

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Дербина Анастасия Андреевна

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОЭМУЛЬСИЙ ТИПА
«ВОДА В МАСЛЕ» В МИКРОЭМУЛЬСИОННОЙ
ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.х.н., профессор Пирогов А.В.

Москва – 2015

Содержание

Список используемых сокращений	4
Введение	6
Глава 1. Обзор литературы.....	11
1.1. Микроэмульсии: строение и свойства.....	11
1.2. Мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЭКХ).....	18
1.3. Микроэмульсионная электрокинетическая хроматография (МЭЭКХ).....	23
1.4. Другие применения микроэмульсий	41
1.5. Методы он-лайн концентрирования в капиллярном электрофорезе	51
Глава 2. Аппаратура, материалы и техника эксперимента	61
2.1. Используемые реактивы	61
2.2. Аппаратура.....	62
2.3. Способ приготовления микроэмульсий	63
2.4. Пробоподготовка образцов продуктов питания.....	64
2.5. Пробоподготовка образцов лекарственных препаратов	65
2.6. Пробоподготовка образцов мочи.....	65
Глава 3. Характеристика В/М микроэмульсий как фоновых электролитов в капиллярном электрофорезе	66
3.1. Оценка применимости метода В/М МЭЭКХ.....	66
3.2. Влияние состава В/М микроэмульсий на селективность разделения неорганических анионов.....	69
3.3. Сравнение электрофоретических подвижностей анионов в методе В/М МЭЭКХ и других вариантах капиллярного электрофореза.....	78
Глава 4. Сочетание различных вариантов он-лайн концентрирования с В/М МЭЭКХ	84

4.1.	Стэкинг с усилением поля	84
4.2.	Электростэкинг	86
4.3.	Сви́пинг полярных соединений неионогенной природы	95
4.4.	Применение метода В/М МЭЭКХ в сочетании с электростэкингом при определении йодид-иона в продуктах питания (куриных яйцах и морской капусте).....	100
Глава 5. Применение В/М микроэмульсий в пробоподготовке		108
5.1.	Определение консервантов в образцах майонеза	108
5.2.	Определение Д-пантенола в образце мази.....	112
Глава 6. Использование В/М и М/В микроэмульсий в роли реакционных сред... ..		115
6.1.	Концентрирование с последующей дериватизацией в капилляре при определении антибиотиков методом М/В МЭЭКХ.....	115
6.2.	Концентрирование с последующей дериватизацией в капилляре при определении антибиотиков методом В/М МЭЭКХ.....	129
6.3.	Он-лайн дериватизация гексаметилендиамина в среде В/М микроэмульсий ...	134
Выводы		138
Список литературы.....		140

Список используемых сокращений

Сокращение	Расшифровка сокращения (аббревиатуры)
ААС	– атомно-абсорбционная спектрометрия
АМО	– амоксициллин
АМП	– ампициллин
В/М	– «вода в масле»
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ГЛБ	– гидрофильно-липофильный баланс
ГСН	– гептилсульфонат натрия
ГМДА	– гексаметилендиамин
ДДКВ	– додекоксикарбонилвалин
ДДСН	– додецилсульфат натрия
ДЗН	– докузат натрия (бис(2-этилгексил)сульфосукцинат натрия)
ИТФ	– изотахофорез
КЗЭ	– капиллярный зонный электрофорез
ККМ	– критическая концентрация мицеллообразования
КЭ	– капиллярный электрофорез
М/В	– «масло в воде»
МС	– масс-спектрометрический
МС-ИСП	– масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой
МЭ	– микроэмульсия
МЭЖХ	– микроэмульсионная жидкостная хроматография
МЭКХ	– мицеллярная электрокинетическая хроматография
МЭЭКХ	– микроэмульсионная электрокинетическая хроматография
НДА	– 2,3-нафталиндиальдегид
НСН	– нонилсульфонат натрия
ОСН	– октилсульфонат натрия
ПАВ	– поверхностно-активное вещество

ПГМГ	–	полигексаметиленгуанидин гидрохлорид
Со-ПАВ	–	сопутствующее поверхностно-активное вещество
ТСХ	–	тонкослойная хроматография
ФМОК	–	флуоренилметилоксикарбонил хлорид
ЦТАБ	–	цетилтриметиламмония бромид
ЦТАХ	–	цетилтриметиламмония хлорид
ЭГСН	–	(2-этилгексил)сульфат натрия
ЭОП	–	электроосмотический поток

Введение

Актуальность темы

Микроэмульсионная электрокинетическая хроматография (МЭЭКХ) представляет собой разновидность капиллярного электрофореза с использованием микроэмульсии в качестве фонового электролита. Этот метод, предложенный в 1991 году, пригоден для определения веществ, имеющих различие в электрофоретической подвижности, и позволяет с высокой эффективностью разделять сложные смеси заряженных и нейтральных веществ. Подавляющее число работ, посвященных методу МЭЭКХ, основано на использовании в качестве фоновых электролитов микроэмульсий типа «масло в воде» (М/В).

В 2001 году впервые было предложено использовать обратные микроэмульсии типа «вода в масле» (В/М) в качестве фоновых электролитов в капиллярном электрофорезе. Этой разновидности МЭЭКХ посвящено лишь несколько работ, должного развития (на наш взгляд, незаслуженно) он так и не получил. Уникальное дифильное строение В/М микроэмульсий открывает возможность использования такого рода систем в пробоподготовке, а также в роли реакционных сред. Представляется интересным изучение возможностей сочетания В/М МЭЭКХ с различными вариантами он-лайн концентрирования, установление зависимостей поведения аналитов в среде микроэмульсий, а также оценка областей применимости этого метода на примере анализа объектов различной природы.

Цель работы заключалась в разработке подхода к использованию микроэмульсий типа «вода в масле» как экстрагентов при пробоподготовке, в роли реакционных сред для проведения реакций дериватизации в капилляре, а также в качестве фоновых электролитов в МЭЭКХ в сочетании с различными вариантами он-лайн концентрирования.

Достижение поставленной цели включало в себя решение следующих конкретных задач:

1. Оценка применимости метода В/М МЭЭКХ на примере определения веществ различной полярности. Исследование влияния состава микроэмульсии «вода в

масле» на скорость миграции и селективность разделения модельной смеси неорганических анионов методом МЭЭКХ.

2. Расчет и сравнение электрофоретических подвижностей неорганических анионов, полученных методом В/М МЭЭКХ и другими вариантами капиллярного электрофореза.
3. Оценка возможности сочетания метода В/М МЭЭКХ с различными вариантами он-лайн концентрирования в капилляре (стэкинг с усилением поля, электростэкинг, свипинг полярных соединений).
4. Выявление преимуществ применения микроэмульсий «вода в масле» в качестве экстрагентов в пробоподготовке при анализе объектов со сложной матрицей (продукты питания, лекарственные препараты).
5. Использование В/М микроэмульсий в роли реакционных сред для проведения он-лайн дериватизации в капилляре.

