

**ELEKTROFOREZA SWOBODNA Z PRZEPŁYWEM
HYDRODYNAMICZNYM – PODSTAWY
TEORETYCZNE I ROZWIĄZANIA TECHNICZNE**
FREE FLOW ELECTROPHORESIS – THEORY AND
TECHNOLOGY

Piotr Hoda*, Beata Polak, Tadeusz H. Dzido

*Zakład Chemii Fizycznej, Katedra Chemii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 4A, 20-093 Lublin
e-mail: piotr.hoda@gmail.com

Abstract

Wprowadzenie

1. Podstawy teoretyczne

2. Rozwiązania techniczne

2.1. Pierwsze urządzenia do elektroforezy swobodnej z przepływem i ich dalszy rozwój

2.2. Urządzenia z recyrkulującym przepływem buforu podstawowego

2.3. Elektroforezery wieloprzędziałowe

2.4. Urządzenia o symetrii radialnej

2.5. Miniaturyzacja

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Piotr Hoda, absolwent kierunku farmacja (specjalność lek roślinny) Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. W 2017 roku obronił z wyróżnieniem pracę magisterską „Rozdzielanie mikropreparatywnie wybranych diastereoizomerów techniką ortogonalnej elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej”.

Beata Polak, ukończyła studia na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej (obecny Uniwersytet Medyczny) w Lublinie w 1990 roku, od tego roku też rozpoczęła pracę w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej na tymże Uniwersytecie. Uzyskała stopnie naukowe: doktora nauk farmaceutycznych – 1998 r., doktora habilitowanego nauk farmaceutycznych – 2017 r. Od 1999 roku jest adiunktem w Zakładzie Chemii Fizycznej Katedry Chemii. Jej zainteresowania naukowe to rozdzielanie związków wykazujących aktywność biologiczną ze szczególnym uwzględnieniem rozdzielania izomerów i stereoizomerów. Jej dorobek naukowy to około 40 artykułów naukowych i rozdziałów w książkach.

Tadeusz H. Dzido, prof. zw. Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, ukończył studia chemiczne w 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. Odbył staże naukowe w Uniwersytecie Wiedeńskim, 1981/82 jako stypendysta Fundacji SEA i w Uniwersytecie Saarbruecken, 1987-1989, jako stypendysta Fundacji Aleksandra von Humboldta. Jest kierownikiem Zakładu Chemii Fizycznej Katedry Chemii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Zainteresowania naukowe: mechanizm retencji i selektywności rozdzielania substancji, głównie biologicznie aktywnych, w układach chromatografii cieczowej i elektrochromatografii, analiza chemiczna z wykorzystaniem technik chromatografii cieczowej i elektromigracyjnych, konstrukcje urządzeń/komór do technik chromatografii i elektrochromatografii planarnej/warstwowej. Autor/współautor ok. 140 prac naukowych, 30 patentów. Jest jednym z redaktorów *Journal of Planar Chromatography*, należy do Naukowego Komitetu Redakcyjnego *Acta Chromatographica*.

ABSTRACT

Free flow electrophoresis, or carrier-free electrophoresis, is a technique based upon the principle of mobility of chargeable species in the electric field. However, unlike more widespread gel electrophoresis, free flow electrophoresis does not utilise any kind of solid support medium. Instead, species to be separated move within the space filled with aqueous buffer, which is constantly pumped in the direction perpendicular to the direction of the applied electric field. Such set-up allows for continuous separation, as compounds of the sample being processed form separate bands and leave the separation system through several different outlets located along the edge of the chamber. Furthermore, the use of mild separation conditions increases the chance of biologically active compounds retaining their activity after the separation is finished. These qualities make free flow electrophoresis an excellent tool for protein research and cytology.

In this review, the basic theoretical aspects of the technique are outlined, with a special emphasis placed on various modes in which free flow electrophoresis can be operated. Besides, a review of milestone papers related to free flow electrophoresis technology is presented. Apart from the devices following the original concept of Barrolier and Hannig, an insight into the construction of recirculating instrumentation, multicompartment electrolyzers as well as radially-symmetric chambers is provided. A special focus is placed on patents and commercialized solutions. Finally, the challenges of scaling-down free flow electrophoresis to micro-dimensions are introduced.

Keywords: free flow electrophoresis, electromigration techniques, pseudo-two dimensional separation, preparative separation, micro free flow electrophoresis

Słowa kluczowe: elektroforeza swobodna z przepływem hydrodynamicznym, techniki elektromigracyjne, rozdzielanie pseudo-dwuwymiarowe, rozdzielanie preparatywne, mikro-elektroforeza swobodna z przepływem hydrodynamicznym

WPROWADZENIE

Pod względem środowiska, w którym prowadzony jest proces, techniki elektroforetyczne podzielić można na wykorzystujące nośnik (żel, bibuła) oraz jego pozbawione (elektroforeza swobodna, ang. *free electrophoresis*, FE). Elektroforeza swobodna z kolei prowadzona może być w U-rurce, w kapilarze (elektroforeza kapilarna), lub w komorze o innej geometrii. Anglojęzyczny termin *free flow electrophoresis*, FFE, najczęściej używany jest w odniesieniu do technik wykorzystujących płaskie komory oraz hydrodynamiczny przepływ buforu podstawowego. Nazwa tej techniki nie została uwzględniona w najnowszym słowniku chromatografii i technik elektromigracyjnych [1]. Dlatego w niniejszej pracy stosujemy nazwę elektroforeza swobodna z przepływem. Płaska konstrukcja komory do takiej elektroforezy umożliwia ortogonalne skrzyżowanie kierunku hydrodynamicznego przepływu buforu podstawowego z kierunkiem linii przyłożonego pola elektrycznego. Przy takiej konfiguracji, kierunek migracji składników próbki dostarczonej do układu jest wypadkową kierunku przepływu buforu podstawowego i ruchliwości elektroforetycznej rozdzielanych związków. Umożliwia to rozdzielanie składników dostarczonej mieszaniny w trybie ciągłym, co stwarza możliwość stosowania elektroforezy swobodnej w celach preparatywnych, przy zachowaniu wysokiej wydajności (brak konieczności okresowego zatrzymywania procesu w celu ponownego dostarczenia próbki do rozdzielania). Rezygnacja z porowatego nośnika zapewnia wysoki odzysk rozdzielanych związków, które dodatkowo, ze względu na najczęściej stosowane buforu wodne pozbawione modyfikatora organicznego, utrzymują swoją pierwotną strukturę, zachowując tym samym przydatność np. do badań aktywności biologicznej [2–4]. Wymienione cechy usposabiają elektroforezę swobodną do preparatywnego rozdzielania peptydów [5, 6], białek [7, 8], kwasów nukleinowych [9] komórek [10–12] i ich części [13, 14]. Ponadto, opisano zastosowania tej techniki do rozdzielania enancjomerów [15–17] i nanocząstek [18, 19]. Celem niniejszej pracy jest omówienie podstaw teoretycznych elektroforezy swobodnej z przepływem oraz przedstawienie kluczowych osiągnięć rozwoju tej techniki. Pokróćce opisane zostaną również najnowsze kierunki badań oraz postępy związane z miniaturyzacją stosowanych urządzeń.

1. PODSTAWY TEORETYCZNE

Istotą rozdzielania składników mieszaniny podczas procesu elektroforezy kapilarnej jest zróżnicowany dystans ich migracji w polu elektrycznym, zgodnie z równaniem:

$$d = \mu_{ep} Et \quad (1)$$

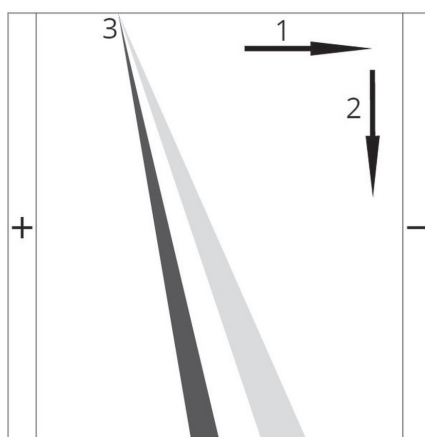
gdzie d – dystans migracji, μ_{ep} – ruchliwość elektroforetyczna, E – natężenie pola elektrycznego, t – czas trwania procesu.

Ruchliwość elektroforetyczna wyraża się z kolei wzorem:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi r\eta} \quad (2)$$

gdzie q – ładunek cząstki lub jonu, r – promień cząstki lub jonu, η – lepkość buforu podstawowego.

