

DWUWYMIAROWA SEPARACJA TECHNIKAMI CHROMATOGRAFII I ELEKTROFOREZY ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM POŁĄCZENIA ICH W PROCES JEDNOETAPOWY

TWO-DIMENSIONAL SEPARATION WITH CHROMATOGRAPHY AND ELECTROPHORESIS TECHNIQUES WITH SPECIAL FOCUS ON THEIR COMBINATION INTO SINGLE PROCESS

Eryk Łopaciuk^{*}, Tadeusz H. Dzido

*Zakład Chemii Fizycznej, Katedra Chemii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 4A, 20-093 Lublin
e-mail*: eryk.lopaciuk@umlub.pl*

Abstract

Wprowadzenie

1. Techniki chromatograficzne wykorzystywane do celów preparatywnych
2. Chromatograficzne techniki dwuwymiarowe; 2.1. Chromatografia planarna dwuwymiarowa; 2.2. Chromatografia cieczowa kolumnowa dwuwymiarowa; 2.3. Połączenie technik chromatografii cieczowej wysokociśnieniowej i chromatografii cienkowarstwowej; 2.4. Chromatografia gazowa dwuwymiarowa; 2.5. Elektroforeza żelowa dwuwymiarowa; 2.6. Połączenie technik elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej i chromatografii cienkowarstwowej
3. Elektroforeza i chromatografia cieczowa połączone ortogonalnie w jednoetapowy proces separacji; 3.1. Technika z przepływem fazy ruchomej wywołanym działaniem sił kapilarnych w warstwie fazy stacjonarnej; 3.2. Technika z przepływem fazy ruchomej wymuszonym ciśnieniem zewnętrznym; 3.3. Elektrochromatografia pierścieniowa ciągła; 3.4. Ortogonalna elektrochromatografia planarna ciśnieniowa – połączenie technik elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej oraz chromatografii planarnej ciśnieniowej; 3.4.1. Elektrochromatografia planarna ciśnieniowa; 3.4.2. Chromatografia planarna ciśnieniowa; 3.4.3. Ortogonalna elektrochromatografia planarna ciśnieniowa
4. Techniki „pseudo-dwuwymiarowe”; 4.1. Elektrochromatografia ze zmianą miejsca dostarczenia próbki; 4.2. Mikro-elektroforeza swobodna dwuwymiarowa; 4.3. Ogniskowanie izo-elektryczne z ciągłym przepływem

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Eryk Łopaciuk, absolwent kierunku Fizyka (specjalność techniki komputerowe) Wydziału Fizyki Uniwersytetu w Białymstoku oraz kierunku Fizyka (specjalność fizyka doświadczalna) Wydziału Matematyki, Fizyki i Informatyki Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W 2010 roku rozpoczął studia doktoranckie na Wydziale Farmacji z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Obecnie zajmuje się badaniami nad konstrukcją urządzenia do ortogonalnej elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej i jego wykorzystaniem do ciągłego rozdzielania mieszanin substancji.

Tadeusz H. Dzido, prof. nadzw. Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, urodzony w 1950 r., ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie w 1973 r. Uzyskał stopnie naukowe: doktora n. chemicznych – 1980 r., doktora habilitowanego n. chemicznych – 2003 r., oraz tytuł profesora n. farmaceutycznych – 2012 r. Jest kierownikiem Zakładu Chemii Fizycznej Katedry Chemii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Własne zainteresowania badawcze: mechanizm retencji i selektywności rozdzielania substancji, głównie biologicznie aktywnych, w chromatografii cieczowej (HPLC, TLC/HPTLC), mechanizm migracji i selektywności rozdzielania stref substancji w elektrochromatografii planarnej, optymalizacja warunków rozdzielania wspomnianymi technikami, analiza farmaceutyczna i biomedyczna z wykorzystaniem technik chromatograficznych, konstrukcje komór do chromatografii cienkowarstwowej, elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej (PPEC) i ortogonalnej elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej. Autor/współautor 95 prac naukowych, 25 patentów. Jest jednym z redaktorów *Journal of Planar Chromatography*, należy do Naukowego Komitetu Redakcyjnego *Acta Chromatographica*.

ABSTRACT

Liquid chromatography and electrophoresis techniques are very often applied in contemporary laboratory practice. These techniques usually show different separation selectivity. It is due to various separation mechanisms involved in these two modes. In the former, partition of solutes between stationary and mobile phases influences on separation selectivity and retention contrary to the latter in which electrophoretic effect is involved in separation mechanism. The features mentioned are very useful for combination of these two techniques into two-dimensional separation of complicated samples of biomedical and environmental origin. Development of such approach is a very promising for contemporary separation sciences.

The paper presents an overview of two-dimensional separation techniques, in which both liquid chromatography and electrophoresis have been involved especially in continuous mode.

Keywords: two dimensional separation, electrophoresis, electrochromatography, liquid chromatography, continuous two-dimensional separation

Słowa kluczowe: separacja dwuwymiarowa, elektroforeza, elektrochromatografia, chromatografia cieczowa, rozdzielanie dwuwymiarowe ciągłe

WPROWADZENIE

Metody chromatograficzne i elektroforetyczne są bardzo szeroko włączone w proces analizy farmaceutycznej i biomedycznej oraz do mikropreparatywnego i preparatywnego izolowania oraz oczyszczania składników mieszanin substancji chemicznych. Pierwszy zakres zadań jest realizowany za pomocą takich technik jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), chromatografia gazowa (ang. *Gas Chromatography*, GC), chromatografia cienkowarstwowa/planarna (ang. *Thin Layer Chromatography/Planar Chromatography*, TLC), elektroforeza kapilarna (ang. *Capillary Electrophoresis*, CE), elektrochromatografia kapilarna (ang. *Capillary Electrochromatography*, CEC) oraz klasyczna elektroforeza żelowa płytkowa. Drugi obejmuje chromatografię cieczową preparatywną i mikropreparatywną, wykonywane technikami: chromatografii gazowej, chromatografii cieczowej kolumnowej elucyjnej (np. HPLC), chromatografii kolumnowej elucyjnej z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym (ang. *Supercritical Fluid Chromatography*, SFC), chromatografii cienkowarstwowej, elektroforezy żelowej, chromatografii planarnej ciśnieniowej (ang. *Overpressured Layer Chromatography*, OPLC).

W poszukiwaniu coraz lepszych efektywności i selektywności rozdzielania techniki chromatograficzne są łączone ze sobą, dając procesy dwuwymiarowe, które mogą być prowadzone jednocześnie lub kolejno jeden po drugim przy wykorzystaniu takich metod jak chromatografia planarna, gazowa oraz cieczowa, elektroforeza żelowa, elektrochromatografia planarna ciśnieniowa itp.

Oprócz łączenia klasycznych metod chromatograficznych bardzo cennymi są techniki oparte na połączeniu chromatografii z innymi technikami instrumentalnymi analizy chemicznej, a szczególnie ze spektrometrią mas. W literaturze fachowej można już łatwo znaleźć doniesienia o połączeniu wszystkich technik chromatograficznych z spektrometrią mas.

1. TECHNIKI CHROMATOGRFICZNE WYKORZYSTYWANE DO CELÓW PREPARATYWNYCH

W badaniach naukowych oraz przemyśle chromatografia zajmuje bardzo wysokie miejsce jako technika stosowana do rozdzielania, oczyszczania i zateżniania substancji, wchodzących w skład mieszanin prostych i/lub skomplikowanych. Często spotykanymi zastosowaniami chromatografii preparatywnej są izolacja i rozdzielanie mieszanin: białek i enzymów, produktów naturalnych pochodzenia roślinnego oraz zwierzęcego, izomerów optycznych, produktów syntezy leków, oraz lantanowców i transuranowców.

Najczęściej stosowaną techniką chromatograficzną preparatywną jest wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa kolumnowa, która charakteryzuje się największym zakresem zastosowań. Wadą tej metody jest brak możliwości ciągłego

dozowania próbki. Niedogodność ta została wyeliminowana dzięki zastosowaniu technik chromatografii cieczowej z fazą stałą (złożem) ruchomą (ang. *True Moving Bed*, TMB) lub pseudo-ruchomym złożem (ang. *Simulated Moving Bed*, SMB) [1]. Niestety, w takim przypadku nie można wykorzystywać elucji gradientowej. SMB nadaje się do rozdzielania małej liczby składników, najlepiej dwóch. Technika ta polega na równoległej pracy od kilku (minimum 8) do kilkunastu kolumn. Każda z nich, w procesie rozdzielania, znajduje się w innej fazie elucji, a poszczególne frakcje eluentu, zawierające rozdzielone substancje, są zbierane w sposób ciągły.

Do rozdzielania preparatywnego wykorzystywana jest również chromatografia gazowa. Jej układy charakteryzują się wysoką sprawnością. Niestety, poważną niedogodnością tej metody jest utrudnione odzyskiwanie substancji ze strumienia gazu nośnego oraz ograniczona ilość dozowanej próbki. Przy jej zwiększaniu spada znacząco sprawność kolumny chromatograficznej. Ten rodzaj chromatografii preparatywnej stosuje się najczęściej do izolacji składników olejków eterycznych oraz izolacji substancji zapachowych.

Jedną z nowocześniejszych metod jest chromatografia z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym. W tej technice substancje chromatografowane dają się dość łatwo oddzielić od fazy ruchomej w niskich temperaturach. Zmieniając temperaturę i gęstość fazy ruchomej można kontrolować retencję. Rozdzielane substancje są zbierane do naczyń ciśnieniowych, wypełnionych gazem obojętnym lub powietrzem. Za pomocą tej techniki rozdzielane są związki chemiczne o małej trwałości termicznej, małej lotności i stosunkowo dużych masach cząsteczkowych. Wadą tej metody jest dość skomplikowana aparatura oraz konieczność uwzględniania dużej liczby parametrów podczas realizowania procesu rozdzielania.