Научная новизна работы

Показано, что метод МЭЭКХ с применением микроэмульсий типа «вода в масле» непригоден для разделения смесей гидрофобных веществ неионогенной природы в отличие от метода М/В МЭЭКХ. Проведено сравнение электрофоретических подвижностей неорганических анионов в методе В/М МЭЭКХ и других вариантах капиллярного электрофореза. Установлено, что скорость миграции неорганических анионов в В/М МЭЭКХ на порядок меньше, чем для методов КЗЭ и М/В МЭЭКХ.

Продемонстрирована возможность использования различных вариантов он-лайн концентрирования в сочетании с методом В/М МЭЭКХ, позволяющих снизить пределы обнаружения исследуемых аналитов на три порядка. Предложено применять свипинг в этом варианте капиллярного электрофореза для концентрирования полярных веществ неионогенной природы.

На примере анализа продуктов питания и лекарственного препарата продемонстрированы преимущества применения В/М микроэмульсий в качестве экстрагентов в пробоподготовке. Растворение образцов в обратной микроэмульсии

позволило значительно упростить эту стадию и сократить ее время до 2 мин при количественном извлечении компонентов пробы.

Предложено использовать В/М микроэмульсии в роли реакционных сред для дериватизации аналитов. Установлено, что реакция значительно ускоряется в микроэмульсионной среде, при этом не требуется дополнительного нагревания. Предложен способ проведения дериватизации в капилляре в режиме он-лайн.

Показана возможность дериватизации антибиотиков в режиме он-лайн в среде М/В и В/М микроэмульсий. Продемонстрирована возможность сочетания концентрирования антибиотиков в капилляре (стэкинг с большим объемом пробы и переключением полярности или электростэкинг) с последующей он-лайн дериватизацией. Сочетание рассмотренных подходов позволяет снизить пределы обнаружения антибиотиков в 10^4 раз и достичь пределов обнаружения порядка 0.6 мкг/л.

Практическая значимость работы

1. Предложен способ чувствительного определения йодид-иона в образцах продуктов питания (куриных яйцах и морской капусте) методом В/М МЭЭКХ в сочетании с предварительным электростэкингом. Пределы обнаружения йодида составили 7 мкг/кг куриного яйца и 9 мкг/кг свежей морской капусты, соответственно.
2. Разработан простой и экспрессный способ определения консервантов (сорбиновой и бензойной кислот) в майонезе методом В/М МЭЭКХ, предусматривающий применение В/М микроэмульсий в роли экстрагентов в пробоподготовке. Стадия пробоподготовки предусматривает только лишь растворение образца майонеза в небольшом объеме микроэмульсии в течение 2 мин.
3. Предложен чувствительный способ определения антибиотиков пенициллинового ряда (ампициллина и амоксициллина) методом МЭЭКХ с использованием М/В или В/М микроэмульсий, предусматривающий сочетание внутрикапиллярного концентрирования с последующей он-лайн дериватизацией аналитов в капилляре. Разработанный способ позволяет

снизить пределы обнаружения антибиотиков до $C_{\text{мин}} = 0.6$ мкг/л. Применимость разработанного подхода продемонстрирована на примере определения ампициллина и амоксициллина в биологической жидкости.

Положения, выносимые на защиту:

1. Предположения о механизме разделения аналитов при использовании микроэмульсий «вода в масле» в качестве фоновых электролитов.
2. Результаты влияния состава В/М микроэмульсии на селективность и эффективность разделения неорганических анионов.
3. Результаты сравнения скорости миграции определяемых веществ в В/М МЭЭКХ и других вариантах капиллярного электрофореза.
4. Варианты сочетания он-лайн концентрирования с методом В/М МЭЭКХ и примеры практического применения предложенных подходов для анализа реальных объектов.
5. Совокупность данных о достоинствах использования В/М микроэмульсий в пробоподготовке в качестве экстрагентов и в роли реакционных сред.

Апробация работы. Основное содержание работы изложено в 10 публикациях. Результаты исследований докладывались на II Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, 2013); 19th International Symposium on Separation Sciences «New Achievements in Chromatography» (Пореч, Хорватия, 2013); 40th International Symposium on the High Performance Liquid Phase Separations and the Related Techniques (Хобарт, Австралия, 2013); 30th International Symposium on Chromatography «Communicating separation science for the future» (Зальцбург, Австрия, 2014); 18th edition of Euroanalysis, the European Conference on Analytical Chemistry (Бордо, Франция, 2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи и 6 тезисов докладов.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, 4 глав обсуждения результатов, общих

выводов и списка цитируемой литературы. Материал изложен на 155 страницах машинописного текста, содержит 62 рисунка и 17 таблиц. В списке цитируемой литературы 162 публикации.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Микроэмульсии: строение и свойства

Микроэмульсии (МЭ) представляют собой гомогенные, оптически прозрачные и термодинамически устойчивые дисперсии воды в масле или масла в воде, стабилизированные за счет введения поверхностно-активного вещества (ПАВ), часто в сочетании с сопутствующим ПАВ (со-ПАВ) [1-3]. Под маслом в данном случае понимают любое органическое вещество, ограниченно растворимое в воде. Благодаря высокому межфазному поверхностному натяжению эти фазы не смешиваются друг с другом, введение поверхностно-активного вещества способствует понижению поверхностного натяжения между маслом и водой, что делает возможным формирование стабильных капель, покрытых ПАВ, так называемое мицеллообразование. Стабильность микрокапель обусловлена строением молекулы ПАВ: она состоит из гидрофильной, часто заряженной, главной группы и длинного гидрофобного углеродного хвоста [4]. Такое асимметричное (дифильное) строение приводит к тому, что ПАВ оказываются родственными обеим контактирующим фазам: хорошо гидратируемая полярная группа обуславливает их родственность по отношению к воде, а углеводородная цепь – к неполярной фазе (маслу) [5]. Одной из основных характеристик мицеллообразования является критическая концентрация мицелообразования (ККМ) – это концентрация молекул поверхностно-активного вещества, при которой начинается образование мицелл. Количество мицелл в микроэмульсии будет увеличиваться до тех пор, пока число свободных молекул ПАВ в растворе будет оставаться постоянным.

Микроэмульсии могут образовываться в смесях индивидуального ПАВ, масла и воды, но во многих случаях для их образования требуется введение второго немицеллообразующего поверхностно-активного вещества, так называемого со-ПАВ, например, спирта с гидрофобным радикалом среднего размера или простого эфира [6]. Действие со-ПАВ на микроэмульсии подобно действию ПАВ – углеродный хвост молекулы находится в масле, в то время как гидроксильная группа спиртов остается в воде.