Z powyższych zależności wynika więc, że w elektroforezie kapilarnej substancje są rozdzielane na podstawie różnic stosunku ładunku do wielkości (promienia) cząstek/jonów [20]. W technice elektroforezy swobodnej z przepływem na ruch cząstek/jonów w polu elektrycznym nakłada się hydrodynamiczny przepływ buforu podstawowego w kierunku prostopadłym. Proces ten odbywa się w płaskiej komorze, której dwie duże ściany naprzeciwległe są oddalone od siebie w zakresie od 0,035 do 0,7 mm. Zastosowane rozwiązanie skutkuje odchyleniem się pasm substancji rozdzielanych od kierunku przepływu buforu podstawowego o kąt, którego wartość odzwierciedla relacje wynikające z właściwości substancji, natężenia pola elektrycznego, rozmiarów komory oraz prędkości liniowej przepływu buforu podstawowego [21]. Zasada działania techniki elektroforezy swobodnej z przepływem zilustrowana jest na schemacie (Rys. 1).



Rysunek 1. Zasada działania elektroforezy swobodnej z przepływem w trybie elektroforezy strefowej. 1 – kierunek pola elektrycznego, 2 – kierunek przepływu hydrodynamicznego, 3 – miejsce wprowadzania próbki, „+” – anoda, „-” – katoda

Figure 1. The principle of action of free flow electrophoresis in zone electrophoresis mode. 1 – direction of electric field, 2 – direction of hydrodynamic flow, 3 – sample introduction site, „+” – anode, „-” – cathode

Elektroforeza swobodna z przepływem jest więc techniką, która poszerza elektroforezę kapilarną o dodatkowy wymiar migracji rozdzielanych substancji, dzięki czemu umożliwia prowadzenie procesu w sposób ciągły. Szersze omówienie tematyki korelacji elektroforezy kapilarnej i elektroforezy swobodnej z przepływem znaleźć można w publikacjach [5, 6, 16, 22–27].

Tak jak w innych technikach separacji, szereg zjawisk fizyko-chemicznych utrudnia uzyskanie zadowalającej rozdzielczości. Poniższe równanie przedstawia zasadnicze składowe poszerzenia pasm rozdzielanych substancji w elektroforezie swobodnej z przepływem:

$$\sigma_T^2 = \sigma_{INJ}^2 + \sigma_D^2 + \sigma_{HD}^2 + \sigma_{ED}^2 + \sigma_{JH}^2 + \sigma_{EMD}^2 \quad (3)$$

gdzie σ_T^2 – całkowita wariancja pasma rozdzielanej substancji, σ_{INJ}^2 – wariancja związana z szerokością pasma próbki w miejscu dozowania, σ_D^2 – wariancja związana z dyfuzją w kierunku migracji w polu elektrycznym, σ_{HD}^2 – wariancja związana z przepływem hydrodynamicznym, σ_{ED}^2 – wariancja elektrodynamiczna, σ_{JH}^2 – wariancja związana z ciepłem Joule’a, σ_{EMD}^2 – wariancja elektrodyspersyjna.

Część z powyższych składników wymaga dodatkowego omówienia:

- wariancja hydrodynamiczna (σ_{HD}^2): mechanicznie tłoczony elektrolit podstawowy przyjmuje paraboliczny profil przepływu, tzn. warstwy płynące w bezpośrednim sąsiedztwie górnej i dolnej pokrywy komory płyną wolniej niż warstwy znajdujące się w głębi roztworu. W rezultacie, cząstki/jony substancji, migrujące w pobliżu pokryw, będą opóźnione w kierunku przepływu hydrodynamicznego w stosunku do cząstek w głębi roztworu, co skutkuje deformacją pasma substancji [28, 29],
- wariancja elektrodynamiczna (σ_{ED}^2): w zależności od materiału, z którego wykonane są pokrywy komory, po przyłożeniu napięcia może powstać przepływ elektroosmotyczny buforu (ang. *electroosmotic flow*, EOF). Powoduje to przesunięcie pasm rozdzielanych substancji wraz z całą objętością buforu podstawowego w kierunku prostopadłym do kierunku przepływu hydrodynamicznego [30],
- wariancja wywołana ciepłem Joule’a (σ_{JH}^2): przepływ prądu elektrycznego przez przewodnik powoduje wydzielanie się ciepła zgodnie z równaniem:

$$Q = RI^2t \quad (4)$$

gdzie Q – wydzielone ciepło, R – opór elektryczny przewodnika, I – natężenie prądu, t – czas trwania procesu.

Wydzielające się ciepło powoduje spadek lepkości buforu podstawowego, szczególnie w głębi roztworu, gdyż ciepło wydzielające się w warstwach bezpośrednio sąsiadujących z pokrywami komory ulega bardziej efektywnemu rozproszeniu. Powoduje to powstanie gradientu temperatury w środowisku prowadzenia procesu, co skutkuje lokalnymi zmianami ruchliwości elektroforetycznej rozdzielanych substancji i wynikającym z nich rozmyciem [31, 32].

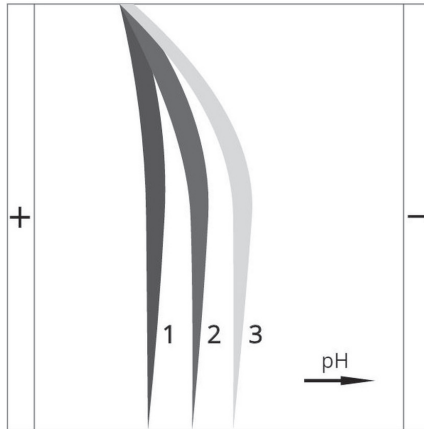
- wariancja elektrodyspersyjna (σ_{EMD}^2): podłożem dla tego rodzaju rozmycia są różnice przewodności między roztworem próbki, a buforem podstawowym. W przypadku, gdy roztwór próbki charakteryzuje się wyższą przewodnością niż otaczający roztwór elektrolitu, dochodzi do poszerzenia strumienia

próbki (ruchliwość rozdzielanych cząstek/jonów jest większa w roztworze o mniejszej przewodności). Odwrotnie, zastosowanie roztworu próbki o przewodności mniejszej niż otaczającego elektrolitu spowoduje skupienie się pasma dozowanej próbki [33].

Proces FFE może być prowadzony w kilku trybach: elektroforeza strefowa (ang. *free flow zone electrophoresis*, FFZE), ogniskowanie izoelektryczne (ang. *free flow isoelectric focusing*, FFIEF), izotachoforeza (ang. *free flow isotachopheresis*, FFITP), elektroforeza ze skokowym gradientem pola (ang. *free flow field step electrophoresis*, FFFSE).

W trybie elektroforezy strefowej (Rys. 1) stosuje się bufor podstawowy, który w czasie prowadzonego procesu zachowuje możliwie jednolite pH oraz przewodność elektryczną. Dobór buforu podstawowego odbywa się z uwzględnieniem właściwości rozdzielanych substancji, np. gdy celem prowadzenia procesu jest oddzielenie substancji amfiprotycznej od rozpuszczalnych zanieczyszczeń, pH środowiska należy dobrać w ten sposób, aby było ono równe wartości punktu izoelektrycznego oczyszczanej substancji, która migruje wtedy zgodnie z kierunkiem przepływu hydrodynamicznego, nie ulegając migracji w polu elektrycznym. Składniki zanieczyszczające natomiast będą wykazywać ładunek różny od zera i ulegną odchyleniu w kierunku anody lub katody. Można też zastosować odwrotną strategię i dobrać pH buforu tak, by odpowiadało ono punktowi izoelektrycznemu głównego zanieczyszczenia [21]. Technika elektroforezy strefowej wykonywane są przede wszystkim separacje organelli komórkowych [34–36].

