aerozolu atmosferycznego [69].

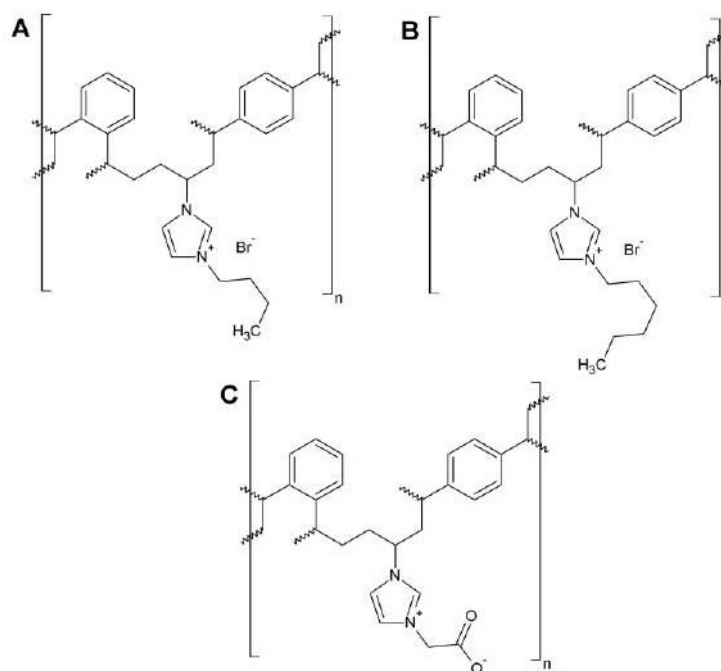
Adsorpcja wymienionych związków opiera się głównie na oddziaływaniach elektrostatycznych. Podobnie do polimerowych adsorbentów, krzemionka modyfikowana ILs znajduje zastosowanie w ekstrakcji związków kwasowych. Vidal i współpracownicy [69] przetestowali możliwość ekstrakcji grupy związków, wśród których oprócz kwasów organicznych były aldehydy i aminy. Wartości odzysków związków zasadowych i obojętnych były niskie, zwykle poniżej 30% [69]. Do elucji analitów kwasowych stosowane są zwykle roztwory kwasów (solnego lub octowego) z dodatkiem rozpuszczalników organicznych (metanolu lub acetonitrylu). Wartości odzysków są wysokie, powyżej 80% [60, 63–65, 69]. Co ciekawe, w wielu przypadkach parametr ten jest wyższy niż w przypadku zastosowania C18 [60, 63, 66]. Na wartość odzysku analitu może mieć wpływ kilka czynników. Jednym z nich jest rodzaj przeciwjonu. ILs z anionem chlorkowym są stosowane do związków polarnych [60, 65–68]. Zmiana przeciwjonu zmienia hydrofobowość adsorbentu, tym samym zmieniają się jego zdolności adsorpcyjne. Zastąpienie anionu chlorkowego anionem pentafluorofosforowym lub tetrafluoroboranowym umożliwi efektywną ekstrakcję związków mniej polarnych [63, 70].

Poza przeciwjonem na ekstrakcję może mieć wpływ struktura IL. Row i współpracownicy [64] otrzymali trzy adsorbenty: krzemionkę modyfikowaną imidazolem, 1-metyloimidazolem i 2-etylo-4-metyloimidazolem. Zwiększenie ilości grup metylowych przyłączonych do pierścienia imidazoliowego zwiększało hydrofobowość adsorbentu i zawadę steryczną, a tym samym zmniejszało jego pojemność sorpcyjną [64]. Vidal i współpracownicy [69] z kolei porównują podobne adsorbenty, ale zamiast modyfikacji 2-etylo-4-metyloimidazolem zastosowali 3-(propylo-3-sulfonowo)imidazol. Wydłużanie łańcucha alkilowego powodowało niewielki wzrost wartości odzysku analitów kwasowych. Najwyższe wartości uzyskano dla ostatniego adsorbentu. Ponadto grupa sulfonowa w jego strukturze pozwoliła na znaczące zwiększenie wartości odzysków w przypadku analitów o charakterze zasadowym.