Микроэмульсии значительно отличаются по ряду свойств от макроэмульсий (эмульсий). В то время как эмульсии разрушаются с течением времени, микроэмульсии обладают термодинамической стабильностью, что обусловлено устойчивостью капель к коалесценции, и имеют потенциально бесконечное время жизни. Другие различия этих систем представлены в табл. 1.

Таблица 1. Сравнительные характеристики макро- и микроэмульсий [7].

Макроэмульсии	Микроэмульсии
Неустойчивы, расслаиваются с течением времени	Термодинамически стабильные системы
Капли относительно большие (1-20 мкм)	Небольшие агрегаты (10-100 нм)
Внутренняя поверхность небольшая ($15 \text{ м}^2/\text{г}$)	Внутренняя поверхность очень большая ($200 \text{ м}^2/\text{г}$)
Высокое поверхностное натяжение (1-10 мН/м)	Очень низкое поверхностное натяжение ($\sim 10^{-3} \text{ мН/м}$)
Относительно статические системы	Высокодинамичные системы

1.1.1. Структура и классификация микроэмульсий

Фазовое поведение трехкомпонентных микроэмульсионных систем, состоящих из масла, воды и ПАВ может быть изучено с помощью тройной фазовой диаграммы (при фиксированном давлении и температуре); каждый угол диаграммы соответствует 100%-ной концентрации определенного компонента (рис. 1).

На тройной диаграмме могут существовать области составов, которым отвечают различные по строению фазы: мицеллярные системы с мицеллами различных размеров и формы, жидкокристаллические фазы, образованные упорядоченными прямыми или обратными сферическими, цилиндрическими или плоскими (ламеллярными) мицеллами [8]. Особенно характерно образование таких разнообразных по структуре фаз для неионогенных ПАВ с крупными полярными и неполярными участками молекул. Для неионогенных ПАВ образование таких структур происходит обычно при введении четвертого компонента – со-ПАВ. В этих случаях обычно рассматривают псевдотрехкомпонентные диаграммы состояния, на которых двум углам отвечают вода и углеводород (масло), а третьему – смесь ионогенного и неионогенного ПАВ определенного состава.

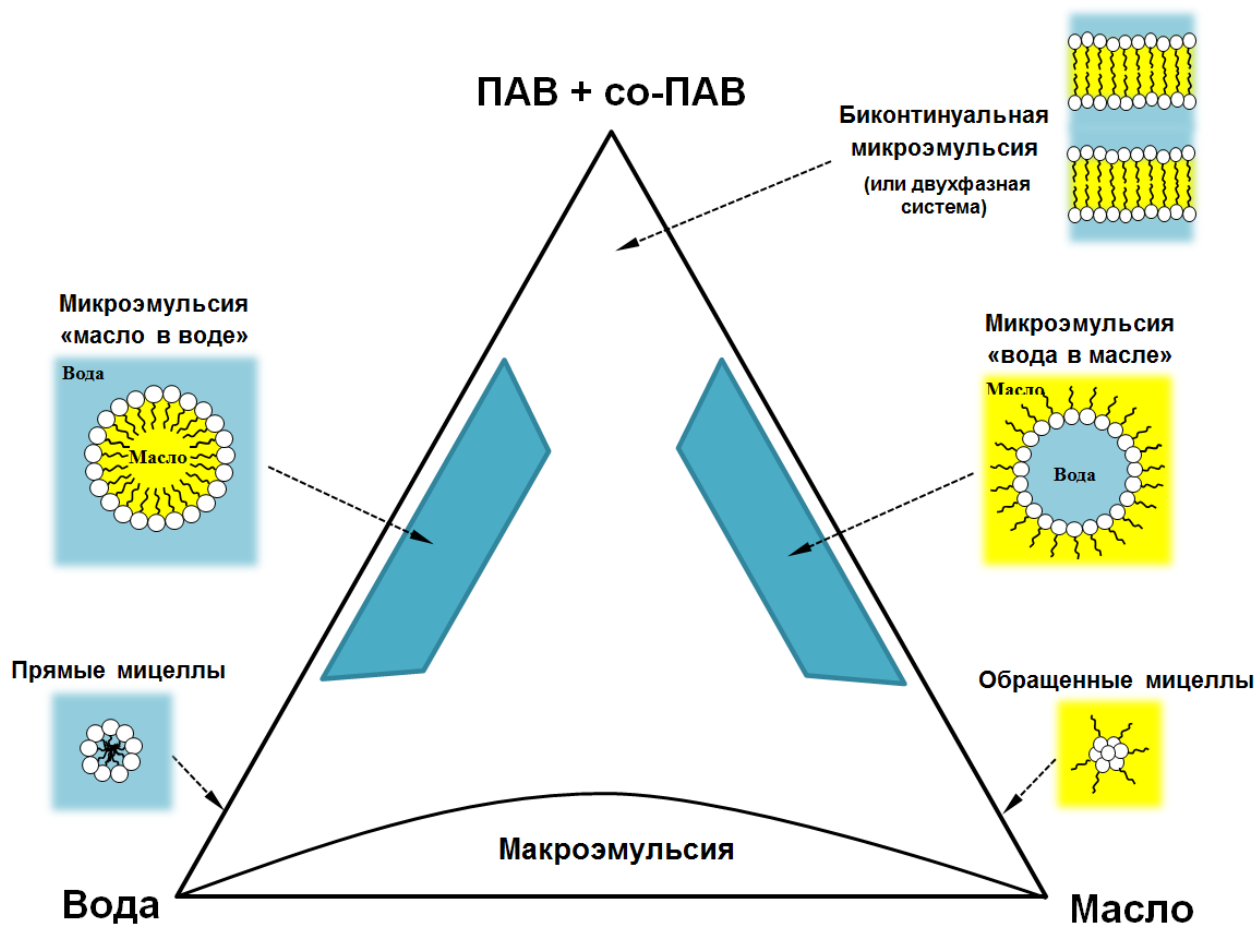


Рис. 1. Вид диаграммы фазового состояния трехкомпонентной системы вода – ПАВ – углеводород.

В зависимости от того, какая жидкость образует макрофазу, выделяют три основных типа микроэмульсий (рис. 2):

- 1) Прямая микроэмульсия типа **«масло в воде»** (М/В) представляет собой ультрамикрокапли масла, взвешенные в водной среде, при этом межфазная поверхность сильно искривлена в сторону масла;
- 2) Обратная микроэмульсия типа **«вода в масле»** (В/М) – ультрамикрокапли воды, взвешенные в неполярной органической фазе, межфазная поверхность сильно искривлена в сторону водной фазы;
- 3) **Биконтинуальная** микроэмульсия представляет собой динамически переплетенные сетки масла и воды, стабилизированные монослоем ПАВ на границах раздела фаз, и характеризуется высокими коэффициентами диффузии

обоих растворителей, при этом межфазная поверхность имеет нулевую среднюю кривизну (рис. 2). Диффузия молекул ПАВ в биконтинуальных микроэмульсиях происходит с коэффициентами диффузии порядка 10^{-10} м²/с, т.е. гораздо быстрее, чем в микроэмульсиях капельного типа [9, 10].