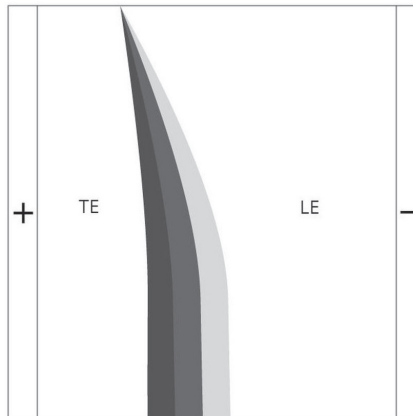
W metodzie ogniskowania izoelektrycznego (Rys. 2) istotą procesu jest zastosowanie gradientu pH w kierunku równoległym do linii sił pola elektrycznego, co w omawianej technice oznacza kierunek prostopadły do kierunku przepływu buforu podstawowego. Gradient taki można uzyskać na trzy różne sposoby: poprzez dodanie do buforu podstawowego mieszaniny amfolitów [7, 37–39], poprzez zastosowanie membran buforujących (p. niżej) oraz poprzez rozwiązania aparaturowe umożliwiające przedostawanie się do obszaru separacyjnego jonów wodorowych i wodorotlenkowych powstałych w wyniku elektrolizy wody w przedziałach elektrodowych [40]. Ogniskowanie izoelektryczne szczególnie nadaje się do rozdzielania związków o różnych wartościach pI, zwłaszcza peptydów i białek. W momencie dotarcia cząsteczek do obszaru komory o pH odpowiadającemu ich punktowi izoelektrycznemu tracą one swój sumaryczny ładunek różny od zera i przestają migrować w polu elektrycznym. Skutkuje to powstaniem wąskich pasm rozdzielanych substancji przy wyjściu z komory. Elektroforezę swobodną z przepływem i z ogniskowaniem izoelektrycznym białek przeprowadzać można zarówno w warunkach natywnych, jak i denaturujących [41].



Rysunek 2. Ogniskowanie izoelektryczne. Wartości punktu izoelektrycznego substancji 1, 2 i 3 charakteryzuje relacja: $pI_1 < pI_2 < pI_3$

Figure 2. Isoelectric focusing. Isoelectric points of the substances 1, 2 and 3 are related as follows: $pI_1 < pI_2 < pI_3$

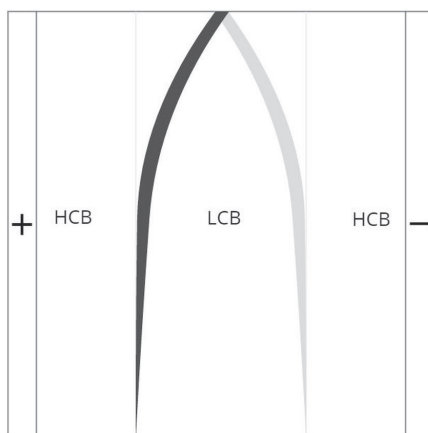
Natomiast w metodzie izotachoforezy (Rys. 3) stosuje się dwa różne bufory – jeden o ruchliwości jonów większej niż ruchliwość jonów próbki (elektrolit wiodący, ang. *leading electrolyte*, LE) i drugi o ruchliwości mniejszej od jonów próbki (elektrolit kończący, ang. *terminating electrolyte*, TE). Stosując tego rodzaju układ, rozdzielane substancje układają się w przylegające pasma od największej do najmniejszej ruchliwości elektroforetycznej [42]. Proces izotachoforezy swobodnej z przepływem opisano przede wszystkim dla celów rozdzielania białek [43–45], w tym lipoprotein [46, 47], a także organelli komórkowych [48].



Rysunek 3. Izotachoforeza swobodna z przepływem. LE – elektrolit wiodący, TE – elektrolit kończący

Figure 3. Free flow isotachopheresis. LE – leading electrolyte, TE – terminating electrolyte

W trybie elektroforezy ze skokowym gradientem pola (Rys. 4) wykorzystywane są różnice przewodności elektrycznej stosowanych buforów podstawowych – przez środkową część komory tłoczony jest bufor o stosunkowo niskiej przewodności, natomiast po obu jego stronach wprowadzany jest elektrolit o przewodności wysokiej. Zastosowanie takiego rozwiązania sprawia, że pasma rozdzielanych substancji ulegają skupieniu w momencie dotarcia do granicy dwóch układów buforowych, co wynika z nagłego obniżenia ich ruchliwości elektroforetycznej [21, 49].



Rysunek 4. Elektroforeza swobodna z przepływem ze skokowym gradientem pola. LCB – bufor o niskiej przewodności, HCB – bufor o wysokiej przewodności

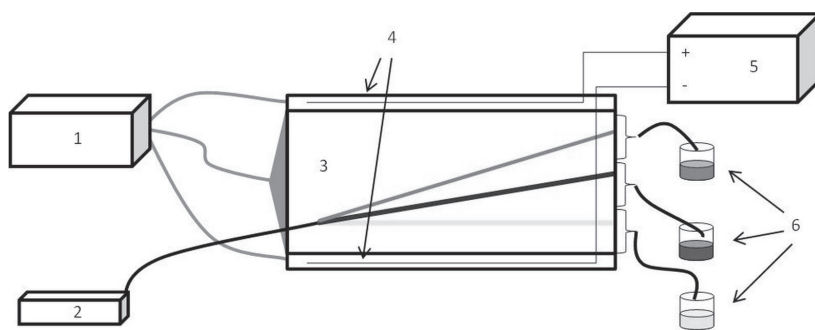
Figure 4. Free flow field step electrophoresis. LCB – low conductivity buffer, HCB – high conductivity buffer

Powyższe strategie scharakteryzowane zostały dla procesu prowadzonego w sposób ciągły. Istnieje jednak możliwość prowadzenia procesu w sposób interwałowy. Najpierw uruchamiany jest przepływ hydrodynamiczny i do układu wprowadzana jest próbka. Następnie tłoczenie buforu podstawowego jest zatrzymywane i uruchamiane jest pole elektryczne. Od tego momentu składniki próbki migrują w jednym kierunku zgodnie ze swoją ruchliwością elektroforetyczną. Po osiągnięciu zadowalającego rozdzielania pole elektryczne jest wyłączane, ponownie uruchamiany jest przepływ hydrodynamiczny i rozdzielone substancje są wyprowadzane z układu separacyjnego. Jakkolwiek rozwiązanie to nie pozwala na wykorzystanie zalet płynących z ciągłego trybu rozdzielania, to jednak korzystnie przeciwdziała przyczynom poszerzenia pasm substancji. Proces interwałowy opisano zarówno dla elektroforezy strefowej [15, 50], jak i izotachoforezy [51].

2. ROZWIĄZANIA TECHNICZNE

2.1. PIERWSZE URZĄDZENIA DO ELEKTROFOREZY SWOBODNEJ Z PRZEPLYWEM I ICH DALSZY ROZWÓJ

W literaturze przedmiotu jako początek techniki elektroforezy swobodnej z przepływem zgodnie cytowane są prace Barrolliera [52] i Hanniga [53]. W pierwszej z nich zaprezentowano duże urządzenie (ok. 60×60 cm), skonstruowane z dwóch szklanych płyt, pomiędzy którymi znajdowała się szczelina szerokości ok. 0,5 mm. Po bokach tak utworzonej komory umieszczone były przedziały elektrodowe, oddzielone od właściwej przestrzeni separacyjnej paskami bibułowymi. W miejscu wejściowej krawędzi do komory tłoczony był bufor oraz roztwór próbki. Na przeciwległym końcu rozdzielone składniki spływały po paskach bibuły do kilkudziesięciu zbiorników. Zbliżone konstrukcyjnie urządzenie przedstawił Hannig, który zaprezentował jego wykorzystanie do rozdzielania barwników, aminokwasów, peptydów, białek surowicy, a także erytrocytów króliczych i ludzkich. W roku 1975 podobną konstrukcją opisał Wagner [54]. Ogólny schemat budowy tego typu urządzeń przedstawia Rysunek 5. W latach 80. firma Bender and Hobein wprowadziła na rynek aparaty bazujące na powyższych koncepcjach (modele Elphor Vap 5, 11, 21, 22, 220) [55].