Krzemionka modyfikowana ILs może mieć szerokie zastosowanie i niewątpliwie jest konkurencyjna wobec dotychczas stosowanych adsorbentów. Uzyskiwane są wysokie wartości odzysku i dobra odtwarzalność. Możliwa jest ekstrakcja z różnych matryc. Należy jednak pamiętać o ograniczeniach wynikających z użycia nośnika krzemionkowego, choćby węższy zakres pH niż w przypadku polimerów.

3.4. ZASTOSOWANIE ADSORBENTÓW ZE ZWIĄZANYMI CZĄSTECZKAMI CIECZY JONOWYCH DO EKSTRAKЦИИ OLIGONUKLEOTYDÓW

Adsorbenty modyfikowane ILs zostały w ostatnim czasie po raz pierwszy zastosowane także do ekstrakcji niemodyfikowanych i modyfikowanych oligonukleotydów [71]. Testowano trzy usieciowane poli(ciecze jonowe) (Rysunek 5), otrzymane w reakcji wolnorodnikowej polimeryzacji cieczy jonowych z grupą winylową i diwinylobenzenu. Dwie z nich były homologicznymi alkilopochodnymi imidazolu (Rysunek 5A, 5B), a trzecia w swojej strukturze posiadała grupę imidazoliową i karboksylową (Rysunek 5C). Oligonukleotydy adsorbowane były na powierzchni tych nośników z roztworów o niskim pH = 4. Możliwe jest to przede wszystkim dzięki elektrostatycznemu przyciąganiu dodatnio naładowanego pierścienia imidazoliowego i ujemnie naładowanego łańcucha fosforo-cukrowego analitu. Możliwe są także oddziaływania typu π , np. między pierścieniami aromatycznymi adsorbentu i zasad azotowych.



Rysunek 5. Struktury adsorbentów wykorzystywanych od ekstrakcji oligonukleotydów
 Figure 5. The structures of the adsorbents used for the extraction of oligonucleotides

Doboru rozpuszczalnika do elucji dokonano przez przetestowanie wpływu różnych parametrów na wartość odzysku analitu. Parametrami tymi były: rodzaj soli nieorganicznej i organicznej, rodzaj rozpuszczalnika organicznego, stężenie i pH soli [71]. Dla adsorbentów ze związanymi alkilimidazoliowymi ILs (Rysunek 5A, 5B) elucja możliwa była przy zastosowaniu wysokiego stężenia soli nieorganicznej (NaClO_4) w buforze o $\text{pH} = 8,0$ i 50% v/v dodatku metanolu.

W końcowej procedurze ekstrakcji zastosowano jednak poli(2-(1-winyloimidazoliumylo)octan-*co*-diwinylobenzen (Rysunek 5C). Jego wypadkowy ładunek powierzchniowy zależy od pH dzięki związanej grupie karboksylowej. W wysokim pH ładunek pierścieni imidazoliowych jest neutralizowany, a ładunek przypowierzchniowy staje się ujemny. Umożliwia to elektrostatyczne odpychanie analitu od adsorbentu i skuteczną desorpcję. Elucja oligonukleotydów roztworem 5 mM roztworu octanu amonu o $\text{pH} = 9,5$ w mieszaninie z metanolem w stosunku 50/50 v/v, pozwoliła na uzyskanie wartości odzysku wyższej niż 90% dla oligonukleotydów tiofosforanowych i z modyfikacją 2'-O-metoksylową [71]. Dla modyfikacji 2'-O-(metoksyetoksylowej) i LNA wartości te były niższe, odpowiednio ok. 70 i 60%. Procedurę z powodzeniem zastosowano również w przygotowaniu próbek wzbogaconego oligonukleotydami 2'-O-metoksyłowymi osocza ludzkiego. Uzyskane wartości odzysku związku macierzystego i dwóch syntetycznych metabolitów mieściły się w zakresie 80-84%.