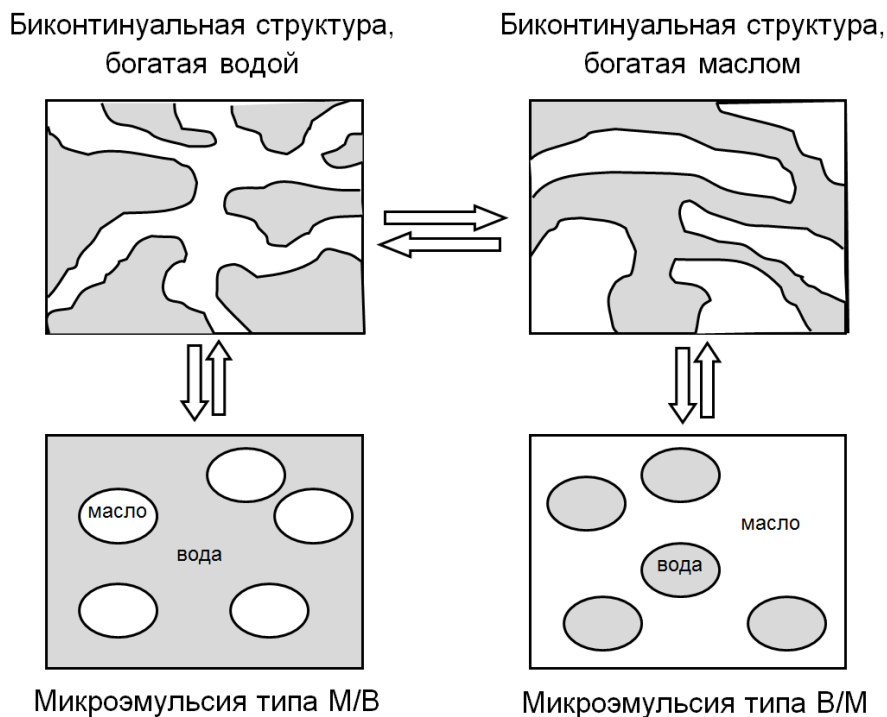


Рис. 2. Микроэмульсии типа «масло в воде», «вода в масле» и биконтинуальная микроэмульсия [11].

Повышение температуры и добавление электролитов в состав микроэмульсии вызывает дегидратацию молекул ПАВ; это увеличивает сродство ПАВ к неполярной фазе и снижает их сродство к воде. Поэтому при увеличении температуры (или концентрации электролита), как правило, наблюдается уменьшение области расслоения, богатой углеводородом, и расширяется область расслоения систем, обогащенных водой [12].

Изменение состояния ПАВ при упомянутых воздействиях обнаруживается по изменению характера температурной зависимости поверхностного натяжения σ на границах раздела равновесных фаз. Это наиболее отчетливо видно для систем на основе неионогенного ПАВ (рис. 3).

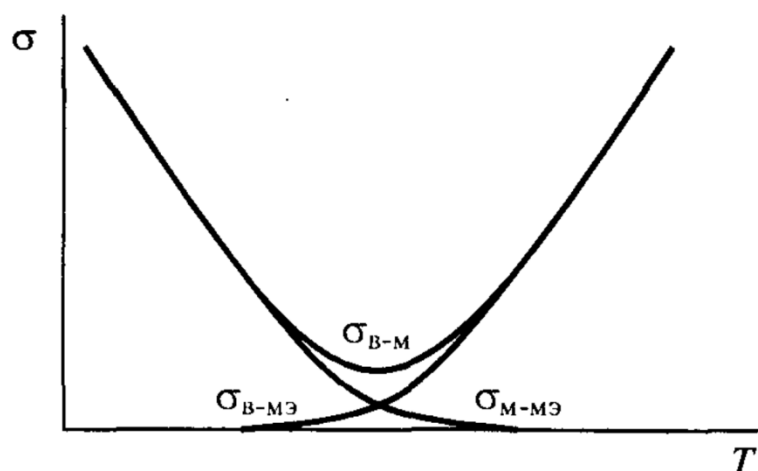


Рис. 3. Схема зависимости межфазных натяжений от температуры в микроэмульсионных системах [8].

Дегидратация молекул неионогенного ПАВ при повышении температуры приводит к тому, что поверхностное натяжение $\sigma_{\text{в/мэ}}$ (область расслоения, обогащенная водой) растет с температурой, а $\sigma_{\text{м/мэ}}$ – снижается. При исчезающе малых значениях σ граница раздела исчезает, происходит «гомогенизация» системы за счет поглощения микроэмульсией соответственно воды или масла.

Величина $\sigma_{\text{в/м}}$ с повышением температуры проходит через минимум. Это состояние отвечает равенству значений сольубилизации неполярной фазы в водной и воды в неполярной фазе. Важно отметить, что в точке минимума величина $\sigma_{\text{в/м}}$ имеет ультранизкое значение порядка 0.01...0.001 мН/м.

1.1.2. Классификация и свойства поверхностно-активных веществ

Основным компонентом любой мицеллярной системы является поверхностно-активное вещество, обладающие ионогенной или большой по размеру неионогенной полярной группой и длинной углеводородной цепью. Наиболее распространенная классификация поверхностно-активных веществ основана на заряде их полярной группы. По химической природе органические ПАВ с дифильным строением делят на анионные, катионные, амфолитные и неионогенные [13-15]. Доминирующее положение среди ПАВ, производимых в мире, занимают наиболее дешевые и

достаточно универсальные анионные ПАВ, на долю которых приходится не менее 60% мирового производства; до 30% составляют неионогенные ПАВ, ~ 10% – катионные и лишь доли процента – синтетические амфолитные ПАВ [16].

Анионные ПАВ – это органические соединения, которые, диссоциируя в воде, образуют анион с длинным углеводородным радикалом. К числу анионных ПАВ относятся в основном следующие соединения [8, 17]:

- Соли карбоновых кислот с общей формулой RCOO^-Me^+ , где R – органический радикал $\text{C}_8 - \text{C}_{20}$; $\text{Me}^+ - \text{Na}^+, \text{K}^+$ или NH_4^+ ;
- Алкиларилсульфонаты (чаще всего алкилбензолсульфонаты) – соли ароматических сульфокислот с общей формулой $\text{RArSO}_3^-\text{Me}^+$;
- Алкилсульфаты – соли эфиров серной кислоты; общая формула $\text{ROSO}_3^-\text{Me}^+$ (R обычно $\text{C}_{10} - \text{C}_{18}$);
- Алкилсульфонаты – $\text{RSO}_3^-\text{Me}^+$ (R обычно $\text{C}_{10} - \text{C}_{20}$);
- ПАВ, содержащие другие типы анионных групп: соли неполных эфиров фосфорной кислоты, различные соли тиосульфокислот, ксантогенаты, тиофосфаты и др.