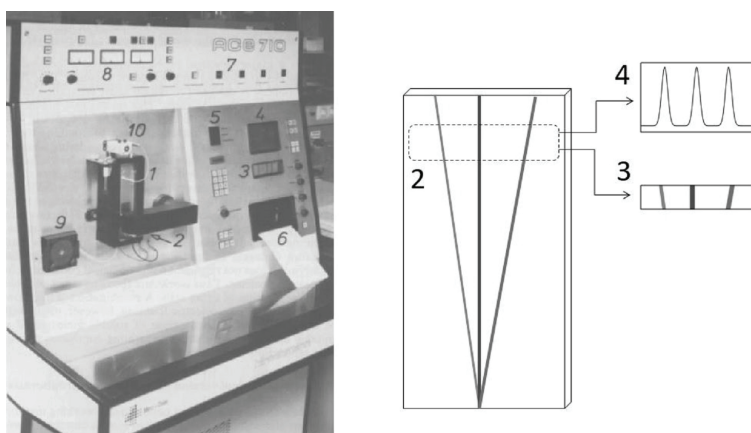


Rysunek 5. Budowa podstawowego urządzenia do elektroforezy swobodnej z przepływem. 1 – pompa elektrolitu podstawowego, 2 – pompa roztworu próbki, 3 – przestrzeń separacyjna, 4 – przedziały elektrodowe, 5 – zasilacz, 6 – zbiorniki frakcji

Figure 5. Basic free flow electrophoresis setup. 1 – background electrolyte pump, 2 – sample solution pump, 3 – separation area, 4 – electrode compartments, 5 – power supply, 6 – fraction containers

Inną koncepcję przedstawił Hannig w pracach z przełomu lat 70. i 80. [56, 57]. Zaprezentowana została konstrukcja aparatu typowo analitycznego, o rozmiarach komory separacyjnej $3 \times 18 \times 0,035$ cm. Jedna z pokryw wyposażona została w okienko kwarcowe, które stwarzało możliwość detekcji densytometrycznej przy użyciu specjalnie skonstruowanej głowicy skanującej. Urządzenie wyposażone było w układy elektroniczne umożliwiające cyfrowy zapis uzyskiwanych wyników. Średni czas pojedynczej analizy w tym urządzeniu wynosił 30–90 s. Autorzy zapre-

zentowali wyniki separacji m.in. białek surowicy ludzkiej oraz erytrocytów ludzkich i króliczych. Wykazano wysoką powtarzalność wyników uzyskiwanych w kolejno następujących po sobie analizach. Ma to szczególne znaczenie przy pomiarze ruchliwości elektroforetycznej rozdzielanych cząstek, co w przypadku analizy komórek pozwala na śledzenie subtelnych zmian ładunku powierzchniowego, powstałego np. w przebiegu różnicowania. Opisane urządzenie zostało skomercjalizowane przez firmę Hirschmann jako ACE710 (Rys. 6).

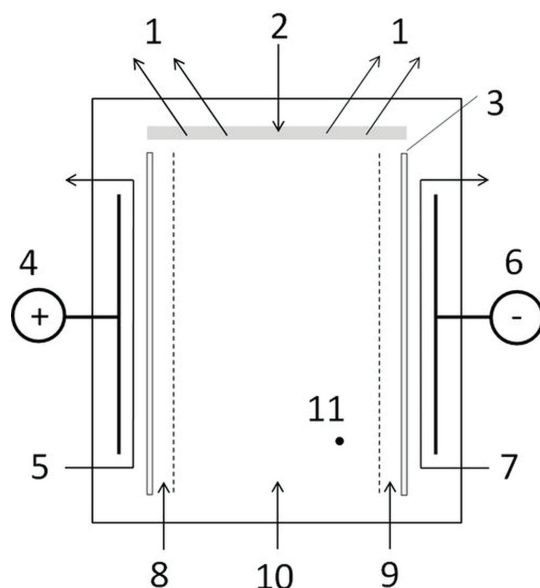


Rysunek 6. Urządzenie analityczne ACE710. 1 – komora separacyjna, 2 – okienko optyczne, 3 – wyświetlacz do obserwacji rozdzielanych pasm, 4 – wyświetlacz krzywej dystrybucji pasm, 5 – wyświetlacz wartości ruchliwości elektroforetycznych, 6 – drukarka, 7 – pomocnicze wskaźniki kontroli procesu, 8 – panel sterowania parametrami eksperymentu, 9 – pompa buforu podstawowego, 10 – pompa próbki. Przedruk za zgodą z [57].

Figure 6. ACE710 analytical apparatus. 1 – separation chamber, 2 – optical window, 3 – display of separated bands, 4 – display of components' distribution curves, 5 – electrophoretic mobility display, 6 – printer, 7 – timing values for process control, 8 – panel for control of experiment parameters, 9 – background electrolyte pump, 10 – sample pump. Reprinted with permission from [57].

Nową konstrukcję urządzenia do FFE zaprezentowali Weber i Boček [58]. W odróżnieniu od klasycznych aparatów Hanniga i Barrolliera, przedstawiona przez nich komora o wymiarach części separacyjnej $50 \times 10 \times 0,05$ cm wyposażona została w rozwiązania techniczne umożliwiające przyspieszony przepływ buforu podstawowego wzdłuż krańców komory separacyjnej (w bezpośrednim sąsiedztwie membran ograniczających przedziały elektrodowe) oraz przepływ przeciwny przy kapilarach odprowadzających produkty separacji z układu (Rys. 7). Pierwsze rozwiązanie zapobiega przedostawaniu się do medium separacyjnego produktów elektrolizy z przedziałów elektrodowych (przede wszystkim tlenu, wodoru, jonów H^+ i OH^-), drugie natomiast uniezależnia przepływ w kapilarach wyprowadzających od różnych gęstości i lepkości roztworów zbieranych frakcji. Opisano separacje przy użyciu tego urządzenia zarówno w trybie ZE, IEF, jak i ITP [36, 37, 51]. Dodatkowo, przedstawiono możliwość

przewodzenia procesu zarówno w trybie ciągłym, jak i interwałowym [15, 50, 51]. Urządzenie to pierwotnie zostało skomercjalizowane jako OCTOPUS przez Dr. Weber GmbH. Następnie produkcją i dystrybucją urządzenia opartego na tej technologii zajęła się firma TECAN (aparat ProTeam FFE, [59]), a później BD Diagnostics [60]. Obecnie, nowe generacje aparatu produkowane i sprzedawane są przez firmę FFE Services GmbH [61].



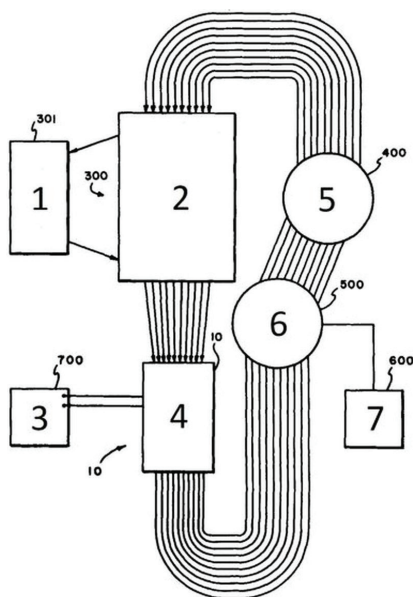
Rysunek 7. Schematyczna ilustracja komory do elektroforezy swobodnej skonstruowanej przez Webera i Bočka [58]. 1 – odpływy rozdzielanych frakcji, 2 – przepływ przeciwny, 3 – membrana oddzielająca przedział elektrodowy od przestrzeni separacyjnej, 4 – anoda, 5 – przepływ anolitu w przedziale anodowym, 6 – katoda, 7 – przepływ katolitu w przedziale katodowym, 8 – przepływ brzegowy anolitu, 9 – przepływ brzegowy katolitu, 10 – mieszanina amfolity, 11 – miejsce wprowadzania próbki do układu

Figure 7. A schematic illustration of a free flow electrophoresis chamber constructed by Weber and Boček [58]. 1 – separated fractions outlets, 2 – countercurrent flow, 3 – membrane separating electrode compartment from separation bed, 4 – anode, 5 – anolyte flow within anode compartment, 6 – cathode, 7 – catholyte flow within cathode compartment, 8 – anolyte sheath flow, 9 – catholyte sheath flow, 10 – carrier ampholytes, 11 – sample introduction site

2.1. URZĄDZENIA Z RECYRKULUJĄCYM PRZEPŁYWEM BUFORU PODSTAWOWEGO

Powyższe rozwiązania skoncentrowane są na rozdzielaniu ciągłym, tzn. próbka jest nieprzerwanie dostarczana i rozdzielana. W niektórych jednak przypadkach taka metodyka jest niezadowolająca z punktu widzenia uzyskiwanej rozdzielczości. Bier [62, 63] opatentował urządzenie recyrkulujące do ogniskowania izoelektrycznego o następującej zasadzie działania: komora separacyjna podzielona została membranami o grubości 5–10 μm na kilka równoległych przedziałów,

z których każdy posiadał własny przewód wyprowadzający, który przed ponownym wejściem do komory separacyjnej przechodził przez wymiennik ciepła (Rys. 8). Tym sposobem można było zwiększyć całkowity czas ekspozycji próbki na działanie pola elektrycznego, nie ryzykując jednak nadmiernego ogrzania medium separacyjnego i związanej z tym dyspersji oraz degradacji produktów rozdzielania (w przypadku substancji termowrażliwych). Urządzenie to przez autorów zostało nazwane RIEF (ang. *recycling isoelectric focusing*). W przebiegu dalszych prac urządzenie to zostało zmodyfikowane – komora separacyjna pozbawiona została membran oraz zmniejszony został jej prześwit (do 0,7 mm) [64], pozostawiono natomiast bez znaczących zmian mechanizm recyrkulacyjny. W urządzeniu tym, oprócz IEF, możliwe były także separacje ITP [65]. Aparat ten, jako RF3 został skomercjalizowany przez Protein Technologies, Inc. [66].