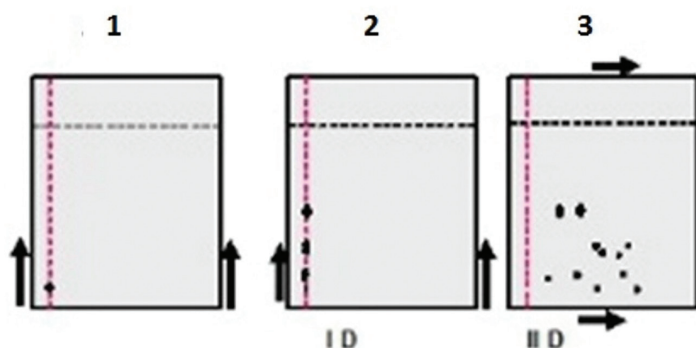
Najszybszą metodą do otrzymania niewielkich ilości substancji jest chromatografia cienkowarstwowa/planarna. Metodą tą można rozdzielać mniej skomplikowane mieszaniny, od kilku do kilkunastu składników, w zależności od rozmiaru płytki chromatograficznej. Po rozwinięciu chromatogramu przeprowadzana jest detekcja, najczęściej promieniowaniem ultrafioletowym, rozdzielonych stref substancji, pozostających w/na warstwie adsorbentu. Następnie strefy adsorbentu, zawierające substancje rozdzielone, są zdrapywane z płytki i w kolejnym etapie, eluowane odpowiednio dobranym rozpuszczalnikiem. Technika ta jest najczęściej wykorzystywana do pozyskiwania składników ekstraktów roślinnych. Zaletą TLC jest możliwość rozdzielania jednocześnie wielu różnych próbek. Poza tym technika ta umożliwia śledzenie stopnia rozdzielania składników na każdym etapie procesu separacji, a także pozwala na zatrzymanie procesu separacji w dowolnej i dogodnej dla operatora chwili. Często próbki z rozdzielanymi składnikami nie muszą być poddawane wstępnemu oczyszczaniu. Ponadto istotną zaletą tej techniki jest możliwość prowadzenia procesu rozdzielania zarówno w laboratoriach wysokobudżetowych, zaopatrzonych w specjalistyczną aparaturę, jak i o niskim finansowaniu.

2. CHROMATOGRAFICZNE TECHNIKI DWUWYMIAROWE

Dwuwymiarowe techniki chromatograficzne polegają na jednoczesnym lub kolejnym zastosowaniu, co najmniej, dwóch różnych mechanizmów i/lub metod rozdzielania składników mieszaniny. Jednakże o dwuwymiarowej separacji przy jednoczesnym zastosowaniu dwóch mechanizmów, i/lub metod, można mówić tylko wtedy, gdy te mechanizmy/metody są skierowane w różniące się kierunki, np. ortogonalnie.

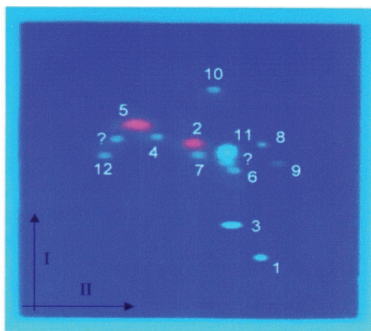
2.1. CHROMATOGRAFIA PLANARNA DWUWYMIAROWA

Technika TLC dwuwymiarowa jest wykorzystywana do rozdzielania substancji o podobnych właściwościach chemicznych. Próbkę mieszaniny substancji nanosi się na warstwę adsorbentu w jednym jej rogu i następnie rozwija chromatogram w pierwszym kierunku (Rys. 1). Po rozwinięciu chromatogramu, osusza się warstwę adsorbentu, obraca płytkę chromatograficzną o 90° i ponownie rozwija chromatogram, tym razem w drugim kierunku, przy użyciu roztworu fazy ruchomej o innym składzie jakościowym i/lub ilościowym. Po odparowaniu rozpuszczalnika uzyskuje się tzw. chromatogram dwuwymiarowy [2]. W niektórych wariantach, płytkę chromatograficzną można ponownie obrócić i rozwinąć kolejny chromatogram fazą ruchomą o zmienionym składzie. W ten sposób otrzymuje się trójwymiarową lub czterowymiarową [3, 4] mapę składników (Rys. 2). Głównymi zaletami TLC są: wszechstronność, szybkość oraz niskie koszty. Wadą natomiast możliwość zmiany składu fazy ruchomej w czasie rozwijania chromatogramu oraz wzrastające rozmycie stref substancji, powodowane zmniejszeniem szybkości przepływu fazy ruchomej w trakcie procesu chromatografowania.



Rysunek 1. Schemat dwuwymiarowego rozdzielania techniką chromatografii cienkowarstwowej; 1 – płytkę chromatograficzną z naniesioną strefą startową próbki, 2 – chromatogram po rozwinięciu w pierwszym wymiarze, 3 – chromatogram po rozwinięciu w drugim wymiarze

Figure 1. The scheme of two dimensional separation with planar chromatography: 1 – chromatographic plate with start solute zone, 2 – chromatogram after the development in the first dimension, 3 – chromatogram after the development in the second dimension

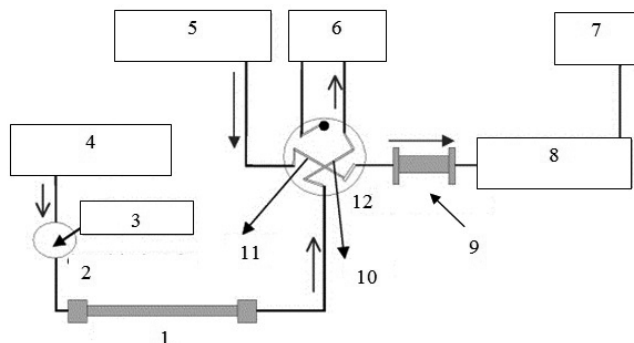


Rysunek 2. Płytkę chromatograficzną (HPTLC CN, Merck) po procesie dwuwymiarowego rozwijania chromatogramu (ang. *Two Dimensional Separation, 2D*) związków fenolowych (ekstrakt z Flos Samuci). I faza ruchoma 60% acetonu w *n*-heksanie, II faza ruchoma 50% metanolu w wodzie; 1 – myricetyna, 2 – naryngenina, 3 – luteolina, 4 – apigenina, 5 – akacetyna, 6 – hiperozyd, 7 – kwercetyna, 8 – naryngina, 9 – rutyna, 10 – hesperetyna, 11 – kwercytryna, 12 – astragalina [5]

Figure 2. Chromatographic plate (HPTLC CN, from Merck) after two dimensional separation (2D) of phenolic compounds (extract of Flos Sambuci), I dimension 60% acetone in *n*-hexane, and II dimension 50% methanol in water; 1 – myricetin, 2 – naringenin, 3 – luteolin, 4 – apigenin, 5 – acacetin, 6 – hyperoside, 7 – quercitrin, 8 – naringin, 9 – rutin, 10 – hesperetin, 11 – quercetin, 12 – astragalin [5]

2.2. CHROMATOGRAFIA CIECZOWA KOLUMNOWA DWUWYMIAROWA

W chromatografii kolumnowej dwuwymiarowość polega na tym, że część eluatu z pierwszej kolumny jest wprowadzana do drugiej (Rys. 3) [6–9]. W taki proces można włączyć więcej niż dwie kolumny [10]. Separacja taka może przebiegać metodą „off-line” lub „on-line”. W metodzie „off-line” poszczególne frakcje są zbierane „ręcznie” lub automatycznie do specjalnych pojemników kolektora i następnie wprowadzane (dozowane) do drugiej kolumny [11, 12]. Metoda ta jest, niestety, czasochłonna oraz występuje duże ryzyko zanieczyszczenia badanej próbki [13]. Posiada ona jednak również zalety takie jak: możliwość przygotowania kilku próbek oraz charakteryzuje się prostym wyposażeniem aparaturowym. W zestawie aparatury metody „on-line” występuje zawór przełączający, który umożliwia bezpośrednie przeniesienie wybranej frakcji eluatu do kolejnej kolumny [12]. Zaletą tej techniki jest znacząca poprawa precyzji oraz skrócenie czasu analizy [11, 12]. Niestety, specjalna aparatura wykorzystywana w tej technice jest dość droga.

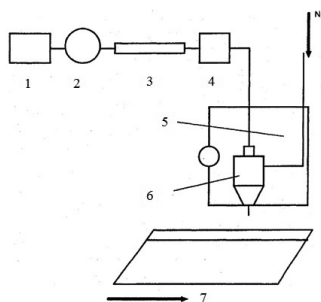


Rysunek 3. Schemat zestawu do prowadzenia procesu dwuwymiarowego rozdzielania techniką HPLC: 1 – pierwsza kolumna, 2 – zawór dozujący pierwszy, 3 – próbka, 4 – pierwsza pompa, 5 – druga pompa, 6 – ścieki, 7 – komputer, 8 – detektor UV, 9 – druga kolumna, 10 – druga pętla, 11 – pierwsza pętla, 12 – zawór dozujący drugi [6]

Figure 3. The scheme of a device for two-dimensional separation with HPLC technique : 1 – 1st column, 2 – 1st injection valve, 3 – sample, 4 – 1st pump, 5 – 2nd pump, 6 – waste, 7 – PC, 8 – detector UV, 9 – 2nd column, 10 – 2nd loop, 11 – 1st loop, 12 – 2nd injection valve [6]

2.3. POŁĄCZENIE TECHNIK CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ WYSOKOCIŚNIENIOWEJ I CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

Rozdzielanie składników badanej mieszaniny za pomocą połączonych technik chromatografii cieczowej wysokociśnieniowej i cienkowarstwowej można przeprowadzić z wykorzystaniem dwóch układów chromatograficznych z różnymi fazami stacjonarnymi. Eluat z kolumny HPLC (np. układu faz odwróconych) jest bezpośrednio nanoszony na płytkę chromatograficzną z żelom krzemionkowym (Rys. 4). Wzrost efektywności rozdzielania uzyskuje się dzięki połączeniu dwóch układów, faz odwróconych (ang. *Reverse Phase*, RP) i normalnych (ang. *Normal Phase*, NP), które posiadają różne charakterystyki selektywności [14].