Co warto podkreślić, procedura nie wymagała wcześniejszego przygotowania próbki za pomocą LLE mieszaniną fenol/chloroform czy rozkładu enzymatycznego białek. Mimo to charakteryzowała się wysokimi wartościami odzysku i odtwarzalnością [71]. W przeciwieństwie do trybu par jonowych nie wymagała długiego czasu kondycjonowania złoża. Zastosowanie adsorbentu, którego ładunek przypowierzchniowy jest zależny od pH pozwoliło na skuteczną desorpcję oligonukleotydów roztworami soli organicznych o niskim stężeniu. Jest to przeciwieństwo do trybu wymiany jonowej, gdzie zwykle konieczne jest zastosowanie wysokiego stężenia nieorganicznych soli. Reasumując opracowana metoda ekstrakcji ma wiele zalet w porównaniu do stosowanych dotychczas i może być z powodzeniem stosowana w rutynowym przygotowaniu próbek oligonukleotydów.

UWAGI KOŃCOWE

Rosnące znaczenie terapeutyczne i diagnostyczne oligonukleotydów wiąże się z rozwojem ich analityki, a jednocześnie opracowywaniem nowych metod przygotowania próbek. Adsorbenty stosowane dotychczas w ekstrakcji tych związków mają wady, które mogą utrudniać ich zastosowanie w praktyce laboratoryjnej.

Prezentowane w literaturze wyniki badań sugerują, że obiecującym podejściem w tej tematyce może być LLE z zastosowaniem ILs, jednak niemożliwe jest wykorzys-

tanie jej do oczyszczania próbek oligonukleotydów przed analizą chromatograficzną. Możliwe jest natomiast zastosowanie adsorbentów, które cząsteczki ILs mają związane na powierzchni. Adsorbenty takie z powodzeniem zostały zastosowane w przypadku różnych analitów, pozwalając na uzyskanie wysokich wartości odzysku, często wyższe niż z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych materiałów.

Wyniki najnowszych badań pokazują, że SPE z wykorzystaniem usieciowanych poli(cieczy jonowych) może być konkurencyjna względem dotychczas stosowanych w przygotowaniu próbek oligonukleotydów metod. Możliwe jest uzyskanie wysokich wartości odzysku, odtwarzalności, a jednocześnie nie wymagane jest łączenie tej techniki z innymi, wstępnie oczyszczającymi próbkę.

PODZIĘKOWANIE

Praca wydana w ramach grantu Sonata Bis nr 2016/22/E/ST4/00478 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J. Wang, J. Chen, S. Sen, *J. Cell. Physiol.*, 2016, **231**, 25.
- [2] C.A. Stein, D. Castanotto, *Mol. Ther.*, 2017, **25**, 1069.
- [3] A.C. McGinnis, B. Chen, M.G. Bartlett, *J. Chromatogr. B*, 2012, **883–884**, 76.
- [4] Ł. Nuckowski, A. Kaczmarkiewicz, S. Studzińska, *J. Chromatogr. B*, 2018, **1090**, 90.
- [5] D.R. MacFarlane, M. Kar, J.M. Pringle, *Fundamentals of Ionic Liquids*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2017.
- [6] J. Liu, G. Jiang, J. Liu, J.Å. Jönsson, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2005, **24**, 20.
- [7] N. Fontanals, F. Borrull, R.M. Marcé, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2012, **41**, 15.
- [8] V.W. Rodwell, D.A. Bender, K.M. Botham, P.J. Kennelly, P.A. Weil, *Biochemia Harpera Ilustrowana*, PZWL Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa, 2018.
- [9] Z.J. Lin, W. Li, G. Dai, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, **44**, 330.
- [10] E. Urban, C.R. Noe, *Farmaco.*, 2003, **58**, 243.
- [11] J. Goodchild (edytor), *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, Humana Press, New York, 2011.
- [12] B.S. Sproat, *J. Biotechnol.*, 1995, **41**, 221.
- [13] V. Arora, D.C. Knapp, M.T. Reddy, D.D. Weller, P.L. Iversen, *J. Pharm. Sci.*, 2002, **91**, 1009.
- [14] G.R. Devi, T.M. Beer, C.L. Corless, V. Arora, D.L. Weller, P.L. Iversen, *Clin. Cancer Res.*, 2005, **11**, 3930.
- [15] S. Studzińska, R. Rola, B. Buszewski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 1585.
- [16] Q. Tian, J. Rogness, M. Meng, Z. Li, *Bioanalysis*, 2017, **9**, 861.
- [17] A.C. McGinnis, B.S. Cummings, M.G. Bartlett, *Anal. Chim. Acta*, 2013, **799**, 57.
- [18] B. Chen, M.G. Bartlett, *J. Chromatogr. A*, 2013, **1288**, 73.
- [19] P. Turnpenny, J. Rawal, T. Schardt, S. Lamoratta, H. Mueller, M. Weber, K. Brady, *Bioanalysis*, 2011, **3**, 1911.
- [20] Ł. Nuckowski, A. Kaczmarkiewicz, S. Studzińska, *Bioanalysis*, 2018, **10**, 1667.
- [21] Ł. Nuckowski, A. Kaczmarkiewicz, S. Studzińska, B. Buszewski, *Analyst*, 2019, **144**, 4622.
- [22] W. Zhang, N. Leighl, D. Zawisza, M.J. Moore, E.X. Chen, *J. Chromatogr. B*, 2005, **829**, 45.