Катионные ПАВ диссоциируют в воде с образованием органического катиона. К числу катионных ПАВ относятся [8, 18]:

- Алифатические и ароматические амины (первичные, вторичные и третичные);
- Соли четвертичных аммониевых оснований $[\text{RN}(\text{R}')_3]^+\text{X}^-$ (где R – $\text{C}_{12} - \text{C}_{18}$; $\text{R}' - \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5$; $\text{X}^- - \text{Cl}^-, \text{Br}^-$);
- Соли пиридиновых оснований

Амфолитные (цвиттер-ионные) ПАВ – соединения, содержащие в составе молекул оба типа групп: кислотную (чаще всего карбоксильную) и основную (обычно аминогруппу разных степеней замещения). В зависимости от pH среды они проявляют свойства как катионных ПАВ (при $\text{pH} < 4$), так и анионных (при $\text{pH} 9-12$). При $\text{pH} 4-9$

они могут вести себя как неионогенные соединения. К амфолитным ПАВ относятся [8, 19]:

- Многие природные вещества, включая все аминокислоты и белки;
- Синтетические алкиламиноокислоты – цетиламиноуксусная кислота $C_{16}H_{33}NH-CH_2COOH$ и др.;
- Цвиттер-ионные ПАВ, например, бетаины $RN^+(CH_3)_2CH_2COO^-$ с радикалом, содержащим 10-12 атомов углерода.

Неионогенные ПАВ – растворимые как в кислой, так и в щелочной среде соединения, не диссоциирующие в воде [20, 21].

- Оксипропилированные первичные и вторичные жирные спирты:
 $RO(CH_2CH_2O)_nH, \begin{matrix} R_1 \backslash \\ R_2 / \end{matrix} CHO(CH_2)CH_2O)_nH;$
- Полиэтиленгликолевые эфиры жирных кислот $RCOO(CH_2CH_2O)_nH;$
- Оксипропилированные алкилфенолы $RC_6H_4O(CH_2CH_2O)_nH,$ R обычно $C_8 - C_9;$ n – среднее число оксипропильных групп;
- Плуроники – блоксополимеры окиси этилена и окиси пропилена с молекулярной массой 2000 – 20000, растворимость и поверхностная активность которых определяется соотношением длины полиоксипропиленовой (носитель гидрофобности) и полиоксипропиленовой (носитель гидрофильности) цепей;
- Глицериды, глюкозиды, сахараиды, моно- и диэфиры длинноцепочечных жирных кислот и многоатомных спиртов.

Эффективность любого поверхностно-активного вещества характеризуется специальным числом - гидрофильно-липофильным балансом (ГЛБ) [22]. Под ГЛБ понимают соотношение двух противоположных групп молекулы ПАВ – гидрофильной и гидрофобной (липофильной). В настоящее время не существует теории, позволяющей определить значение ГЛБ исходя из строения молекулы или из физико-химических свойств вещества. В связи с этим пользуются предложенной Гриффином полуэмпирической системой, позволяющей количественно оценить и

выразить в виде условных групповых чисел степень взаимодействия с водой отдельных групп, из которых состоит молекула поверхностно-активного вещества. Чем больше в молекуле ПАВ превалирует гидрофильная часть над гидрофобной, иначе говоря, чем больше баланс сдвинут в сторону гидрофильности, тем выше число ГЛБ.

Числа ГЛБ для всех известных ПАВ составляют шкалу от 1 до 40 («шкала Гриффина»). Число 10 является приближенной границей между липофильными и гидрофильными ПАВ. Маслорастворимые эмульгаторы, дающие эмульсии типа «вода в масле», характеризуются числами ГЛБ ниже 10. Чем выше число ГЛБ, тем больше склонность к образованию эмульсии типа «масло в воде».

Шкала ГЛБ, которая служит в основном для выбора эмульгатора, имеет значение и для определения другого назначения ПАВ. Например, ПАВ при значении ГЛБ = 1-3 должны быть пеногасителями, при 3-6 – эмульгаторами типа «вода в масле», при 7-8 – моющими средствами, при 8-13 – эмульгаторами типа «масло в воде», при 13-15 – детергентами, выше 15 – солубилизаторами [23, 24].

1.2. Мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЭКХ)

Метод мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) был впервые описан японским ученым Терабе в 1984 г. на примере анализа смеси органических веществ [25]. Этот метод получил наиболее широкое распространение среди других вариантов капиллярного электрофореза (КЭ), в первую очередь за счет способности разделять как ионогенные, так и незаряженные компоненты пробы, что оказывается невозможным в стандартном варианте капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ). МЭКХ основан на добавлении в состав фонового электролита мицеллярной псевдостационарной фазы, представляющей собой молекулы ПАВ в концентрации, превышающей ККМ. В этом случае в растворе ведущего электролита находятся преимущественно мицеллы и небольшая доля мономерной формы ПАВ.

В МЭКХ чаще всего используют анионные поверхностно-активные вещества, например додецилсульфат натрия (ДДСН). При формировании прямых мицелл мономерные фрагменты агрегируются неполярными концами внутрь, а внешняя