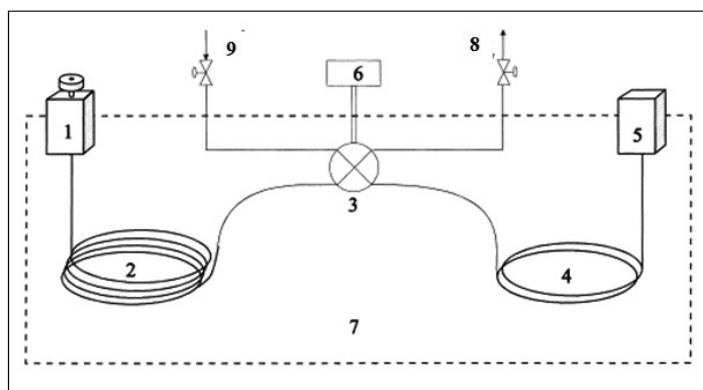


Rysunek 4. Schemat zestawu połączenia technik HPLC i TLC w dwuwymiarowym procesie rozdzielania: 1 – pompa, 2 – dozownik, 3 – mikrokolumna, 4 – detektor UV, 5 – termostat, 6 – dozownik aerozolu, 7 – płytka chromatograficzna [14]

Figure 4. The scheme of a device for two-dimensional separation with HPLC and TLC techniques: 1 – pump, 2 – injection valve, 3 – microcolumn, 4 – detector UV, 5 – thermostat, 6 – aerosol applicator, 7 – chromatographic plate [14]

2.4. CHROMATOGRAFIA GAZOWA DWUWYMIAROWA

W dwuwymiarowej chromatografii gazowej (2D GC) anality opuszczające kolumnę są zbierane w sposób ciągły i stopniowo dozowane do drugiej kolumny, która charakteryzuje się inną selektywnością rozdzielania [15–20]. Kolumny są połączone specjalnym łącznikiem (modulatorem) (Rys. 5), który pobiera frakcje z I kolumny a następnie okresowo wstrzykuje je do II kolumny, z odpowiednią częstotliwością, zapobiegającą ponownemu połączeniu się stref substancji z różnych frakcji. „Sercem” takiej techniki jest modulator. Wyróżnia się dwa rodzaje modulatorów: termiczne (z ogrzewaniem i/lub z chłodzeniem) oraz zaworowe [15]. Do zalet dwuwymiarowej chromatografii gazowej można zaliczyć podwyższoną zdolność rozdzielczą oraz czułość.



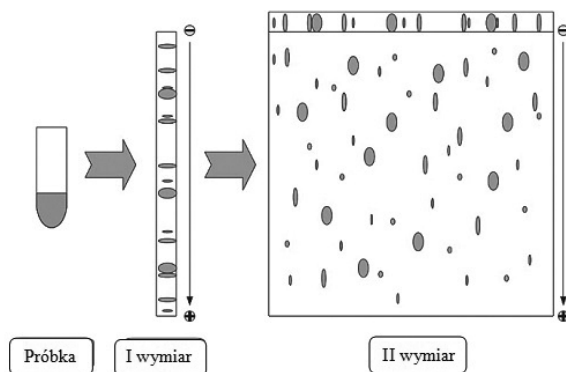
Rysunek 5. Schemat zestawu do dwuwymiarowej chromatografii gazowej (2D GC) z modulatorem zaworowym, 1 – dozownik, 2 – kolumna rozdzielcza wymiaru pierwszego, 3 – zawór, 4 – kolumna rozdzielcza wymiaru drugiego, 5 – detektor, 6 – sterownik zaworu, 7 – termostat, 8 – dzielnik przepływu, 9 – dostarczanie helu [21]

Figure 5. The schematic view of a device for two-dimensional separation with gas chromatography technique (2D GC) with valve modulator, 1 – injector, 2 – column of the first dimension, 3 – valve, 4 – column of the second dimension, 5 – detector, 6 – valve controller, 7 – GC oven, 8 – flow split, 9 –helium supply [21]

2.5. ELEKTROFOREZA ŻELOWA DWUWYMIAROWA

Elektroforeza żelowa dwuwymiarowa jest jedną z podstawowych technik wykorzystywanych w proteomice i genomice. Metoda ta swoją atrakcyjność zawdzięcza wysokiej rozdzielczości oraz selektywności rozdzielania ze względu na dwie niezależne od siebie cechy białek: punkt izoelektryczny (zależność ładunku makrocząsteczek od pH środowiska) oraz masę cząsteczkową (Rys. 6) [22]. Przy wykorzystaniu jednej warstwy żelu można rozdzielać nawet do 10 000 białek. Żel, na którym nastąpiła separacja, należy sfotografować, ponieważ dość szybko zmienia on swoje właściwości. Komputerowa analiza obrazu ułatwia ustalenie położenia stref protein

rozdzielonych. W kolejnym etapie z płytki żelowej wycinane są strefy z rozdzielonymi białkami w celu poddania ich dalszym badaniom. Operacja ta może być wykonana ręcznie lub przy użyciu specjalnych robotów. Metoda ta wymaga jeszcze wielu udoskonaleń, dotyczących pełnej automatyzacji, czy lepszego (dokładniejszego) oprogramowania do analizy dwuwymiarowych elektroferogramów na żelu.

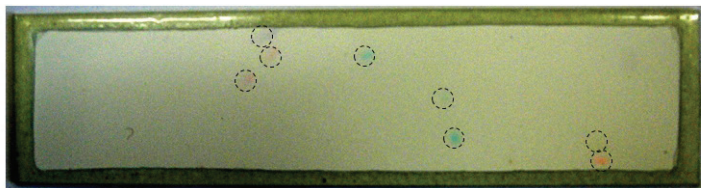


Rysunek 6. Schemat eksperymentu dwuwymiarowej elektroforezy żelowej. Składniki próbki są rozdzielane w pierwszym wymiarze za pomocą metody ogniskowania izoelektrycznego (ang. *Isoelectric Focusing*, IEF), w drugim wymiarze rozdzielanie następuje ze względu na zróżnicowanie wielkości cząsteczek i ich ładunku elektrycznego [23]

Figure 6. The diagram of a two-dimensional gel electropherogram. In the first dimension a sample mixture is separated by the method of isoelectric focusing (IEF). In the second dimension separation is due to differences in particle size and electrical charge [23]

2.6. POŁĄCZENIE TECHNIK ELEKTROCHROMATOGRAFII PLANARNEJ CIŚNIENIOWEJ I CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

Technika elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej (ang. *Pressurized Planar Electrochromatography*, PPEC) charakteryzuje się wysoką sprawnością, krótkim czasem prowadzenia procesu rozdzielania oraz inną selektywnością w stosunku do chromatografii cieczowej i elektroforezy [24]. Dlatego połączenie jej z wysokosprawną chromatografią cienkowarstwową (planarną) w dwuwymiarowy proces separacji (2D HPTLC/PPEC) jest bardzo atrakcyjne [25, 26]. W pierwszym etapie może być przeprowadzony proces rozwijania chromatogramu cienkowarstwowego, a następnie elektrochromatogramu techniką PPEC. Rysunek 7 przedstawia płytkę chromatograficzną po procesie dwuwymiarowego rozdzielania technikami HPTLC i PPEC. Technika PPEC jest stosunkowo nową i innowacyjną metodą, która jest również przedmiotem badań naszego zespołu [27–32]. Zgodnie z współczesnym stanem badań metoda ma pewne ograniczenia: brak płytek elektrochromatograficznych, dedykowanych wyłącznie tej technice, oraz brak aparatury komercyjnej, która obecnie istnieje tylko w postaci konstrukcji prototypów, opracowanych w laboratoriach badawczych, zajmujących się rozwojem PPEC.

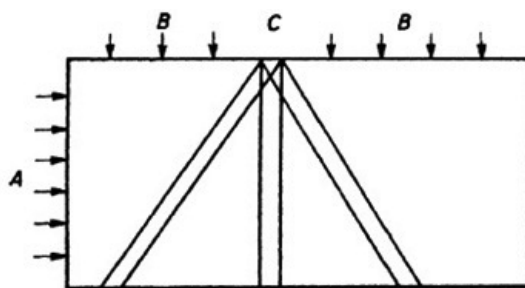


Rysunek 7. Płytkę chromatograficzną (HPTLC RP-18W, Merck) po procesie dwuwymiarowego rozdzielania technikami HPTLC i PPEC; 1 – rodamina 6G, 2 – PAR, 3 – błękit patentowy, 4 – zieleń S, 5 – azorubina, 6 – błękit brylantowy, 7 – czerwień Allura, 8 – czerń brylantowa [25]

Figure 7. The picture of the chromatographic plate (HPTLC RP-18W, Merck) after two-dimensional separation with HPTLC and PPEC techniques; 1 – rhodamine 6G, 2 – PAR, 3 – patent blue, 4 – green S, 5 – azorubine, 6 – brilliant blue, 7 – allura red, 8 – brilliant black [25]

3. ELEKTROFOREZA I CHROMATOGRAFIA CIECZOWA POŁĄCZONE ORTOGONALNIE W JEDNOETAPOWY PROCES SEPARACJI

Zasada prowadzenia jednocześnie dwóch procesów separacji z wykorzystaniem przepływu roztworu fazy ruchomej względem fazy stacjonarnej i pola elektrycznego prostopadłego do tego przepływu w procesie rozdzielania mieszaniny substancji została po raz pierwszy zaproponowana przez Svennsona i Brattstena [33]. Zasadę procesu przedstawia Rysunek 8. Pole elektryczne było przykładane w kierunku prostopadłym do przepływu fazy ruchomej. Strefy substancji migrowały, w zależności od znaku ładunku elektrycznego ich jonów, w kierunku anody lub katody. Składniki mieszaniny substancji były rozdzielane na frakcje, tworzące pasma, które były odchylane od kierunku przepływu fazy ruchomej pod różnymi kątami. Jeżeli w układzie był utrzymywany stały przepływ przy stałej wartości natężenia prądu, wtedy kąty poszczególnych frakcji nie zmieniały się w czasie procesu rozdzielania.



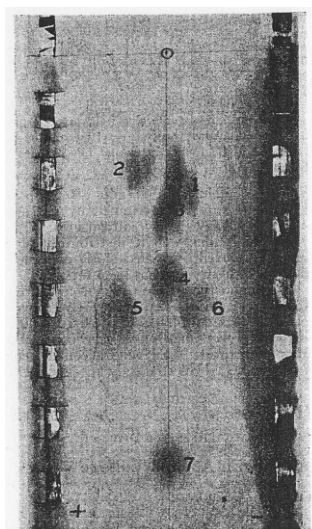
Rysunek 8. Zasada działania dwuwymiarowego rozdzielania z wykorzystaniem ciągłego i jednoczesnego biegu dwóch procesów ortogonalnych: chromatografii cieczowej i elektroforezy; A – kierunek pola elektrycznego, B – kierunek przepływu buforu (fazy ruchomej), C – wprowadzanie próbki [33]

Figure 8. Principle of an action of continuous two-dimensional separation with orthogonally combined and simultaneously performed liquid chromatography and electrophoresis; A – direction of electric field, B – direction of buffer (mobile phase) flow, C – sample introduction [33]

3.1. TECHNIKA Z PRZEPŁYWEM FAZY RUCHOMEJ WYWOŁANYM DZIAŁANIEM SIŁ KAPILARNYCH W WARSTWIE FAZY STACJONARNEJ

W początkowym etapie rozwoju tej techniki rozdzielanie substancji przeprowadzano w układach, w których fazę stacjonarną stanowiła warstwa papieru lub bibuły. Zatem w tej technice chromatografia podziałowa i elektroforeza były dwoma ortogonalnie i jednocześnie biegnącymi procesami.