Rysunek 8. Schemat urządzenia z recyrkulującym przepływem buforu podstawowego. 1 – źródło cieczy chłodzącej, 2 – wymiennik ciepła, 3 – zasilacz, 4 – komora do ogniskowania izoelektrycznego, 5 – pompa wielokanałowa, 6 – detektory, 7 – moduł zapisu danych oraz mikroprocesor. Przedruk za zgodą z [66]

Figure 8. Schematic view of the recycling apparatus. 1 – coolant source, 2 – heat exchanger, 3 – power supply, 4 – IEF apparatus, 5 – multi-channel pump, 6 – sensors, 7 – data recorder and logic. Reprinted with permission from [66]

Innowacyjnym przykładem połączenia przepływu recyrkulującego i podziału przestrzeni separacyjnej membranami było urządzenie Gradiflow [67]. Autorzy zaprezentowali zestaw, w którym komora separacyjna podzielona została membraną na dwa kanały. W zależności od szerokości porów, substancje rozdzielić można było jedynie na podstawie ich ruchliwości elektroforetycznej (szerokie pory w membra-

nie) lub dodatkowo ze względu na wielkość cząstki (wąskie pory). Przy odpowiednim doborze objętości przepływających przez poszczególne kanały można również było prowadzić zatężanie próbki. Autorzy scharakteryzowali także proces elektrodializy przy użyciu urządzenia Gradiflow [68].

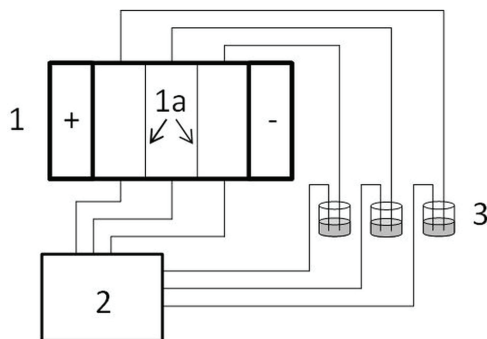
Inne urządzenie wykorzystujące ideę wielokrotnego przepływu rozdzielanej próbki przez komorę skonstruowali i opisali Kong i współpracownicy [69]. Zasada działania zaprezentowanej przez nich konstrukcji jest następująca: roztwór podstawowy zawierający mieszaninę amfolitów tłoczony jest wieloma kanałami do komory, z której rozdzielone frakcje wypływają do wielokanałowego kolektora. Po przekroczeniu zadanego poziomu cieczy w kolektorze, czujnik wysyła sygnał do modułu sterującego pompą, po czym kierunek przepływu buforu odwraca się (pompa przechodzi w tryb ssący). Cykl taki można powtórzyć wielokrotnie, aż do uzyskania zadowalającego zogniskowania pasm rozdzielanych substancji w roztworze o stabilnym gradiencie pH. Warto w tym miejscu nadmienić, że autorzy tego rozwiązania mają w swoim dorobku kilka innych prac związanych z elektroforezą swobodną, m.in. dotyczących innowacyjnych technik tłoczenia elektrolitu podstawowego i dozowania próbki [70–74].

2.3. ELEKTROFOREZERY WIELOPRZEDZIAŁOWE

Pierwszym tego rodzaju rozwiązaniem był Rotofor [75], który w 1987 roku został skomercjalizowany przez firmę Bio-Rad [66]. Komora separacyjna miała wydłużony kształt cylindryczny i podzielona była błonami półprzepuszczalnymi na segmenty. Podstawy komory stanowiły elektrody, natomiast jej osią był element chłodzący. W czasie prowadzenia procesu, komora wykonywała ciągły obrót wokół własnej osi, co miało na celu równomierne rozproszenie ciepła Joule'a i w konsekwencji ograniczenie rozmycia stref rozdzielanych substancji. Należy zauważyć, że w urządzeniach tego typu nie występuje ortogonalne nałożenie kierunków przepływu hydrodynamicznego i ruchu jonów w polu elektrycznym – procesy w nich prowadzone nie mają więc charakteru ciągłego. Tym niemniej, z uwagi na brak nośnika i podobieństwo w zakresie zastosowań, postanowiliśmy uwzględnić je w niniejszym opracowaniu.

Inne rozwiązania związane są z użyciem membran buforujących. Separacje wykonywane przy ich użyciu określić można jako pułapkowanie izoelektryczne (ang. *isoelectric trapping*, IET) i mają szczególne zastosowanie we wstępnym rozdzielaniu mieszanin białek do dalszej analizy. Podstawowym problemem przy tej technice jest odpowiednia konstrukcja membran. Odpowiednim materiałem stanowiącym rusztowanie membran jest np. celuloza, poprzecznie usieciowany alkohol poliwinylowy, tlenek polietylenu lub poliakrylamid. Stosowany może również być żel agarozowy oparty na rusztowaniu z bibuły filtracyjnej [76]. Na tak przygotowanej powierzchni immobilizowane są cząsteczki substancji z grupami jonotwórczymi w odpowiednich proporcjach tak, aby ostatecznie przygotowana membrana

wykazywała odpowiednią wartość pH i pojemność buforową. Najczęściej do tego celu służą komercyjnie dostępne mieszaniny amfolitów, jak np. Ampholine czy Pharmalytes [77]. Urządzenia do pułapkowania izoelektrycznego składają się najczęściej z kilku przedziałów, z których każdy ograniczony jest dwoma membranami o różnym pH. W ten sposób, rozdzielane białka akumulują się w przedziale ograniczonym błonami o pH odpowiednio niższym i wyższym od ich punktu izoelektrycznego. Righetti i współpracownicy zaprezentowali urządzenie składające się z dowolnej liczby modułów, każdy o pojemności około 5 ml, oddzielonych od siebie membranami izoelektrycznymi o pH odpowiadającym potrzebom danego procesu [78]. Każdy z modułów wyposażony jest w oddzielny kanał doprowadzający i odprowadzający, co pozwala na ciągłą recyrkulację jego zawartości podczas prowadzenia procesu (Rys. 9). Autorzy zaprezentowali wyniki m.in. oczyszczania rekombinowanej *N*-acetyloegliny C oraz separacji mieszaniny hemoglobiny A i C. Opatentowane rozwiązanie zostało skomercjalizowane przez firmę Hoefer Pharmacia jako aparat IsoPrime. Podobne rozwiązanie, choć o mniejszych rozmiarach (ok. 0,5 ml na jeden moduł) i pozbawione mechanizmu recyrkulującego zaprezentowali Zuo i Speicher [79]. Urządzenie bazujące na ich projekcie jest obecnie sprzedawane jako ZOOM IEF Fractionator przez firmę ThermoFischer Scientific. Podobne urządzenie, o jeszcze mniejszej pojemności przedziałów zaprezentowali Lim i współpracownicy [80]. Ogle i Shave oraz Vigh opisali urządzenia z wykorzystaniem membran izoelektrycznych bazujące na koncepcji aparatu Gradiflow [81–83].

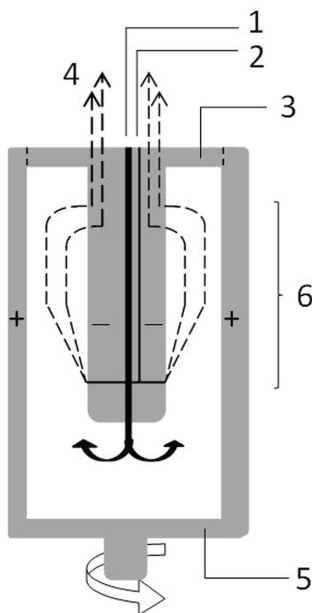


Rysunek 9. Zestaw do prowadzenia ogniskowania izoelektrycznego w elektroforezrze wielopredziałowym. 1 – elektroforezrze wielopredziałowy, 1a – membrany izoelektryczne, 2 – wielokanałowa pompa perystaltyczna, 3 – rezerwuary próbeki. Zasilacz niepokazany [78].