- [23] R.Z. Yu, R.S. Geary, D.K. Monteith, J. Matson, L. Truong, J. Fitchett, A.A. Levin, *J. Pharm. Sci.*, 2004, **93**, 48.
- [24] G. Zhang, J. Lin, K. Srinivasan, O. Kavetskaia, J.N. Duncan, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 3416.
- [25] Y. Cen, X. Li, D. Liu, F. Pan, Y. Cai, B. Li, W. Peng, C. Wu, W. Jiang, H. Zhou, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, **70**, 447.
- [26] B. Chen, M. Bartlett, *AAPS J.*, 2012, **14**, 772.
- [27] J. Li, J. Liu, J. Enders, M. Arciprete, C. Tran, K. Aluri, L.-H. Guan, J. O'Shea, A. Bisbe, K. Charissé, I. Zlatev, D. Najarian, Y. Xu, *Bioanalysis*, 2019, **11**, 1955.
- [28] J. Liu, J. Li, C. Tran, K. Aluri, X. Zhang, V. Clausen, I. Zlatev, L. Guan, S. Chong, K. Charisse, J.T. Wu, D. Najarian, Y. Xu, *Bioanalysis*, 2019, **11**, 1967.
- [29] M. Hemsley, M. Ewles, G. Lee, *Bioanalysis*, 2012, **4**, 1457.
- [30] K.N. Marsh, A. Deev, A.C.-T. Wu, E. Tran, A. Klamt, *Korean J. Chem. Eng.*, 2002, **19**, 357.
- [31] K. Marsh, J. Boxall, R. Lichtenthaler, *Fluid Phase Equilib.*, 2004, **219**, 93.
- [32] S. Zhang, N. Sun, X. He, X. Lu, X. Zhang, *J. Phys. Chem. Ref. Data.*, 2006, **35**, 1475.
- [33] H. Olivier-Bourbigou, L. Magna, D. Morvan, *Appl. Catal. A Gen.*, 2010, **373**, 1.
- [34] A. Berthod, S. Carda-Broch, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **380**, 168.
- [35] C. Maton, N. De Vos, C. V. Stevens, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 5963.
- [36] B. Buszewski, S. Studzińska, *Chromatographia*, 2008, **68**, 1.
- [37] Y. Huang, S. Yao, H. Song, *J. Chromatogr. Sci.*, 2013, **51**, 739.
- [38] J.H. Wang, D.H. Cheng, X.W. Chen, Z. Du, Z.L. Fang, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 620.
- [39] K.D. Clark, O. Nacham, H. Yu, T. Li, M.M. Yamsek, D.R. Ronning, J.L. Anderson, *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 1552.
- [40] L. Vidal, M.L. Riekkola, A. Canals, *Anal. Chim. Acta.*, 2012, **715**, 19.
- [41] Ş. Tokaloğlu, E. Yavuz, H. Şahan, S.G. Çolak, K. Ocakoğlu, M. Kaçer, Ş. Patat, *Talanta*, 2016, **159**, 222.
- [42] T. Chatzimitakos, C. Stalikas, *Separations*, 2017, **4**, 14.
- [43] X. Cao, L. Shen, X. Ye, F. Zhang, J. Chen, W. Mo, *Analyst*, 2014, **139**, 1938.
- [44] M.-Q. Cai, J. Su, J.-Q. Hu, Q. Wang, C.-Y. Dong, S.-D. Pan, M.-C. Jin, *J. Chromatogr. A*, 2016, **1459**, 38.
- [45] M. Sun, Y. Bu, J. Feng, C. Luo, *J. Sep. Sci.*, 2016, **39**, 375.
- [46] X. Zhou, Y. Zhang, Z. Huang, D. Lu, A. Zhu, G. Shi, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 38417.
- [47] X. Xu, M. Zhang, L. Wang, S. Zhang, M. Liu, N. Long, X. Qi, Z. Cui, L. Zhang, *Food Anal. Methods*, 2016, **9**, 1696.
- [48] D. Xiao, D. Yuan, H. He, C. Pham-Huy, H. Dai, C. Wang, C. Zhang, *Carbon*, 2014, **72**, 274.
- [49] H. Chen, Y. Yuan, C. Xiang, H. Yan, Y. Han, F. Qiao, *J. Chromatogr. A*, 2016, **1474**, 23.
- [50] M. Luo, D. Liu, L. Zhao, J. Han, Y. Liang, P. Wang, Z. Zhou, *Anal. Chim. Acta.*, 2014, **852**, 88.
- [51] M. Serrano, T. Chatzimitakos, M. Gallego, C.D. Stalikas, *J. Chromatogr. A*, 2016, **1436**, 9.
- [52] M. Pei, Z. Zhang, X. Huang, Y. Wu, *Talanta*, 2017, **165**, 152.
- [53] N. Fontanals, S. Ronka, F. Borrull, A.W. Trochimczuk, R.M. Marcé, *Talanta*, 2009, **80**, 250.
- [54] X. Huang, L. Chen, D. Yuan, S. Bi, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1248**, 67.
- [55] L. Chen, X. Huang, Y. Zhang, D. Yuan, *J. Chromatogr. A*, 2015, **1403**, 37.
- [56] R. Nayebe, G. Daneshvar Tarigh, F. Shemirani, *Sci. Rep.*, 2019, **9**, 11130.
- [57] M. Tian, H. Yan, K.H. Row, *Anal. Lett.*, 2009, **43**, 110.
- [58] W. Bi, M. Tian, K.H. Row, *Phytochem. Anal.*, 2010, **21**, 496.
- [59] F. Zhao, Y. Meng, J.L. Anderson, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1208**, 1.
- [60] M. Tian, W. Bi, K.H. Row, *J. Sep. Sci.*, 2009, **32**, 4033.
- [61] P. Žuvela, M. Skoczylas, J. Jay Liu, T. Baczek, R. Kaliszan, M.W. Wong, B. Buszewski, *Chem. Rev.*, 2019, **119**, 3674.