W latach 50. XX w. badania nad taką techniką rozdzielania prowadzili Haugaard i Kroner [34]. Separację przeprowadzali z zastosowaniem bibuły, do której podłączali z obu stron elektrody aluminiowe, niklowe lub platynowe (Rys. 9). W takim układzie proces przebiegał, niestety, bardzo długo, trwał około 16–18 godz. przy różnicy potencjałów 100 V. Rozdzielana próbka zawierała mieszaninę aminokwasów.



Rysunek 9. Dwuwymiarowy elektrochromatogram otrzymany przez Haugaarda i Kronera; 1 – lizyna, 2 – kwas asparginowy, 3 – seryna, 4 – glicyna, 5 – kwas glutaminowy, 6 – arginina, 7 – alanina [34]

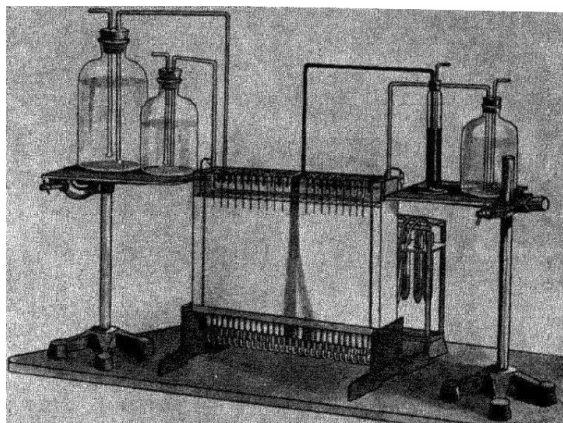
Figure 9. Two-dimensional electrochromatogram obtained by Haugaarda and Kroner; 1 – lysine, 2 – aspartic acid, 3 – serine, 4 – glycine, 5 – glutamic acid, 6 – arginine, 7 – alanine [34]

Do budowy pierwszego urządzenia do rozdzielania preparatywnego z ciągłym dozowaniem próbki i odbieraniem frakcji, opartego na powyższej zasadzie działania, Svensson i Brattsten użyli złoża z rozdrobnionego szkła, umieszczonego w ramie z plexiglasu (Rys. 10) [33]. Elektrolit oraz próbkę dostarczali za pomocą kolb Marriote'a. Elektrody przemywali kwasami i zasadami, aby uniknąć zmian pH, spowodowanych elektrolizą. Pierwsze próby rozdzielania barwników ukazały potrzebę dopracowania urządzenia pod względem stabilności warunków prowadzenia procesu (natężenia prądu oraz temperatury). Mould i Synge rozdzielili kilka kompleksów jodków skrobi, przy wykorzystaniu urządzenia tego typu [35]. Gras-

smann i Hanning skonstruowali urządzenie (Rys. 11) bardzo podobne do urządzenia Svenssona i Brattstena. Jedyną różnicę stanowiło zastosowanie bibuły zamiast rozdrobionego szkła [36]. Elektrody były zaciśnięte na bokach bibuły, której końce miały kształt wypustek (języczków). Każdy „języczek” odbierał inną frakcję z układu. Próbkę można było dostarczać do układu rozdzielczego w trzech różnych miejscach: na środku oraz po bokach, w pobliżu elektrod. Autorzy rozdzielali białka surowicy ludzkiej, aminokwasy oraz barwniki [37]. Firma Bender and Hobein sprzedawała powyższe urządzenie pod nazwą Elphor V.

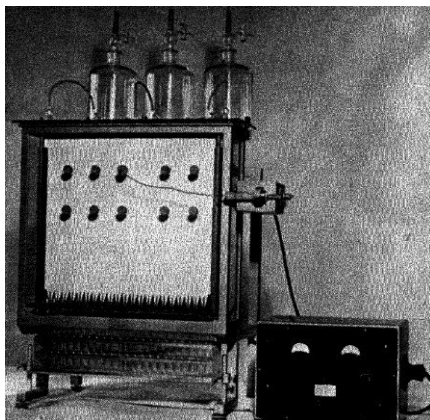
Kolejnym etapem rozwoju badań nad konstrukcją tego typu urządzeń była aparatura Straina i Sullivana (Rys. 12) [38, 39]. Autorzy zastosowali w niej bibułę o około 3 mm grubości, umieszczoną wraz z elektrodami pomiędzy dwiema szklanymi płytami. Boki bibuły pokryli parafiną. Miejsce dozowania próbki umieścili centralnie w górnej części urządzenia. Zamontowane w dolnej części aparatury paski bibuły służyły do odprowadzania poszczególnych frakcji składników rozdzielanej mieszaniny. Zaletą tej aparatury było znaczące ograniczenie odparowania rozpuszczalnika oraz ulepszony system chłodzenia, co umożliwiło stosowanie większego natężenia prądu. Badania dowiodły, że optymalną fazą ruchomą w eksperymentach był roztwór octanu amonu. Za pomocą tej aparatury autorzy rozdzielali mieszaniny kationów metali [39].

Dotychczasowe urządzenia do jednoczesnego i ortogonalnego prowadzenia procesu elektroforezy i chromatografii posiadały elektrody umieszczone wzdłuż przeciwległych brzegów fazy stacjonarnej. Durrum umieścił elektrody w dwóch dolnych rogach warstwy bibuły, stanowiącej fazę stacjonarną (Rys. 13) [40]. W tym przypadku linie sił pola elektrycznego miały kształt łuków. Takie rozmieszczenie elektrod miało wyeliminować lub znacznie ograniczyć zanieczyszczenie otrzymanych frakcji składników rozdzielanej mieszaniny przez substancje wydzielające się na elektrodach. Urządzenie Durruma wykorzystał Grasmann do rozdzielania aminokwasów (Rys. 14) [41].



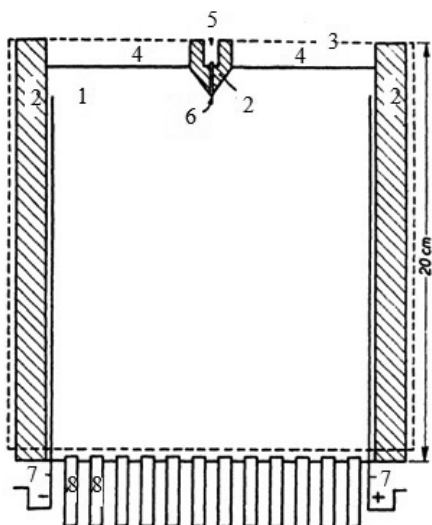
Rysunek 10. Aparatura Svenssona i Brattstena [33]

Figure 10. Apparatus after Svensson and Brattsten [33]



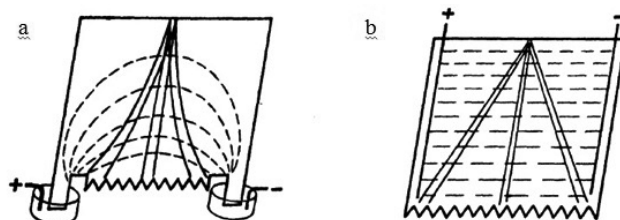
Rysunek 11. Aparatura (Elphor Va) Grassmanna i Hanniga oferowana przez Bender and Hobein (Monachium) – zaprojektowana do zbierania 48 frakcji [37]

Figure 11. The Elphor Va apparatus of Grassmann and Hanning commercialized by Bender and Hobein (Munich) – apparatus designed to give 48 fractions [37]



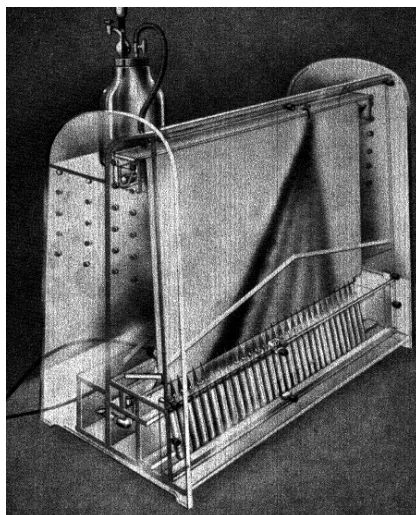
Rysunek 12. Schemat urządzenia Straina i Sullivana; 1– bibuła, 2 – obszar bibuły zaimpregnowany parafiną, 3 – kontur płytki szklanej, 4 – zbiornik na bufor (roztwór fazy ruchomej), 5 – zbiornik roztworu próbki, 6 – knot z bibuły, 7 – platynowe elektrody, 8 – wypustki bibułowe do zbierania frakcji [38]

Figure 12. Conceptual view of a device by Strain and Sullivan; 1 – filter paper, 2 – regions of paper impregnated with paraffin, 3 – outline of glass plate, 4 – reservoir of buffer solution (mobile phase), 5 – solute mixture reservoir, 6 – paper wick, 7 – platinum electrodes, 8 – paper strips for fraction collection [38]



Rysunek 13. Schemat urządzeń z dwoma sposobami usytuowania elektrod; a) zakrzywione pole – metoda Durruma, b) pole jednorodne – metoda Svenssona i in. [40]

Figure 13. Diagram showing two modes of electrode arrangement; a) curved field – method of Durrum, b) linear field – method of Grassmann et al. [40]



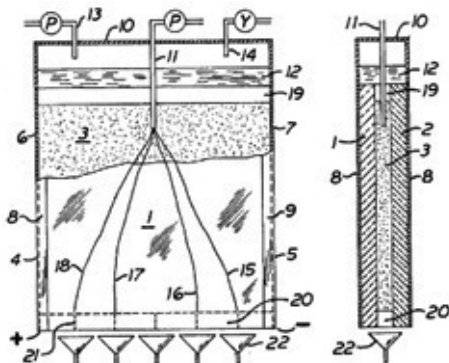
Rysunek 14. Aparatura zaprojektowana przez Durruma i oferowana przez Shandon Scientific (Londyn) [41]

Figure 14. The apparatus designed by Durrum and commercialized by Shandon Scientific (London) [41]

3.2. TECHNIKA Z PRZEPŁYWEM FAZY RUCHOMEJ WYMUSZONYM CIŚNIENIEM ZEWNĘTRZNYM

Dużym postępem w rozwoju dwuwymiarowych technik separacyjnych, wykorzystujących prostopadłe pole elektryczne do kierunku przepływu fazy ruchomej w warstwie adsorbentu, było skonstruowanie urządzenia, w którym faza ruchoma przemieszczała się pod ciśnieniem względem fazy stacjonarnej. Aparatura tego typu została skonstruowana i opatentowana przez E.L. Karlson'a (Rys. 15) [42]. W urządzeniu tym fazę stacjonarną stanowiła bibuła filtracyjna lub ziarno adsorbentu umieszczone pomiędzy dwoma szklanymi płytami. Faza ruchoma była dostarczana do zbiornika umieszczonego tuż nad górnym brzegiem fazy stacjonarnej. Górną część komory ciśnieniowej stanowiła specjalna poduszka powietrzna, służąca do tłoczenia fazy ruchomej przez złożo. Szklane płyty z poduszką powietrza

były umieszczone w specjalnej ramie, wyposażonej w elektrody. W górnej części urządzenia umieszczona została rurka, przez którą za pomocą specjalnej pompy, w sposób ciągły, dostarczano roztwór próbki składników rozdzielanych. Rozdzielone składniki mieszaniny zbierano do pojemników, umieszczonych w dolnej części aparatu (Rys. 15).