Figure 9. Instrumentation for isoelectric focusing in a multicompartiment electrolysers. 1 – multicompartiment electrolysers, 1a – isoelectric membranes, 2 – multi-channel peristaltic pump, 3 – sample reservoirs. Power supply not shown [78].

2.4. URZĄDZENIA O SYMETRII RADIALNEJ

Projekt aparatu o symetrii radialnej do prowadzenia elektroforezy swobodnej z przepływem przedstawili Mattock i współpracownicy [84]. W publikacji scharakteryzowana jest konstrukcja urządzenia składającego się z dwóch współosiowych cylindrów, z których jeden stanowi katodę, a drugi anodę. Pole powierzchni powstałego między cylindrami pierścienia wynosi ok. 26 cm^2 , natomiast wysokość przedziału separacyjnego 30,5 cm. Cylinder wewnętrzny w czasie prowadzenia procesu jest nieruchomy, zaś zewnętrzny wykonuje ciągły obrót wokół osi z prędkością około 150 obrotów na minutę. Powstały w ten sposób gradient prędkości kątowej zapobiega zaburzeniom przepływu laminarnego (powstają one na skutek lokalnych zmian gęstości buforu podstawowego pod wpływem wydzielającego się w czasie procesu ciepła Joule'a). Równocześnie, od dołu ku górze tłoczony jest bufor podstawowy, który wraz z pasmami rozdzielanych substancji trafia do trzydziestu otworów odpływowych na szczycie kolumny, skąd dalej płynie do kolektora frakcji (Rys. 10). Autorzy scharakteryzowali separacje m.in. białek surowicy, erytrocytów ludzkich i króliczych, a także mieszaniny barwników w trybie elektroforezy strefowej. Urządzenie według tej koncepcji skomercjalizowane zostało jako BioStream przez John Brown Engineering Co.

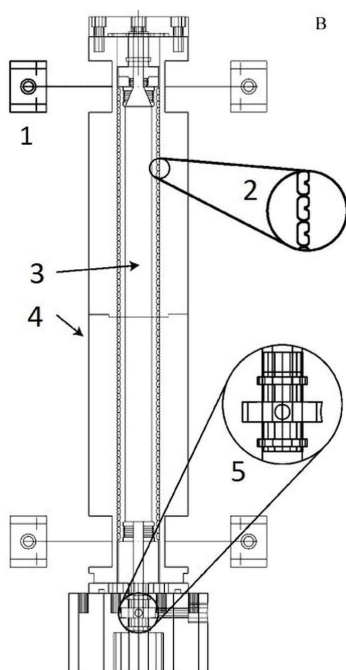


Rysunek 10. Schemat urządzenia opisanego przez Mattocka i wsp. 1 – miejsce wprowadzania buforu podstawowego, 2 – miejsce wprowadzania roztworu próbki, 3 – stator, 4 – miejsce zbioru frakcji, 5 – rotor, 6 – przestrzeń, w której zachodzi proces rozdzielania [84]

Figure 10. Schematic presentation of the device described by Mattock et al. 1 – background buffer input, 2 – sample introduction site, 3 – stator, 4 – fraction collection site, 5 – rotor, 6 – the space within which the separation process occurs [84]

Zasadniczo odmienne rozwiązanie zaprezentowali Melin i Poggel [85]. W ich urządzeniu bufor podstawowy wraz z roztworem próbki wciągany jest do przestrzeni separacyjnej w pobliżu obwodu płaskiego walca, którego podstawy zintegrowane są z elektrodami. Pasma substancji rozdzielanych spływają do kolektora frakcji znajdującego się w centrum komory separacyjnej. Autorzy rozwiązania przedstawili separację mieszaniny albuminy surowicy bydlęcej, mioglobiny i cytochromu C w trybie elektroforezy strefowej.

Inne urządzenie o symetrii radialnej przedstawił Ivory [86]. Składa się ono z wewnętrznego rotora i zewnętrznego statora, pomiędzy którymi znajduje się przestrzeń separacyjna. Na górze i na dole tak powstałej kolumny znajdują się oddzielone membranami elektrody. W czasie prowadzenia procesu wewnętrzna część wykonuje ciągły ruch obrotowy z prędkością 50–75 obrotów na minutę. Kontaktujące się z przestrzenią separacyjną powierzchnie rotora i statora wyposażone są w komplementarne wyłobienia, których odpowiednie ukształtowanie powoduje, że podczas obrotów rotora między nim a statorem wytwarzają się wiry buforu podstawowego, których charakterystyka przyczynia się do ograniczenia dyspersji pasm rozdzielanych substancji (Rys. 11). Opisano także wariant aparatu udoskonalony o możliwość detekcji spektrofotometrycznej *on-line* [87].

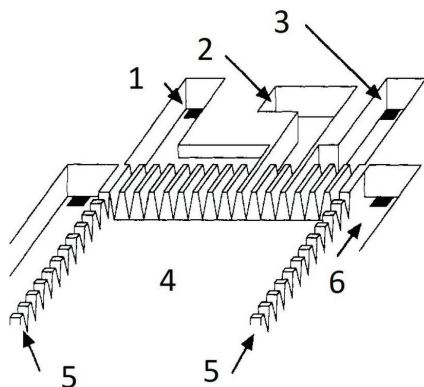


Rysunek 11. Schemat urządzenia Ivory'ego. 1 – łożysko elektrody (powiększenie), 2 – struktura wyłobień ścian przestrzeni prowadzenia procesu rozdzielania, 3 – rotor, 4 – stator, 5 – zawór wejściowy cieczy chłodzącej (powiększenie). Przedruk za zgodą z [86]

Figure 11. Schematic of Ivory's apparatus. 1 – electrode housing detail, 2 – the structure of indentations on the walls of separation bed, 3 – rotor, 4 – stator, 5 – coolant inlet detail. Reprinted with permission from [86]

2.5. MINIATURYZACJA

Innym kierunkiem rozwoju elektroforezy swobodnej z przepływem jest jej miniaturyzacja. Pierwsze urządzenie tego typu zostało skonstruowane przez Raymonda i współpracowników [88], jego ideę przedstawiono na Rysunku 12. Objętość przestrzeni separacyjnej w scharakteryzowanym rozwiązaniu to jedynie 25 μl .



Rysunek 12. Schematyczna ilustracja urządzenia zaprezentowanego przez Raymonda i współpracowników. 1,3 – miejsca wprowadzania buforu, 2 – miejsce wprowadzania próbki, 4 – miejsce prowadzenia procesu rozdzielania, 5 – matryce kanałków bocznych, 6 – przedział boczny. Przedruk za zgodą z [88]

Figure 12. Schematic illustration of the device presented by Raymond et al. 1,3 – buffer inlets, 2 – sample inlet, 4 – separation bed, 5 – side channels arrays, 6 – side bed. Reprinted with permission from [88]

Zmniejszone rozmiary tego i podobnych urządzeń skutkują zdecydowanie krótszymi czasami potrzebnymi do rozdzielania substancji w polu elektrycznym (nawet poniżej 1 sekundy [89]). Ponadto, wysoki stosunek powierzchni do objętości pozwala na efektywne rozproszenie wydzielającego się ciepła Joule'a. Tym samym zminimalizowany zostaje jeden z podstawowych problemów technicznych spotykanych w pełnowymiarowych aparatach do elektroforezy swobodnej z przepływem. Z drugiej jednak strony, w przypadku mikrokomór większego znaczenia nabiera problem akumulacji pęcherzyków gazów powstałych w wyniku elektrolizy wody, co powoduje zarówno zaburzenia przepływu hydrodynamicznego, jak również spadek efektywności zastosowanego pola elektrycznego. Rozwiązania techniczne mające na celu ograniczenie wpływu pęcherzyków na jakość separacji podzielić można na kilka grup:

- zastosowanie matrycy kanałków o małej średnicy oddzielającej przestrzeń separacyjną od przedziałów elektrodowych [88, 90, 91],
- bezpośrednia integracja elektrod w świetle komory i zastosowanie wartości napięcia niepowodujących elektrolizy wody [92],
- zastosowanie elektrod palladowych [93],

- oddzielenie przedziałów elektrodowych od przestrzeni separacyjnej przy użyciu żelowych mostków solnych [94–97],
- podział komory na przedziały przy użyciu membran [98],
- zróżnicowanie głębokości przedziałów elektrodowych i przestrzeni separacyjnej [99] oraz inne modyfikacje geometryczne [100, 101],
- izolacja elektrod i przeniesienie ładunku do przestrzeni separacyjnej na zasadzie indukcji [102],
- dodatek pary redoks chinon/hydrochinon, która ulega redukcji/utlenianiu przy potencjałach niższych niż woda i bez generacji gazów [103].