- [62] B. Buszewski, M. Jezierska, M. Welniak, D. Berek, J. High Resolut. Chromatogr., 1998, **21**, 267.
- [63] G. Fang, J. Chen, J. Wang, J. He, S. Wang, J. Chromatogr. A, 2010, **1217**, 1567.
- [64] W. Bi, J. Zhou, K.H. Row, Talanta, 2011, **83**, 974.
- [65] M. Tian, H. Yan, K.H. Row, J. Chromatogr. B, 2009, **877**, 738.
- [66] M. Tian, K.H. Row, Chromatographia, 2011, **73**, 25.
- [67] H. Zhang, K.H. Row, J. Carbohydr. Chem., 2014, **33**, 225.
- [68] H.M. Marwani, E.M. Bakhsh, Am. J. Anal. Chem., 2013, **4**, 8.
- [69] L. Vidal, J. Parshintsev, K. Hartonen, A. Canals, M.-L. Riekkola, J. Chromatogr. A, 2012, **1226**, 2.
- [70] M. Li, P.J. Pham, T. Wang, C.U. Pittman, T. Li, Bioresour. Technol., 2009, **100**, 6385.
- [71] Ł. Nuckowski, E. Zalesińska, K. Dzieszkowski, Z. Rafiński, S. Studzińska, Talanta, *in press*.

Praca wpłynęła do Redakcji 18 maja 2020 r.