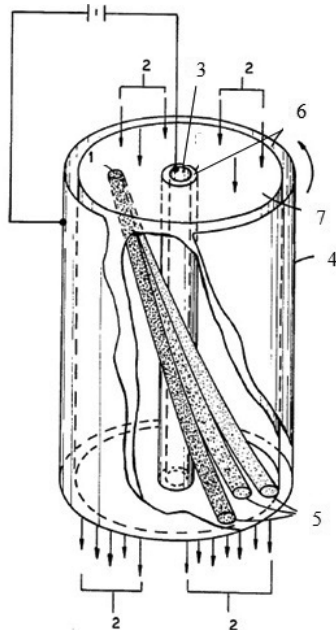
Rysunek 15. Urządzenie do ciągłej dwuwymiarowej elektrochromatografii wg Karlsona; 1, 2 – szklane płyty, 3 – złożo (faza stacjonarna), 4, 5 – metalowe kanały, 6, 7 – tkanina zabezpieczająca, 8, 9 – kołnierze, 10 – zbiornik górny, 11 – rurka doprowadzająca próbkę, 12 – filtr, 13 – pompa eluentu, 14 – zawór kontrolny, 15–18 – pasma rozdzielanych składników próbki, 19, 20 – paski przepuszczalne dla roztworu fazy ruchomej, 21 – gniazda, 22 – lejki do zbierania frakcji [42]

Figure 15. Apparatus for continuous two-dimensional electrochromatography by Karlson; 1, 2 – glass sheet, 3 – bed (stationary phase), 4, 5 – metal channels, 6, 7 – webs, 8, 9 – flanges, 10 – header box, 11 – sample tubing, 12 – filter, 13 – eluent pump, 14 – control valve, 15–18 – separated solute zones, 19, 20 – fluid transfusible strips, 21 – slots, 22 – funnels for collecting the separated components [42]

3.3. ELEKTROCHROMATOGRAFIA PIERŚCIENIOWA CIĄGŁA

Przykład urządzenia, do dwuwymiarowej ciągłej separacji z wymuszonym przepływem fazy ruchomej i polem elektrycznym prostopadłym do tego przepływu, w którym faza stacjonarna tworzy formę cylindryczną, jest przedstawiony na Rysunku 16. [43] Metoda ta została nazwana elektrochromatografią pierścieniową ciągłą (ang. *Continuous Annular Electrochromatography, CAEC*). Urządzenie składa się z dwóch elektrod w kształcie cylindrów oraz dwóch cylindrycznych ścianek, między którymi była umieszczona faza stacjonarna. Przestrzeń pomiędzy ściankami i elektrodami służyła, jako miejsce, do którego wprowadzano ciecz chłodzącą. Podczas procesu elektrochromatograficznego elektrody, zarówno wewnętrzna, jak i zewnętrzna, pozostawały w miejscu, rotowało jedynie złożo adsorbentu. Eluent podawano od góry. Po przepłynięciu mieszaniny przez układ chromatograficzny poszczególne frakcje zbierano do pojemników kolektora frakcji. W omawianym przykładzie istniała możliwość sterowania szybkością przepływu eluentu. Do regulacji szybkości przepływu fazy ruchomej uży-

wano gazu, który doprowadzano do górnej części urządzenia (nie widocznej na Rysunku 16). Każdy składnik mieszaniny rozdzielanej posiadał określone miejsce opuszczania kolumny, opisane przez kąt, θ , i dystans, r , (odległość od osi kolumny), które zależą od powinowactwa substancji rozdzielanych do faz układu i właściwości elektrokinetycznych. Podczas separacji mieszaniny bardziej złożonej należy zwiększyć liczbę odbieralników, których miejsce zamontowania było wyznaczane przy wykorzystaniu odpowiednich równań. Opisane urządzenie zostało wykorzystane do rozdzielania hemoglobiny wołowej oraz skrobi.



Rysunek 16. Schemat urządzenia do ciągłej elektrochromatografii pierścieniowej; 1 – miejsce wprowadzenia próbki, 2 – eluent, 3 – elektroda wewnętrzna, 4 – elektroda zewnętrzna, 5 – pasma substancji rozdzielanych, 6 – zbiornik na ciecz chłodzącą, 7 – złożo adsorbentu [43]

Figure 16. Apparatus for continuous annular electrochromatography; 1 – sample feed, 2 – eluent, 3 – inner electrode, 4 – outer electrode, 5 – solute zones, 6 – cooling liquid reservoir, 7 – adsorbent [43]

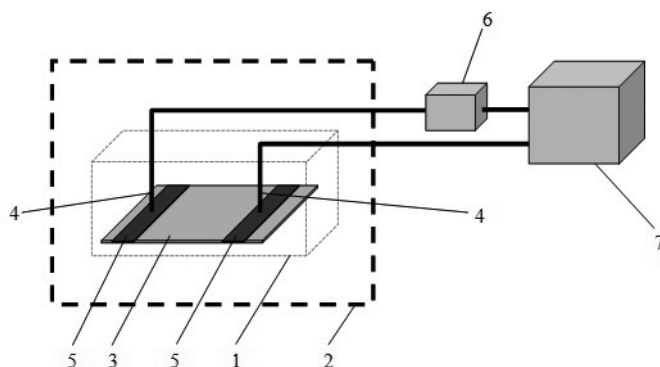
3.4. ORTOGONALNA ELEKTROCHROMATOGRAFIA PLANARNA CIŚNIENIOWA – POŁĄCZENIE TECHNIK ELEKTROCHROMATOGRAFII PLANARNEJ CIŚNIENIOWEJ ORAZ CHROMATOGRAFII PLANARNEJ CIŚNIENIOWEJ

Ortogonalna elektrochromatografia planarna ciśnieniowa (ang. *Orthogonal Pressurized Planar Electrochromatography*, OPPEC) jest nową techniką elektrochromatograficzną, która stanowi połączenie dwóch technik rozdzielczych, elektroforezy, a właściwie elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej, oraz chromatografii planarnej ciśnieniowej, przy czym procesy elektroforezy/elektrochromatografii i chromatografii przebiegają równocześnie i ortogonalnie względem siebie. Technika

ta została po raz pierwszy zaprezentowana przez nasz zespół podczas 29. Międzynarodowego Sympozjum Chromatografii w 2012 r. w Toruniu. Ponieważ jest ona połączeniem technik PPEC i OPEC, więc zostaną one wstępnie omówione przed podaniem informacji o technice OPPEC.

3.4.1. ELEKTROCHROMATOGRAFIA PLANARNA CIŚNIENIOWA

Pierwsza praca dotycząca techniki elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej (elektrochromatografii planarnej w układzie zamkniętym) ukazała się w 2004 r. [44]. Zatem PPEC jest względnie nową techniką rozdzielczą, w której do separowania substancji wykorzystywane są procesy elektroforezy i podziału substancji pomiędzy dwie fazy, ruchomą i nieruchomą. Proces rozdzielania prowadzony jest w specjalnej komorze (Rys. 17), w której na warstwę adsorbentu płytki chromatograficznej, przykrytej folią teflonową, wywierane jest ciśnienie za pomocą specjalnej przykrywy. Przepływ fazy ruchomej jest generowany działaniem pola elektrycznego, które powstaje po przyłożeniu potencjału do elektrod znajdujących się przy przeciwległych brzegach płytki chromatograficznej. W najnowszym prototypie urządzenia oba procesy, zwilżanie warstwy adsorbentu płytki chromatograficznej i rozwijanie elektrochromatogramu, są realizowane w jednej komorze urządzenia do PPEC [45]. Wcześniej te procesy były wykonywane w odrębnych urządzeniach [30]. Przedstawiona konstrukcja urządzenia do PPEC pozwala na szczelne zamknięcie warstwy adsorbentu, i dzięki temu, wyeliminowanie udziału fazy gazowej z procesu rozdzielania, w przeciwieństwie do tego, jak to ma miejsce w chromatografii cienkowarstwowej. Proces rozdzielania techniką PPEC jest prowadzony w płaskiej kolumnie i jest analogiczny do procesu separacji realizowanego techniką elektrochromatografii kapilarnej. Wyniki zaprezentowane w opublikowanych pracach pokazują, że technikę PPEC charakteryzuje wyższa powtarzalność uzyskiwanych wartości dystansu migracji rozdzielanych stref substancji w stosunku do tych, otrzymywanych za pomocą wcześniejszej wersji tej techniki, wykonywanej w układzie otwartym, i znanej pod nazwą elektrochromatografii planarnej (ang. *Planar Electrochromatography*, PEC). Ponadto, w porównaniu do zwykłej chromatografii cienkowarstwowej, PPEC charakteryzuje się dużo krótszym czasem separacji oraz większą sprawnością [24].



Rysunek 17. Uproszczony schemat zestawu do elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej; 1 – komora do PPEC, 2 – kabina zabezpieczająca, 3 – płytka chromatograficzna, 4 – elektroda, 5 – zbiornik fazy ruchomej, 6 – amperomierz, 7 – zasilacz wysokonapięciowy

Figure 17. Conceptual view of a device for pressurized planar electrochromatography: 1 – chamber for PPEC, 2 – cabinet for PPEC chamber, 3 – chromatographic plate, 4 – electrodes, 5 – reservoir of the mobile phase, 6 – ammeter, 7 – high voltage power supply

3.4.2. Chromatografia planarna ciśnieniowa

W chromatografii planarnej ciśnieniowej faza ruchoma jest tłoczona przez złożę adsorbentu na płytce chromatograficznej za pomocą pompy wysokociśnieniowej, np. do HPLC [46]. W chromatografii planarnej ciśnieniowej, podobnie jak w elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej, została wyeliminowana faza gazowa z układu separacyjnego. Proces rozdzielania techniką OPLC można przeprowadzać stosując niskie (2–5 atm.), średnie (10–30 atm.) bądź wysokie (50–100 atm.) ciśnienie. Stosowane ciśnienie zależy głównie od rodzaju fazy stacjonarnej oraz zastosowanej fazy ruchomej. Strefy rozdzielonych składników mieszaniny mogą pozostać w warstwie adsorbentu płytki chromatograficznej, lub mogą być eluowane poza układ separacyjny tak, jak to jest prowadzone w typowych technikach kolumnowych. W sprzedaży dostępny jest aparat Personal OPLC Basic System 50 (Rys. 18) [47], który jest wykorzystywany do separacji analitycznych oraz preparatywnych.