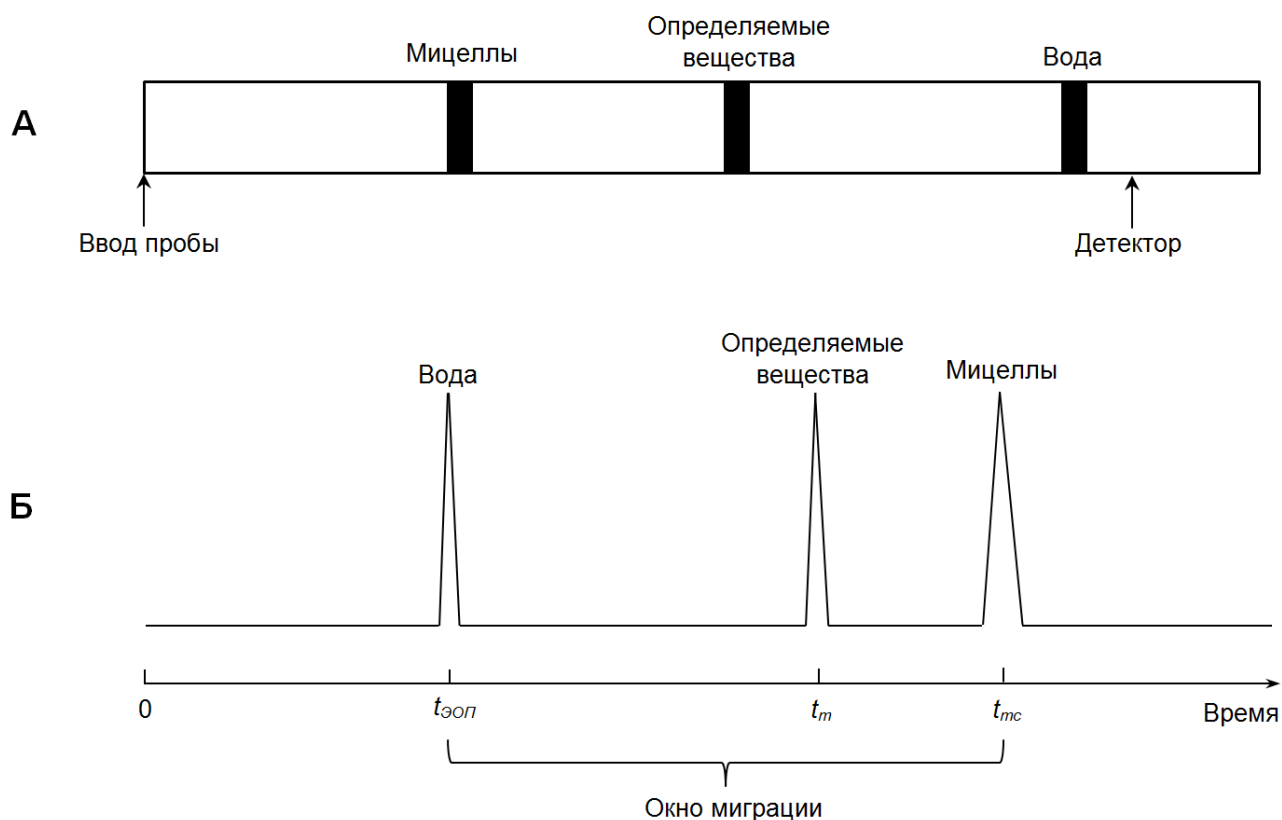


Рис. 5. Схема поведения нейтральных определяемых веществ в МЭКХ (А) и соответствующая электрофореграмма (Б). $t_{ЭОП}$, t_m , t_{mc} – времена миграции воды (или маркера электроосмотического потока), аналитов и мицелл, соответственно [27].

Размер окна миграции может быть увеличен путем добавления органического модификатора в фоновый электролит, использования смеси ПАВ различной природы или путем модификации поверхности капилляра с целью уменьшения ЭОП.

В качестве маркера ЭОП обычно используют полярные нейтральные молекулы – метанол, ацетон, формамид; в качестве маркера миграции мицелл – водонерастворимые соединения, например, красители судан III или судан IV. Факторы удерживания пропорциональны коэффициентам гидрофобности $\log P$ аналитов неионогенной природы – чем выше показатель гидрофобности, тем меньше скорость миграции.

Область применения метода МЭКХ не ограничивается только разделением нейтральных веществ, им можно разделять и заряженные аналиты [28]. В этом случае реализуется два механизма разделения веществ – электрофоретический и

распределительный. Подвижность заряженных компонентов пробы складывается из их собственной подвижности в капилляре под действием приложенного электрического поля и степени их взаимодействия с мицеллами. Распределение веществ между водной и мицеллярной фазами может приводить к росту селективности и воздействовать тем самым на разделение ионов с очень схожими электрофоретическими подвижностями. В этих случаях разрешение, достигаемое методом МЭКХ, как правило, выше, чем в варианте КЗЭ.

Для образования мицеллярной фазы необходимо использовать поверхностно-активные вещества ионогенной природы, к ним предъявляют ряд требований:

- растворимость в соответствующем буферном растворе должна быть достаточно высокой ($> \text{ККМ}$), чтобы могли образоваться мицеллы;
- мицеллярный раствор должен быть гомогенным и УФ-прозрачным;
- мицеллярный раствор должен обладать невысокой вязкостью.

Наиболее распространены анионные ПАВ, в основном ДДСН и его гомологи [29]. В качестве катионных детергентов, как правило, находят применение аммонийные соли с гидрофобными алкильными радикалами, одними из наиболее широко используемых является цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ) или цетилтриметиламмония хлорид (ЦТАХ) [30, 31]. В этом варианте МЭКХ происходит модификация кварцевого капилляра за счет сорбции молекул катионных ПАВ, определение веществ проводят в режиме с обращением полярности. ЭОП направлен к аноду, в то время как положительно заряженные мицеллы мигрируют в направлении катода (рис. 6).

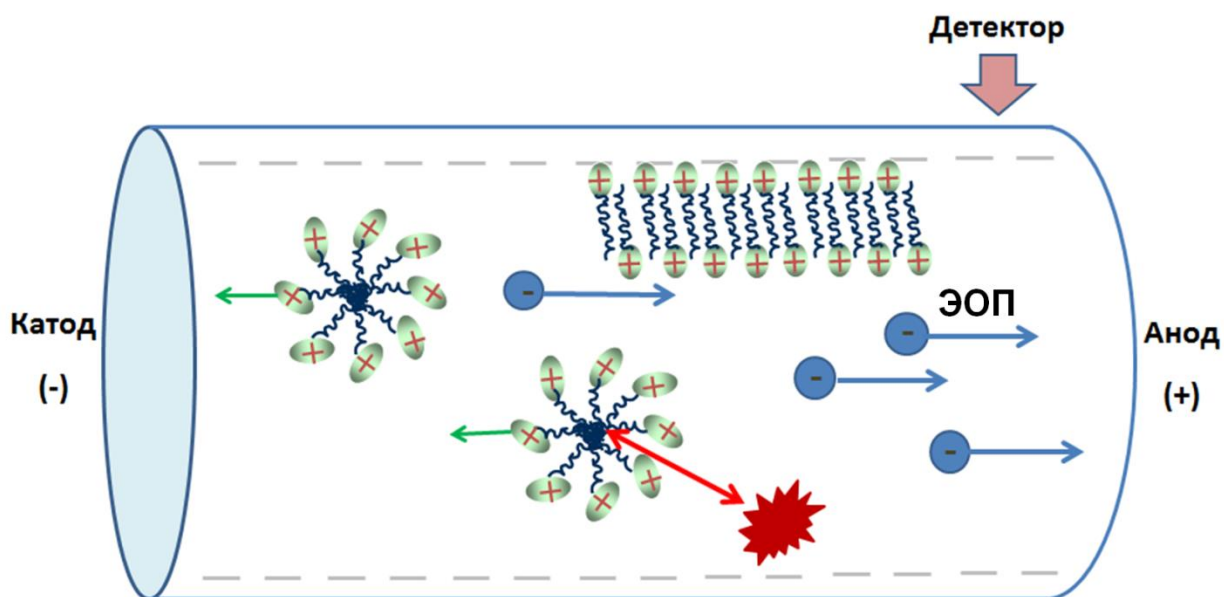


Рис. 6. Схематическое представление метода МЭКХ с использованием анионных ПАВ.