Opisano liczne przykłady rozdzielania prowadzonego przy użyciu mikro-urządzeń, zarówno w trybie elektroforezy strefowej [88, 91, 96, 97], izotachoforezy [105–107], jak również elektroforezy ze skokowym gradientem pola [98, 108]. Większość cytowanych doniesień dotyczy rozdzielania barwników fluorescencyjnych, jednak w przypadku ogniskowania izoelektrycznego opisano także separacje peptydów [89], białek [94] i organelli komórkowych [92].

Akapit ten przedstawia jedynie zarys obecnego stanu wiedzy na temat miniaturyzowanej elektroforezy swobodnej z przepływem. Znacznie pełniejsze omówienie tego zagadnienia znaleźć można w pracach przeglądowych [108–110].

PODSUMOWANIE

Od momentu przedstawienia koncepcji elektroforezy swobodnej z przepływem i konstrukcji pierwszego urządzenia, technika ta zyskała ugruntowaną pozycję wśród metod rozdzielania, szczególnie w odniesieniu do substancji wrażliwych na skład chemiczny medium separacyjnego, przede wszystkim białek i peptydów. Innym wyróżniającym ją spośród większości technik rozdzielania aspektem jest możliwość prowadzenia procesu w sposób ciągły, co czyni ją odpowiednią do zastosowań preparatywnych. W ostatnich latach, dzięki rozwojowi technik mikro-obróbki, pojawiło się znaczące zainteresowanie miniaturyzacją urządzeń analitycznych, w tym również komór do elektroforezy swobodnej. Kierunek ten wydaje się być niezwykle obiecujący z uwagi na swój wysoki potencjał sprzęgania z innymi urządzeniami w ramach systemów *lab-on-chip*.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] *Chromatografia i techniki elektromigracyjne. Słownik pięcioletni*, Z. Witkiewicz, E. Śliwka (Red.), WNT, Warszawa 2015.
- [2] Z.J. Xia, Z. Liu, F.Z. Kong, L.Y. Fan, H. Xiao, C.X. Cao, *Electrophoresis*, 2017, **38**, 3147.
- [3] B.H. Justesen, T. Laursen, G. Weber, A.T. Fuglsang, B.L. Møller, T. Günther Pomorski, *Anal. Chem.* 2013, **85**, 3497.
- [4] H. Xie, N.L. Rhodus, R.J. Griffin, J.V. Carlis, T.J. Griffin, *Mol. Cell. Proteomics*, 2005, **4**, 1826.
- [5] V. Kašička, Z. Prusik, J. Pospíšek, *J. Chromatogr. A*, 1992, **608**, 13.

- [6] V. Kašička, Z. Prusík, O. Smékal, J. Hlaváček, T. Barth, G. Weber, H. Wagner, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., 1994, **656**, 99.
- [7] N. Soulet, H. Roux-de Balmann, V. Sanchez, Electrophoresis, 1998, **19**, 1294.
- [8] J.F. Song, T. Liu, X. Shen, G. Wu, Q. Xia, Electrophoresis, 1998, **19**, 1097.
- [9] R.J. Meagher, J.I. Won, L.C. McCormick, S. Nedelcu, M.M. Bertrand, J.L. Bertram, G. Drouin, A.E. Barron, G.W. Slater, Electrophoresis, 2005, **26**, 331.
- [10] V. Chestkov, B. Baibakov, S.P. Radko, A. Chrambach, Electrophoresis, 1998, **19**, 1211.
- [11] G. Weber, D. Grimm, J. Bauer, Electrophoresis, 2000, **21**, 325.
- [12] M. Horká, J. Horký, H. Matousková, K. Slais, J. Chromatogr. A, 2009, **1216**, 1019.
- [13] D.J. Grab, P. Webster, J.D. Lonsdale-Eccles, Electrophoresis, 1998, **19**, 1162.
- [14] N. Bardy, A. Carrasco, J.P. Galaud, R. Pont-Lezica, H. Canut, Electrophoresis, 1998, **19**, 1145.
- [15] P. Hoffmann, H. Wagner, G. Weber, M. Lanz, J. Caslavská, W. Thormann, Anal. Chem., 1999, **71**, 1840.
- [16] M. Wind, P. Hoffmann, H. Wagner, W. Thormann, J. Chromatogr. A, 2000, **895**, 51.
- [17] E. Schneiderman, S.R. Gratz, A.M. Stalcup, J. Pharm. Biomed. Anal., 2002, **27**, 639.
- [18] Y. Liu, D. Zhang, S. Pang, Y. Liu, Y. Shang, J. Sep. Sci., 2015, **38**, 157.
- [19] S. Ho, K. Critchley, G.D. Lilly, B. Shim, N.A. Kotov, J. Mater. Chem., 2009, **19**, 1390.
- [20] E. Dziubakiewicz, B. Buszewski, *Podstawy teoretyczne technik elektromigracyjnych*, [w:] *Techniki elektromigracyjne. Teoria i praktyka*, B. Buszewski, E. Dziubakiewicz, M. Szumski (Red.), Wydawnictwo Malamut, Warszawa 2012, s. 21.
- [21] M.C. Roman, P.R. Brown, Anal. Chem., 1994, **66**, 86.
- [22] Z. Prusík, V. Kašička, P. Mudra, J. Štěpánek, O. Smékal, J. Hlaváček, Electrophoresis, 1990, **11**, 932.
- [23] V. Kašička, Z. Prusík, P. Sázelová, J. Jiráček, T. Barth, J. Chromatogr. A, 1998, **796**, 211.
- [24] J. Junkers, P. Schmitt-Kopplin, J.-C. Munch, A. Kettrup, Electrophoresis, 2002, **23**, 2872.
- [25] U. Keuth, A. Leinenbach, H.P. Beck, H. Wagner, Electrophoresis, 1998, **19**, 1091.
- [26] P. Glukhovskiy, G. Vigh, Anal. Chem., 1999, **71**, 3814.
- [27] I. Spanik, P. Lim, G. Vigh, J. Chromatogr. A, 2002, **960**, 241.
- [28] A. Strickler, Sep. Sci., 1967, **2**, 335.
- [29] C.F. Ivory, J. Chromatogr. A, 1980, **195**, 165.
- [30] P.H. Rhodes, R.S. Snyder, Electrophoresis, 1986, **7**, 113.
- [31] R.S. Turk, C.F. Ivory, Chem. Eng. Sci., 1984, **39**, 851.
- [32] S. Ostrach, J. Chromatogr. A, 1977, **140**, 187.
- [33] P.H. Rhodes, R.S. Snyder, G.O. Roberts, J. Colloid Interface Sci., 1989, **129**, 78.
- [34] M. Marsh, S. Schmid, H. Kern, E. Harms, P. Male, I. Mellman, A. Helenius, J. Cell Biol., 1987, **104**, 875.
- [35] E. Harms, H. Kern, J.A. Schneider, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1980, **77**, 6139.
- [36] H. Eubel, C.P. Lee, J. Kuo, E.H. Meyer, N.L. Taylor, A.H. Millar, Plant J., 2007, **52**, 583.
- [37] S.H. Kim, H. Miyatake, T. Ueno, T. Nagao, K. Miki, Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr., 2005, **61**, 799.
- [38] M. Poux, J. Bertrand, Electrophoresis, 1990, **11**, 907.
- [39] G. Weber, P. Boček, Electrophoresis, 1998, **19**, 1649.
- [40] Y. Zhan, T. Lemma, M. F. Musteata, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A, 2009, **1216**, 2928.
- [41] S.A. Oувry-Patat, M.P. Torres, H.H. Quek, C.A. Gelfand, P. O'Mullan, M. Nissum, G.K. Schroeder, J. Han, M. Elliott, D. Dryhurst, J. Ausio, R. Wolfenden, C.H. Borchers, Proteomics, 2008, **8**, 2798.
- [42] T. Hirokawa, Y. Kiso, J. Chromatogr. A, 1994, **658**, 343.
- [43] R. Kuhn, H. Wagner, Electrophoresis, 1989, **10**, 165.
- [44] S. Hoffstetter-Kuhn, R. Kuhn, H. Wagner, Electrophoresis, 1990, **11**, 304.
- [45] W. Thormann, M.A. Firestone, J.E. Sloan, T.D. Long, R.A. Mosher, Electrophoresis, 1990, **11**, 298.