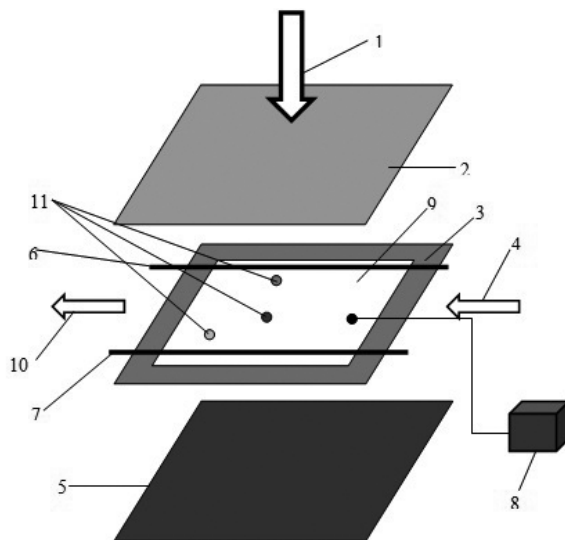
Rysunek 18. Urządzenie do chromatografii planarnej ciśnieniowej, Personal OPLC Basic System 50 [48]

Figure 18. Device for overpressurized layer chromatography, Personal OPLC Basic System 50 [48]

3.4.3. Ortogonalna elektrochromatografia planarna ciśnieniowa

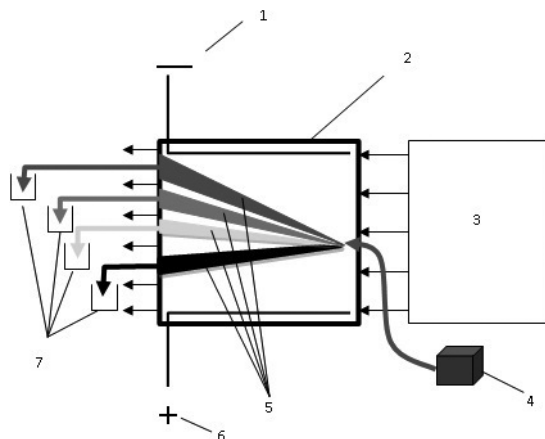
Nie ma jeszcze doniesień literaturowych na temat urządzenia wykorzystującego jednocześnie i ortogonalne prowadzenie procesów elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej i chromatografii planarnej ciśnieniowej. Natomiast znane są przykłady kolejnego zastosowania technik PPEC i TLC do dwuwymiarowego rozdzielania mieszanin substancji [25, 26]. Takie podejście charakteryzuje się wysoką efektywnością, wynikającą głównie z odmiennej selektywności rozdzielania zastosowanych układów PPEC i TLC. W celu powiększenia tej efektywności nasz zespół podjął badania nad skonstruowaniem urządzenia, które umożliwiłoby jednocześnie prowadzenie dwuwymiarowej separacji przy wykorzystaniu technik PPEC i OPLC. W nowej technice roztwór fazy ruchomej jest tłoczony w jednym kierunku poprzez złożę fazy stacjonarnej (warstwę adsorbentu płytki chromatograficznej), a pole elektryczne jest przyłożone w kierunku prostopadłym do kierunku migracji fazy ruchomej. Mieszanina składników rozdzielanych może być wprowadzana, impulsowo lub ciągle, do układu rozdzielczego w pobliżu brzegu warstwy adsorbentu, do którego jest dostarczany roztwór fazy ruchomej. W ten sposób tworzy się układ separacyjny, dwuwymiarowy, w którym przebiegają jednocześnie dwa procesy ortogonalne, chromatografia cieczowa (chromatografia planarna ciśnieniowa) i elektroforeza, wpływające w różny sposób na selektywność rozdzielania. Mechanizm rozdzielania substancji w pierwszym procesie (chromatografii planarnej ciśnieniowej) odbywa się przy wykorzystaniu zróżnicowanego podziału składników próbki pomiędzy dwie fazy, stacjonarną i ruchomą. Natomiast w drugim kierunku do mechanizmu rozdzielania włączony jest proces elektroforezy (efekt elektroosmozy fazy ruchomej jest tu zablokowany z powodu zamknięcia układu w kierunku zgodnym z liniami sił pola elektrycznego). Schemat urządzenia i jego zasadę działania ilustrują Rysunki 19 i 20, odpowiednio do celów rozdzielania analitycznego i preparatywnego.

Nasz zespół skonstruował prototypowe urządzenie do OPPEC, którego główny element, komora ciśnieniowa, jest pokazany na Rysunku 19. W skład urządzenia wchodzi ponadto zasilacz wysokonapięciowy, pompa wysokociśnieniowa, dozownik pętlowy, pompa hydrauliczna, ultratermostat. Należy przyznać, że główną trudnością konstruowania urządzenia było zaprojektowanie uszczelnienia warstwy adsorbentu oraz komór elektrodowych, które zapobiegałyby migracji fazy ruchomej w niepożądanym kierunku. Mamy nadzieję, że czytelnicy zrozumieją brak szczegółów na ten temat, ponieważ nasze opracowanie jest przedmiotem prac nad zgłoszeniem patentowym. Na Rysunku 21. jest przedstawiony przykład rozdzielania pasmowego mieszaniny dwuskładnikowej barwników.



Rysunek 19. Schemat urządzenia OPPEC do pracy w trybie analitycznym; 1 – siłownik hydrauliczny, 2 – przykrywa, 3 – margines uszczelniający warstwę adsorbentu płytki chromatograficznej, 4 – pompa tłocząca fazę ruchomą, 5 – podstawa, 6 – anoda, 7 – katoda, 8 – dozownik próbki, 9 – płytka chromatograficzna, 10 – odbieralnik fazy ruchomej, 11 – rozdzielone strefy składników próbki

Figure 19. The schematic view of a OPPEC device for application to analytical separation; 1 – hydraulic press, 2 – cover, 3 – special sealing margin of adsorbent layer of the chromatographic plate, 4 – mobile phase feed pump, 5 – base, 6 – anode, 7 – cathode, 8 – sample injector, 9 – chromatographic plate, 10 – mobile phase collector, 11 – separated zones of sample component



Rysunek 20. Schemat urządzenia OPPEC do pracy w trybie preparatywnym; 1 – katoda, 2 – płytka chromatograficzna, 3 – pompa tłocząca fazę ruchomą, 4 – dozownik próbki 5 – pasma substancji rozdzielanych, 6 – anoda, 7 – zbiorniki kolektora frakcji

Figure 20. The schematic view of a OPPEC device for application to preparative separation; 1 – cathode, 2 – chromatographic plate, 3 – mobile phase feed pump, 4 – sample injector, 5 – separated solute bands, 6 – anode, 7 – reservoirs of fraction collector



Rysunek 21. Pasmowe rozdzielanie dwuskładnikowej mieszaniny barwników metodą OPPEC

Figure 21. Zone separation of two dyes mixture with OPPEC technique

4. TECHNIKI „PSEUDO-DWUWYMIAROWE”

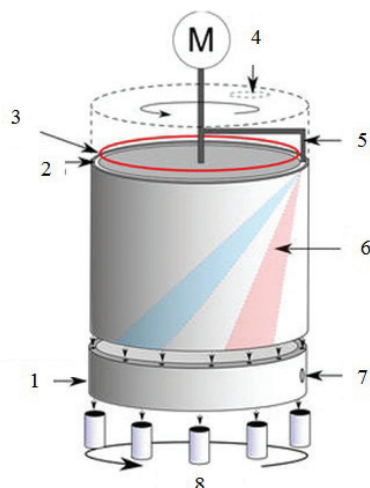
W literaturze fachowej są opracowania na temat technik rozdzielczych, które przypominają, swoim efektem separacji, proces dwuwymiarowy ciągły, ale w rzeczywistości nim nie są.

4.1. ELEKTROCHROMATOGRAFIA ZE ZMIANĄ MIEJSCA DOSTARCZANIA PRÓBKII

Interesującą koncepcję urządzenia do elektrochromatografii przedstawili Laskowski i in. z Uniwersytetu Technicznego w Kaiserslautern [49].

W początkowym etapie badań, w celu sprawdzenia zasady działania techniki, autorzy zbudowali urządzenie z warstwą adsorbentu, podobną do tej, jaka występuje na zwykłej płytce chromatograficznej. Faza stacjonarna została umieszczona pomiędzy dwoma płaskimi płytami szklanymi. Z umieszczonego na górze zbiorniczka, do złoża spływał elektrolit (faza ruchoma), którego migracja względem złoża była powodowana przez pole elektryczne, generowane przyłożonym do elektrod napięciem polaryzującym. Elektrody znajdowały się przy krawędziach górnej i dolnej warstwy adsorbentu. Do górnej części warstwy fazy stacjonarnej była dostarczana, w sposób ciągły, mieszanina rozdzielanych substancji. Przy czym, podczas procesu separacji miejsce dostarczania tej mieszaniny było przemieszczane wzdłuż górnej krawędzi złoża. W dolnej części układu separacyjnego były umieszczone kapilary do odprowadzania frakcji fazy ruchomej ze składnikami rozdzielanej mieszaniny. Podczas procesu rozdzielania strefy substancji formowały się w pasma, skierowane pod różnymi kątami do kierunku przepływu elektroosmotycznego fazy ruchomej.

Obecnie badania zespołu autorów są prowadzone przy wykorzystaniu urządzenia z fazą stacjonarną uformowaną w kształcie cylindra, co przedstawia Rysunek 22. Autorzy nazwali tę technikę elektrochromatografią pierścieniową ciągłą. Nazwa jest identyczna z wcześniej podaną [43] i przedstawioną w rozdziale 3.3. Należy jednak pamiętać, że proces rozdzielania badanej mieszaniny w obydwu urządzeniach przebiega inaczej.