В последнее время в качестве ПАВ используют также ионные жидкости [32, 33], полимеры [34], структурированные молекулы, представляющие собой две молекулы ПАВ, соединенные спейсерной группой или полимером с низкой молекулярной массой – «Gemini» [35]. Использование поверхностно-активных веществ последней группы в методе МЭКХ показало ряд преимуществ, таких как содействие снижению пенообразования, низкие значения поверхностного натяжения и ККМ, что способствует уменьшению выделения Джоулева тепла во время анализа.

В отличие от классического варианта КЗЭ, метод МЭКХ пригоден для разделения сложных смесей органических веществ. Состав мицеллярного буферного раствора можно варьировать в широких пределах для достижения наилучшего разрешения пиков компонентов пробы (варьирование типа и концентрации ПАВ, буферного раствора, pH, добавки органических модификаторов). В настоящее время метод МЭКХ нашел широкое применение при анализе объектов различной природы – лекарственных препаратов, продуктов питания, объектов окружающей среды [36, 37].

1.3. Микроэмульсионная электрокинетическая хроматография (МЭЭКХ)

Микроэмульсионная электрокинетическая хроматография (МЭЭКХ) – разновидность капиллярного электрофореза с использованием микроэмульсии в качестве фонового электролита. Этот метод был впервые предложен японским ученым Ватараи в 1991 г. для разделения смеси ароматических соединений [38]. МЭЭКХ пригоден для определения веществ, имеющих различие в электрофоретической подвижности, и позволяет с высокой эффективностью разделять сложные смеси заряженных и нейтральных веществ, охватывающих широкий диапазон растворимости в воде [39]. Подавляющее число работ посвящено использованию микроэмульсий типа «масло в воде» в капиллярном электрофорезе; вариант МЭЭКХ с использованием микроэмульсий типа «вода в масле» остается на данный момент практически не изученным.

1.3.1. Микроэмульсионная электрокинетическая хроматография с использованием микроэмульсий типа «масло в воде» (М/В МЭЭКХ)

Использованию микроэмульсий типа «масло в воде» в МЭЭКХ (М/В МЭЭКХ) посвящено огромное число работ. Этот метод является расширением варианта мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ), где в водный буферный раствор помимо ПАВ добавляют также органический растворитель и со-ПАВ для образования микроэмульсионных капель. Эти методы часто сравнивают друг с другом, поскольку механизмы разделения в обоих вариантах схожи [40]. В обоих случаях молекулы аналита взаимодействуют с поверхностью мицелл, однако при использовании микроэмульсий также возможно проникновение веществ внутрь микроэмульсионной капли.

В электрокинетической хроматографии после введения пробы в капилляр, заполненный подходящим буферным раствором, и подачи напряжения к концам капилляра компоненты пробы анализируемого раствора перемещаются по капилляру с разной скоростью, зависящей от природы веществ, и в разное время достигают зоны

детектирования. Разделение определяемых веществ в варианте М/В МЭЭКХ основано на комбинации электрофоретического механизма и распределения компонентов смеси между водной фазой и микроэмульсионными каплями масла (рис. 7).

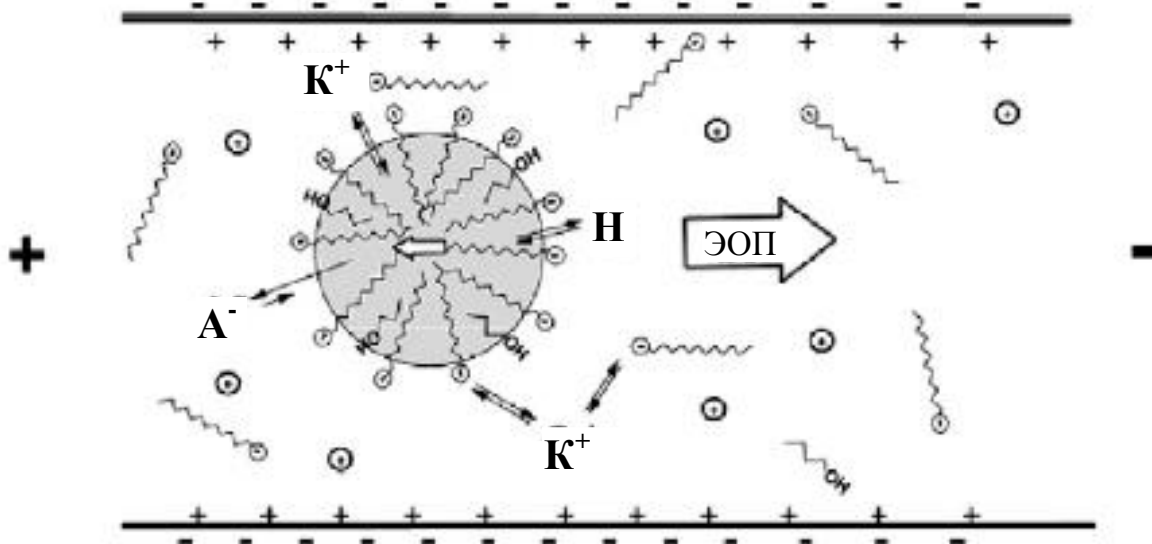


Рис. 7. Процессы, определяющие поведение катионных (K^+), анионных (A^-) и нейтральных (H) аналитов в режиме МЭЭКХ с использованием микроэмульсии типа «масло в воде» на основе анионного ПАВ и низкомолекулярного спирта в качестве со-ПАВ [41].

Нейтральные сильно гидрофильные вещества находятся в водной фазе микроэмульсий и быстро мигрируют вместе с электроосмотическим потоком к детектору. Разделение заряженных аналитов зависит от их заряда, массы, а также коэффициента распределения вещества между водой и микроэмульсионными каплями масла. В случае микроэмульсии на основе анионного ПАВ для положительно заряженных веществ характерны ион-парные взаимодействия с поверхностью отрицательно заряженной капли. В то же время анионные компоненты будут отталкиваться от микроэмульсионных капель.