- [46] G. Nowicka, T. Brüning, B. Grothaus, G. Kahl, G. Schmitz, *J. Lipid Res.*, 1990, **31**, 1173.
- [47] A. Böttcher, J. Schlosser, F. Kronenberg, H. Dieplinger, G. Knipping, K.J. Lackner, G. Schmitz, *J. Lipid Res.*, 2000, **41**, 905.
- [48] R. Hofmeister, A. Böttcher, G. Schmitz, *Electrophoresis*, 1998, **19**, 1185.
- [49] R. Kuhn, S. Hoffstetter-Kuhn, H. Wagner, *Electrophoresis*, 1990, **11**, 942.
- [50] J. Bauer, G. Weber, *J. Dispers. Sci. Technol.*, 1998, **19**, 937.
- [51] G. Weber, P. Boček, *Electrophoresis*, 1998, **19**, 3090.
- [52] J. Barrolier, W. Eugen, H. Gibian, *Z. Naturforsch. B.*, 1958, **13**, 754.
- [53] K. Hannig, *Fresen. Z. Anal. Chem.* 1961, **181**, 244.
- [54] H. Wagner, D. Neupert, K. Schlick, *J. Chromatogr. A*, 1975, **115**, 357.
- [55] P.J.A. Weber, G. Weber, C. Eckerskorn, U. Schneider, A. Posch, *Sep. Sci. Technol.*, 2005, **7**, 211.
- [56] K. Hannig, H. Wirth, R.K. Schindler, K. Spiegel, Hoppe. Seylers. *Z. Physiol. Chem.*, 1977, **358**, 753.
- [57] K. Hannig, *Electrophoresis*, 1982, **3**, 235.
- [58] G. Weber, P. Boček, *Electrophoresis*, 1996, **17**, 1906.
- [59] <https://ww3.tecan.com/platform/apps/datainterface/contentdata.asp?ID=3911&Conid=3752>
- [60] http://www.bd.com/contentmanager/b_article.asp?Item_ID=21921
- [61] <http://www.ffeservice.com>
- [62] M. Bier. U.S. Patent No 4, 204, **929**, 1980.
- [63] M. Bier. U.S. Patent No 4, 362, **612**, 1982.
- [64] M. Bier, G.E. Twitty, U.S. Patent No 4, 897, **169**, 1990.
- [65] J. Caslavská, P. Gebauer, W. Thormann, *Electrophoresis*, 1994, **15**, 1167.
- [66] M. Bier, *Electrophoresis*, 1998, **19**, 1057.
- [67] J. Margolis. U.S. Patent No 5, 039, **386**, 1991.
- [68] Z.S. Horvath, G.L. Corthals, C.W. Wrigley, J. Margolis, *Electrophoresis*, 1994, **15**, 968.
- [69] F.Z. Kong, Y. Yang, Y. Wang, G.Q. Li, S. Li, H. Xiao, L.Y. Fan, S.R. Liu, C.X. Cao, *J. Chromatogr. A*, 2015, **1422**, 318.
- [70] S. Chen, J.F. Palmer, W. Zhang, J. Shao, S. Li, L.Y. Fan, R. Sun, Y.C. Dong, C.X. Cao, *Electrophoresis*, 2009, **30**, 1998.
- [71] Y. C. Dong, J. Shao, X.Y. Yin, L.Y. Fan, C.X. Cao, *J. Sep. Sci.*, 2011, **34**, 1683.
- [72] J. Yan, C.G. Guo, X.P. Liu, F.Z. Kong, Q.Y. Shen, C.Z. Yang, J. Li, C.X. Cao, X.Q. Jin, *J. Chromatogr. A*, 2013, **1321**, 119.
- [73] C.Z. Yang, J. Yan, Q. Zhang, C.G. Guo, F.Z. Kong, C.X. Cao, L.Y. Fan, X.Q. Jin, *J. Sep. Sci.*, 2014, **37**, 1359.
- [74] Y. Yang, F.Z. Kong, J. Liu, J.M. Li, X.P. Liu, G.Q. Li, J.F. Wang, H. Xiao, L.Y. Fan, C.-X. Cao, S. Li, *Electrophoresis*, 2016, **37**, 1992.
- [75] M. Bier. U.S. Patent No 4, 588, **492**, 1986.
- [76] A.J.P. Martin, F. Hampson. U.S. Patent No 4, 243, **507**, 1981.
- [77] D.M. Faupel, P.G. Righetti. U.S. Patent No 4, 971, **670**, 1990.
- [78] P.G. Righetti, E. Wenisch, M. Faupel, *J. Chromatogr. A*, 1989, **475**, 293.
- [79] X. Zuo, D. W. Speicher, *Anal. Biochem.*, 2000, **284**, 266.
- [80] P. Lim, R. North, G. Vigh, *Electrophoresis*, 2007, **28**, 1851.
- [81] D. Ogle, A. Ho, T. Gibson, D. Rylatt, E. Shave, P. Lim, G. Vigh, *J. Chromatogr. A*, 2002, **979**, 155.
- [82] E. Shave, G. Vigh, *Electrophoresis*, 2007, **28**, 2291.
- [83] E. Shave, G. Vigh, *J. Chromatogr. A*, 2007, **1155**, 237.
- [84] P. Mattock, G.F. Aitchison, A.R. Thomson, *Sep. Purif. Rev.*, 1980, **9**, 1.
- [85] T. Melin, M. Poggel, *Chem. Eng. Sci.*, 2005, **60**, 6574.
- [86] C.F. Ivory, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 360.
- [87] D. Bottenus, C.F. Ivory, *Biotechnol. Prog.*, 2006, **22**, 842.

- [88] D.E. Raymond, A. Manz, H.M. Widmer, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 2858.
- [89] Y. Xu, C.X. Zhang, D. Janasek, A. Manz, *Lab Chip*, 2003, **3**, 224.
- [90] B.R. Fonslow, M.T. Bowser, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 5706.
- [91] C.X. Zhang, A. Manz, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 5759.
- [92] H. Lu, S. Gaudet, M.A. Schmidt, K.F. Jensen, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 5705.
- [93] K. Macounová, C.R. Cabrera, P. Yager, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 1627.
- [94] J.W. Albrecht, K.F. Jensen, *Electrophoresis*, 2006, **27**, 4960.
- [95] L.J. Cheng, H.C. Chang, *Lab Chip*, 2014, **14**, 979.
- [96] D. Kohlheyer, G.A.J. Besselink, S. Schlautmann, R.B.M. Schasfoort, *Lab Chip*, 2006, **6**, 374.
- [97] Y.A. Song, L. Wu, S.R. Tannenbaum, J.S. Wishnok, J. Han, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 11695.
- [98] P. Novo, M. Jender, M. Dell'Aica, R.P. Zahedi, D. Janasek, *Procedia Eng.*, 2016, **168**, 1382.
- [99] B.R. Fonslow, V.H. Barocas, M.T. Bowser, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 5369.
- [100] H. Kobayashi, K. Shimamura, T. Akaida, K. Sakano, N. Tajima, J. Funazaki, H. Suzuki, E. Shinohara, *J. Chromatogr. A*, 2003, **990**, 169.
- [101] E.J. Agostino, L.T. Cherney, V. Galievsky, S.N. Krylov, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2013, **52**, 7256.
- [102] D. Janasek, M. Schilling, A. Manz, J. Franzke, *Lab Chip*, 2006, **6**, 710.
- [103] D. Kohlheyer, J.C.T. Eijkel, S. Schlautmann, A. Van Den Berg, R.B.M. Schasfoort, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 4111.
- [104] D. Kohlheyer, J.C.T. Eijkel, S. Schlautmann, A. Van Den Berg, R.B.M. Schasfoort, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 8190.
- [105] J.K. Park, C.D.M. Campos, P. Neužil, L. Abelmann, R.M. Guijt, A. Manz, *Lab Chip*, 2015, **15**, 3495.
- [106] M. Becker, C. Budich, V. Deckert, D. Janasek, *Analyst*, 2009, **134**, 38.
- [107] D. Janasek, M. Schilling, J. Franzke, A. Manz, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 3815.
- [108] D. Kohlheyer, J.C.T. Eijkel, A. van den Berg, R.B.M. Schasfoort, *Electrophoresis*, 2008, **29**, 977.
- [109] P. Novo, D. Janasek, *Anal. Chim. Acta*, 2017, **991**, 9.
- [110] R.T. Turgeon, M.T. Bowser, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **394**, 187.

Praca wpłynęła do Redakcji 19 stycznia 2018