Rysunek 22. Schemat urządzenia do elektrochromatografii pierścieniowej ciągłej; 1 – katoda, 2 – adsorbent, 3 – anoda, 4 – elektrolit, 5 – próbka, 6 – pasma rozdzielanych substancji, 7 – detektor UV/VIS, 8 – kolektor frakcji [49]

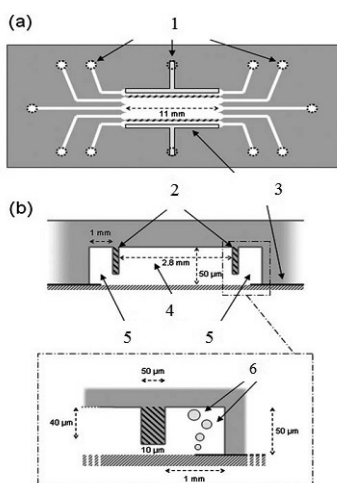
Figure 22. The schematic view of a device for continuous annular electrochromatography; 1 – cathode, 2 – adsorbent, 3 – anode, 4 – electrolyte, 5 – sample, 6 – separation bands, 7 – detector UV/VIS, 8 – fraction collector [49]

4.2. MIKRO-ELEKTROFOREZA SWOBODNA DWUWYMIAROWA

W dwuwymiarowej elektroforezie swobodnej (ang. *Two Dimensional Free Flow Electrophoresis*, 2D FFE) próbka jest wprowadzana pod ciśnieniem do płaskiej komory separacyjnej. Pole elektryczne jest przykładane prostopadle do kierunku przepływu fazy ruchomej, co powoduje odchylenie pasm analitów pod różnymi kątami do tego przepływu [50]. W przeciwieństwie do elektroforezy kapilarnej, próbka może być dostarczana w sposób ciągły do układu rozdzielczego. Technika ta ma zastosowanie do separacji preparatywnej peptydów [51], komórek [52, 53], składników komórek [54], enzymów [55, 56], białek [57–59]. Największym problemem, zakłócającym separację preparatywną tą techniką jest wydzielane ciepło Joule’a w trakcie procesu. Ten problem jest zminimalizowany w układach miniaturowych, tzw. mikroczipach.

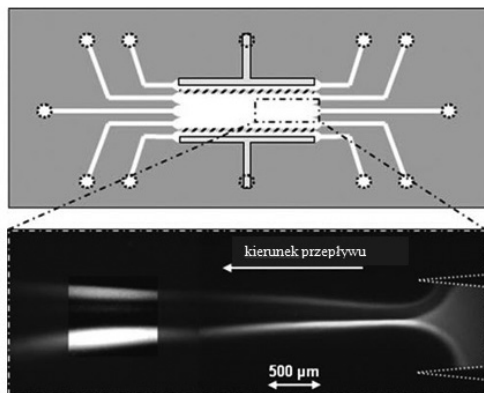
Urządzenie do takiej techniki, dwuwymiarowej mikro-elektroforezy swobodnej (ang. *Two Dimensional Microchip Free Flow Electrophoresis*, 2D μ FFE), posiada

następujące zalety: bardzo małe wymiary układu separacyjnego (co minimalizuje niekorzystne efekty generowanego ciepła Joule'a) bardzo krótki czas separacji, minimalne zużycie odczynników, bardzo małe ilości próbek analizowanych. Wydaje się, że najbardziej istotnym problemem prowadzenia procesu 2D μ FFE jest gromadzenie się pęcherzyków gazu na/przy elektrodach (Rys. 23) [60]. Pęcherzyki te mogą zakłócać przepływ strumienia analitu oraz pole elektryczne. W urządzeniach do rozdzielania analitycznego problem ten był rozwiązywany, m.in., poprzez zastosowanie membran jonowymiennych do oddzielania przestrzeni elektrodowej od pozostałej części układu rozdzielczego. Natomiast w urządzeniach mikro zastosowanie takich błon było praktycznie niemożliwe ze względów technicznych. Próbowano w różny sposób oddzielić pęcherzyki od układu rozdzielczego. Były to, między innymi, specjalne przegrody osłaniające elektrody. Rozwiązanie to powodowało ograniczanie przedostawania się pęcherzyków do przestrzeni układu separacyjnego, ale prowadziło do zwiększenia oporu elektrycznego przy elektrodzie, co skutkowało spadkiem napięcia polaryzującego pozostałej części roztworu (układu rozdzielczego) [61]. Inne warianty rozwiązywania problemu pęcherzyków gazu przy elektrodach zostały opisane w pracach [62–66]. Przykład urządzenia do 2D μ FFE, z przegrodami oddzielającymi przestrzeń elektrodową od układu rozdzielczego, jest przedstawiony na Rysunku 23, a na Rysunku 24 jest pokazany elektroferogram, uzyskany przy wykorzystaniu tego urządzenia [60].



Rysunek 23. Schemat urządzenia do μ FFE; a) przekrój poziomy urządzenia z portami połączeniowymi, b) przekrój wzdłużny urządzenia z powiększonym fragmentem, przedstawiającym komorę elektrodową z przegrodą; 1 – porty połączeniowe, 2 – przegrody, 3 – elektrody, 4 – komora separacyjna, 5 – kanały elektrodowe, 6 – pęcherzyki gazu [60]

Figure 23. Schematic view of μ FFE device; a) top view of a device with connection ports, b) longitudinal cross section of a device and expanded view of the electrode compartment with the partition; 1 – connecting ports, 2 – partitioning bars, 3 – electrode, 4 – separation chamber, 5 – electrode channel, 6 – gas bubbles [60]

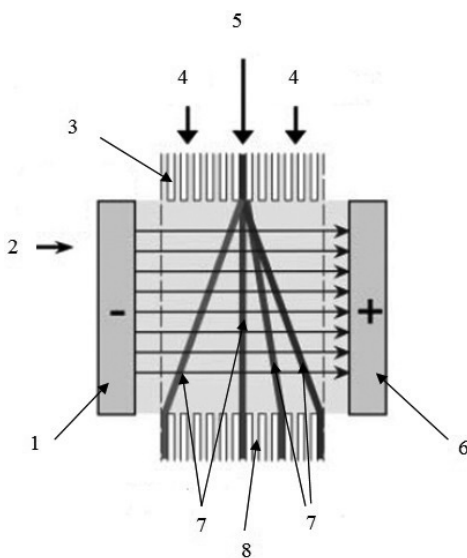


Rysunek 24. Rozdzielanie pasmowe fluoresceiny (dolne pasmo) oraz rodaminie 6G (górne pasmo) techniką 2D μ FFE [60]

Figure 24. Zone separation of fluorescein (lower band) and rhodamine 6G (upper band) with 2D μ FFE technique [60]

4.3. OGNISKOWANIE IZOELEKTRYCZNE Z CIĄGŁYM PRZEPŁYWEM

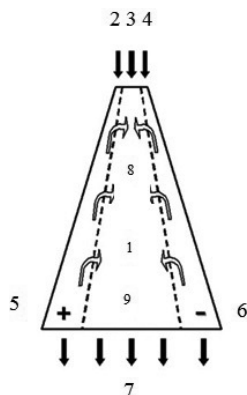
Zasada działania techniki ogniskowania izoelektrycznego z ciągłym przepływem fazy ruchomej (ang *Free-flow Isoelectric Focusing*, FF IEC) jest pokazana na Rysunku 25. Polega na zastosowaniu przepływu hydrodynamicznego roztworu fazy ruchomej w układzie separacyjnym, utworzonym w płaskim pojemniku i pola elektrycznego prostopadłego do tego przepływu. Przy czym roztwór fazy ruchomej charakteryzuje się gradientem pH w kierunku prostopadłym do przepływu hydrodynamicznego, a równoległym do linii sił pola elektrycznego [67]. Roztwór próbki rozdzielanych składników może być wprowadzany do takiego układu, punktowo, lub nawet na całej długości krawędzi wejściowej do układu separacyjnego. Składniki roztworu próbki są rozdzielane dzięki różnicy wartości ich pI (punkt izoelektryczny), a następnie zbierane do naczynek u wyjścia z układu rozdzielczego. W takim układzie roztwór na całym swym obszarze znajduje się pod wpływem jednakowego napięcia polaryzującego.



Rysunek 25. Schemat urządzenia do FF IEF; 1 – katoda, 2 – pole elektryczne, 3 – kanały wejściowe, 4 – bufor, 5 – próbka, 6 – anoda, 7 – pasma składników rozdzielanych, 8 – kanały wyjściowe [67]

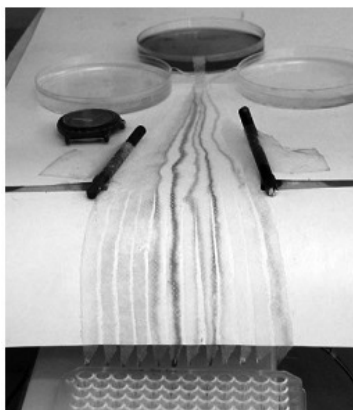
Figure 25. The scheme of a device for FF IEF; 1 – cathode, 2 – electric field, 3 – input channels, 4 – buffer, 5 – sample, 6 – anode, 7 – separation bands, 8 – outer channels [67]

W kolejnym etapie rozwoju FF IEC została opracowana technika izoelektrycznego ogniskowania z rozbieżnym przepływem fazy ruchomej (ang. *Divergent Isoelectric Focusing*, DF IEF) [68], która polega na wytworzeniu płaskiego rozbieżnego przepływu fazy ruchomej i rozdzielanych stref substancji, wchodzących w skład próbki badanej. Zostało to uzyskane poprzez zastosowanie różnej szerokości układu separacyjnego, tzn. wąskiej przy wejściu do układu i szerokiej przy wyjściu z układu (Rys. 26). Urządzenie zostało tak zaprojektowane, aby napięcie polaryzujące układ separacyjny ulegało zwiększeniu wraz ze zwiększaniem jego szerokości. W urządzeniu zastosowano materiał nośny fazy ruchomej w postaci specjalnej włókniny (PEGAS), która, w porównaniu do papieru i podobnych materiałów, wyróżnia się większą odpornością mechaniczną i chemiczną, małymi oporami wobec przepływu fazy ruchomej. Pierwsze próby rozdzielania zostały wykonane przy wykorzystaniu wzorcowej mieszaniny, zawierającej substancje różniące się barwą i wartościami pI: 3,3; 4,7; 6,2; 7,6; 11,0. Jako anolitu i katolitu użyto odpowiednio roztworów 0,05 M H_3PO_4 o przewodności właściwej 5,2 mS/cm, i 0,05 M NaOH o przewodności właściwej 11 mS/cm. Zastosowany nośnik (włóknina) charakteryzował się odpowiednimi: hydrofilowością, aby utrzymać wodny roztwór pomiędzy włóknami, i przepuszczalnością, aby umożliwić przepływ fazy ruchomej pod minimalnym hydrostatycznym ciśnieniem (Rys. 27). Została tu wykorzystana zasada ciągłości strugi przy odpowiedniej różnicy wysokości pomiędzy wejściem i wyjściem układu. Ukazało się szereg nowych prac na temat usprawnień urządzenia do DF IEF [68–70].



Rysunek 26. Schemat urządzenia do DF IEF; 1 – trapezoidalny obszar separacji, 2 – anolit, 3 – amfolit, 4 – katolit, 5 – anoda, 6 – katoda, 7 – wyjście układu rozdzielczego, 8 – obszar o wysokiej przewodności, 9 – obszar o niskiej przewodności [68]

Figure 26. The scheme of a device for DF IEF, 1 – trapezoidal separation area, 2 – anolyte, 3 – amfolite, 4 – catholyte, 5 – anode, 6 – cathode, 7 – exit of separation system, 8 – area of high conductivity, 9 – area of low conductivity [68]



Rysunek 27. Widok urządzenia do DF IEF [68]

Figure 27. View of a DF IEF device [68]

PODSUMOWANIE

Techniki wykorzystujące do rozdzielania składników mieszanin substancji dwa procesy elektroforezy i chromatografii, które są prowadzone jednocześnie i ortogonalnie, stanowią obiecujący kierunek rozwoju metod elektromigracyjnych separacyjnych, zarówno do celów rozdzielania analitycznego, jak i preparatywnego. Wydaje się, że szczególnie ortogonalna elektrochromatografia planarna ciśnieniowa, dzięki zastosowaniu wysokiego ciśnienia, może być tą techniką, która przyczyni się do znacznego zwiększenia efektywności prowadzenia takiego procesu rozdzielania.

PODZIĘKOWANIE

Niniejsza praca powstała w ramach realizacji projektu badawczego własnego finansowanego przez Narodowego Centrum Nauki, nr umowy 3473/B/H03/2011/40.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A. Rajendran, G. Paredes, M. Mazzotti, J. Chromatogr. A, 2009, **1216**, 709.
- [2] Ł. Cieśla, M. Wakszudzka-Hajnos, J. Chromatogr. A, 2009, **1216**, 1035.
- [3] V.G. Berezkin, N. Yu. Kulakova, Zh. Fiz. Khim., 2009, **83**, 1961.
- [4] V.G. Berezkin, S.S. Khrbetova, N. Yu. Kulakova, Dok Phys. Chem., 2009, **429**, 229.
- [5] M.A. Hawrył, A. Hawrył, E. Soczewiński, J. Planar Chromatogr., 2002, **15**, 4.
- [6] A. van der Horst, P. J. Schoenmakers, J. Chromatogr. A, 2003, **1000**, 693.
- [7] D.R. Stoll, X. Li, X. Wang, P. W. Carr, S.E.G. Porter, S.C. Rutan, J. Chromatogr. A, 2007, **1168**, 3.
- [8] P. Jandera, J. Chromatogr. A, 2012, **1255**, 112.
- [9] I. Francois, K. Sandra, P. Sandra, Anal. Chim. Acta, 2009, **641**, 14.
- [10] L. Riggs, C. Sioma, F.E. Reginer, J. Chromatogr. A, 2001, **924**, 359.
- [11] P. Dugo, O. Favoino, R. Luppino, G. Dugo, L. Mondello, Anal. Chem., 2004, **76**, 2525.
- [12] P.Q. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello, J. Chromatogr. A, 2004, **1054**, 3.
- [13] P.I. Dobrev, L. Havlíček, M. Vágner, J. Malbeck, M. Kaminek, J. Chromatogr. A, 2005, **1075**, 159.
- [14] M.A. Hawrył, E. Soczewiński, T.H. Dzido, Chem. Anal. (Warsaw), 1999, **44**, 15.
- [15] J. Namieśnik, W. Chrzanowski, P. Szpinek, *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym, Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego*, Gdańsk, 2003.
- [16] T. Górecki, J. Harynuk, O. Panić, J. Sep. Sci., 2004, **27**, 359.
- [17] J. Hernan, B. Cortes, B. Winniford, J. Luong, M. Pursch, J. Sep. Sci., 2009, **32**, 883.
- [18] M. Edwards, A. Mostafa, T. Górecki, Anal. Bioanal. Chem., 2011, **40**, 2335.
- [19] T. Górecki, O. Panić, N. Oldridge, J. Liq. Chromatogr. Related Technol., 2006, **29**, 1077.
- [20] D. Ryan, P. Morrison, P. Marriott, J. Chromatogr. A, 2005, **1071**, 47.
- [21] J.B. Phillips, J. Beens, J. Chromatogr. A, 1999, **856**, 331.
- [22] R. Westermeier, T. Naven, H. Hopker, *Proteomics in practice: a guide to successful experimental design*, Wiley-VCH, 2008.
- [23] A. Suchwałko, H. Podbielska, Acta Bio-Opt. Inform. Med., 2010, **16**, 285.
- [24] P.W. Płocharz, P. Ślązak, A. Hałka-Grysińska, A. Chomicki, T.H. Dzido, Wiad. chem., 2010, **64**, 61.
- [25] A. Chomicki, P. Ślązak, T.H. Dzido, Electrophoresis, 2009, **30**, 3718.
- [26] A. Chomicki, K. Kloc, T.H. Dzido, J. Planar Chromatogr., 2011, **24**, 1.
- [27] P.W. Płocharz, A. Klimek-Turek, T.H. Dzido, J. Chromatogr. A, 2010, **1217**, 4868.
- [28] B. Polak, A. Hałka, T.H. Dzido, J. Planar Chromatogr., 2008, **21**, 33.
- [29] A. Hałka, P.W. Płocharz, A. Torbicz, T.H. Dzido, J. Planar Chromatogr., 2010, **23**, 420.
- [30] P.W. Płocharz, T.H. Dzido, P. Ślązak, G.W. Józwiak, A. Torbicz, J. Chromatogr. A, 2007, **1170**, 91.
- [31] T.H. Dzido, P.W. Płocharz, P. Ślązak, Anal. Chem., 2006, **78**, 4713.
- [32] T.H. Dzido, P.W. Płocharz, A. Klimek-Turek, A. Torbicz, B. Buszewski, J. Planar Chromatogr., 2008, **21**, 295.
- [33] H. Svensson and I. Brattsten, Arkiv Kemi., 1949, **1**, 401.
- [34] G. Haugaard, T.D. Kroner, J. Am. Chem. Soc., 1948, **70**, 2135.
- [35] D.L. Mould, R. L. M Synge, Biochem J., 1954, **58**, 585.
- [36] W. Grassmann and K. Hannig, Z. Physiol. Chem., 1953, **292**, 32.
- [37] W. Grassmann, Naturwiss., 1951, **38**, 200.

- [38] T.R. Sato, W.P. Norris, H.H. Strain, *Anal. Chem.*, 1952, **24**, 776.
- [39] H.H. Strain, J.C. Sullivan, *Anal. Chem.*, 1951, **23**, 816.
- [40] M. Lederer, *An Introduction To Paper Electrophoresis And Related Methods*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York, Princeton, 1957.
- [41] E.L. Durrum, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 4875.
- [42] E.L. Karlson, United States Patent, Patent Number 4,315,812.
- [43] Ch.D. Scott, O. Ridge, Tenn., United States Patent, Patent Number 4,683,042.
- [44] D. Nurok, J.M. Koers, A.L. Novotny, M.A. Carmichael, J.J. Kosiba, R.E. Santini, G.L. Hawkins, R.W. Replogle, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 1690.
- [45] A. Hałka-Grysińska, P. Ślęzak, A. Torbicz, M. Sajewicz, T.H. Dzido, *Chromatographia*, 2013, **76**, 1271.
- [46] E. Tyihák, E. Mincsovcics, H. Kalász, *J. Chromatogr A.*, 1979, **174**, 75.
- [47] Operating Manual for Personal OPLC. OPLC-BS-50. Budapest: OPLC-NIT Co., 1994.
- [48] <http://www.microsolvytech.com/oplc.asp>.
- [49] R. Laskowski, H.J. Bart, H. Gruber-Wölfler, P. Feenstra, M.G. Braunbruck, J. Khinast, C. Hofmann, G. Menges, B. Werner, P. Löb, V. Hessel, 8th European Congress of Chemical Engineering (ECCE), Berlin, Germany, September 25–29, 2011.
- [50] M.C. Roman, P.R. Brown, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 86A.
- [51] Z. Pruski, V. Kasicka, P. Mudra, J. Stepanek, O. Smekal, J. Hlavack, *Electrophoresis*, 1990, **11**, 932.
- [52] K. Zeiller, R. Loser, G. Pascher, K. Hannig, Z. Hoppe-Syler's, *Physiol. Chem.*, 1975, **356**, 1225.
- [53] L.S. Rodkey, *Appl. Theor. Electrophor.*, 1990, **1**, 243.
- [54] R. Kessler, H.J. Manz, *Electrophoresis*, 1990, **11**, 979.
- [55] S. Hoffstetter-Kuhn, H. Wagner, *Electrophoresis*, 1990, **11**, 451.
- [56] S. Nath, H. Schutte, G. Weber, H. Hustedt, W.D Deckwer, *Electrophoresis*, 1990, **11**, 937.
- [57] K.A Knisley, L.S. Rodkey, *Electrophoresis*, 1990, **11**, 927.
- [58] M.J. Clifton, N. Jouve, H. de Balmann, V. Sanchez, *Electrophoresis*, 1990, **11**, 913.
- [59] M. Poggel, T. Melin, *Electrophoresis*, 2001, **22**, 1008.
- [60] S. Kohler, C. Weilbeer, S. Howitz, H. Becker, V. Beushausen, D. Belder, *Lab Chip*, 2011, **11**, 309.
- [61] C.X. Zhang, A. Manz, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 5759.
- [62] H. Lu, S. Gaudet, M.A. Schmidt, K.F. Jensen, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 5705.
- [63] K. Macounova, C.R. Cabrera, M.R. Holl, P. Yager, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 3745.
- [64] J.W. Albrecht, K.F. Jensen, *Electrophoresis*, 2006, **27**, 4960.
- [65] D. Kohlheyer, G.A.J. Besselink, S. Schlautmann, R.B.M. Schasfoort, *Lab Chip.*, 2006, **6**, 374.
- [66] D.P. de Jesus, L. Blanes, C.L. do Lago, *Electrophoresis*, 2006, **27**, 4935.
- [67] N. Pamme, *Lab Chip.*, 2007, **7**, 1644.
- [68] K. Slais, *Electrophoresis*, 2008, **29**, 2451.
- [69] M. Stastna, K. Slais, *Electrophoresis*, 2010, **31**, 433.
- [70] M. Stastna, K. Slais, *Electrophoresis*, 2008, **29**, 4503.