Метод МЭЭКХ характеризуется более высокой эффективностью по сравнению с МЭКХ, что, вероятно, обусловлено улучшением массообмена между каплями микроэмульсии и водной фазой посредством со-ПАВ. Проникновение аналита через поверхность микроэмульсионной капли легче по сравнению с мицеллой, что

обусловлено «жесткостью» мицеллярной структуры. Более высокая солюбилизирующая способность и, как следствие, увеличенное окно миграции делает метод МЭЭКХ применимым для определения более широкого круга веществ. На примере разделения смеси производных хинолина показано преимущество использования микроэмульсий по сравнению с мицеллярным фоновым электролитом – в случае МЭЭКХ все пики определяемых компонентов полностью разрешились [42] (рис. 8).

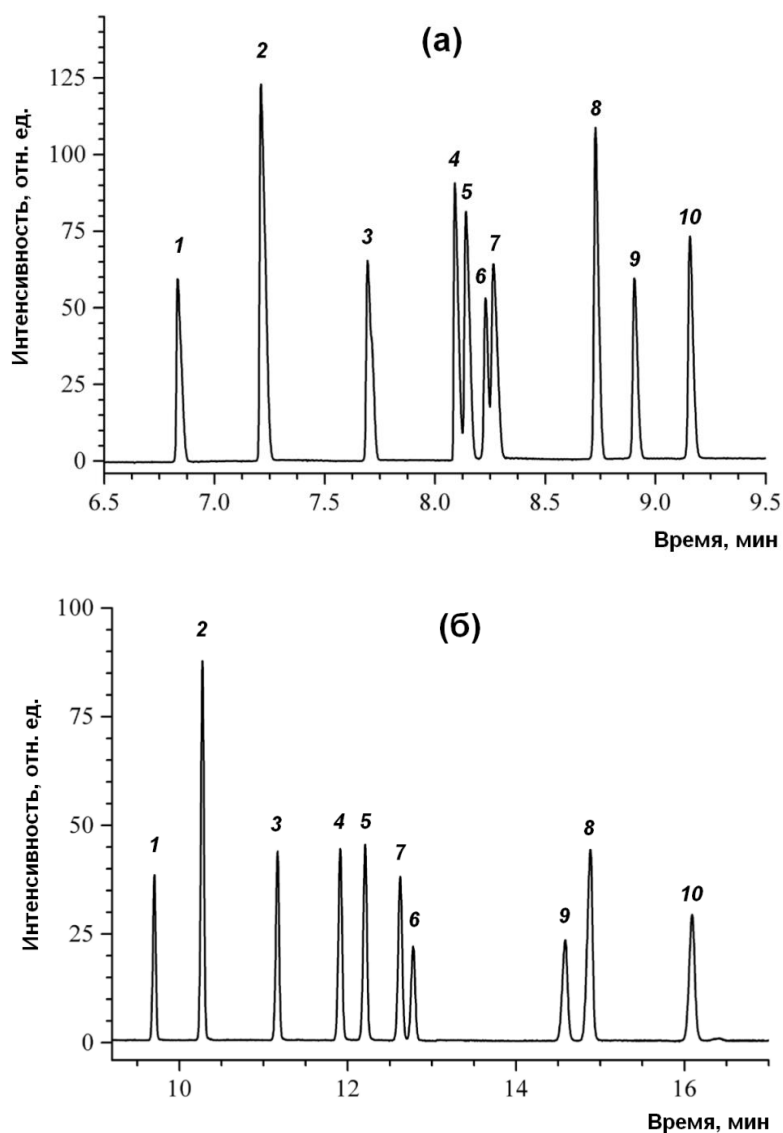


Рис. 8. Электрофореграммы смеси производных хинолина, определенной в варианте МЭКХ (а) и МЭЭКХ (б). 1 – хинолин, 2 – изохинолин, 3 – 2-метилхинолин, 4 – 4-метилхинолин, 5 – 3-метилхинолин, 6 – 8-метилхинолин, 7 – 6-метилхинолин, 8 – 2,8-диметилхинолин, 9 – 4,8-диметилхинолин, 10 – 2,4,8-триметилхинолин [42].

Из электрофореграмм видно, что порядок миграции определяемых компонентов в некоторых случаях может меняться при переходе от МЭКХ к МЭЭКХ, что свидетельствует о влиянии органической составляющей (масла и со-ПАВ) в составе фонового электролита на степень распределения аналитов между водной фазой и микроэмульсионными каплями. Стоит отметить также увеличение времени анализа, связанное с более широким окном миграции в варианте МЭЭКХ.

1.3.1.1. Варьируемые параметры в методе М/В МЭЭКХ

Микроэмульсии, используемые в качестве фоновых электролитов в МЭЭКХ, состоят из множества компонентов, тип и концентрацию которых можно варьировать в широких пределах, что позволяет влиять на селективность разделения и разрешение пиков определяемых веществ.

Тип и концентрация ПАВ

Природа ПАВ, входящего в состав микроэмульсии, оказывает значительное влияние на разделение аналитов за счет изменения заряда и размера микроэмульсионных капель, ион-парных взаимодействий с определяемыми компонентами пробы. Варьирование типа гидрофильной составляющей молекул ПАВ может также влиять на направление ЭОП вследствие модификации стенок кварцевого капилляра.

Большинство работ в области М/В МЭЭКХ посвящено использованию анионных ПАВ в составе микроэмульсий, наиболее распространенным является додецилсульфат натрия [43]. Селективность разделения аналитов может значительно изменяться при использовании других анионных ПАВ, например, алкилсульфатов и алкилсульфонатов с различной длиной углеродной цепи, докузата натрия или их смеси с ДДСН.

Катионные ПАВ часто используют в МЭЭКХ для разделения основных аналитов, при этом будут отсутствовать ион-парные взаимодействия, которые могли бы протекать между катионными веществами и отрицательными заряженными каплями (в случае анионных поверхностно-активных веществ). В данном варианте капиллярного электрофореза происходит сорбция свободных молекул катионного

ПАВ на поверхности капилляра, что приводит к модификации ЭОП, поэтому анализ проводят в режиме обращения полярности по аналогии с вариантом МЭКХ с использованием детергентов той же природы [44].

Неионогенные ПАВ редко применяют в МЭЭКХ, поскольку они не пригодны для разделения нейтральных веществ. Важно, чтобы микроэмульсионные капли имели заряд и были противонаправлены ЭОП, поэтому эти детергенты используют в основном в качестве добавок в микроэмульсию, как правило, для увеличения селективности разделения аналитов; их добавление не сказывается на увеличении тока в капилляре [45].

В работе [46] авторы продемонстрировали уникальную возможность разделения смеси хиральных изомеров в варианте М/В МЭЭКХ с использованием микроэмульсии на основе оптически активного ПАВ додекоксикарбонилвалина (ДДКВ). Электрофореграмма рацемической смеси эфедринов представлена на рис. 9. Для увеличения разрешения пиков определяемых веществ этот ПАВ часто применяют в сочетании с хиральным со-ПАВ и хиральной органической фазой ((S)-2-гексанол).

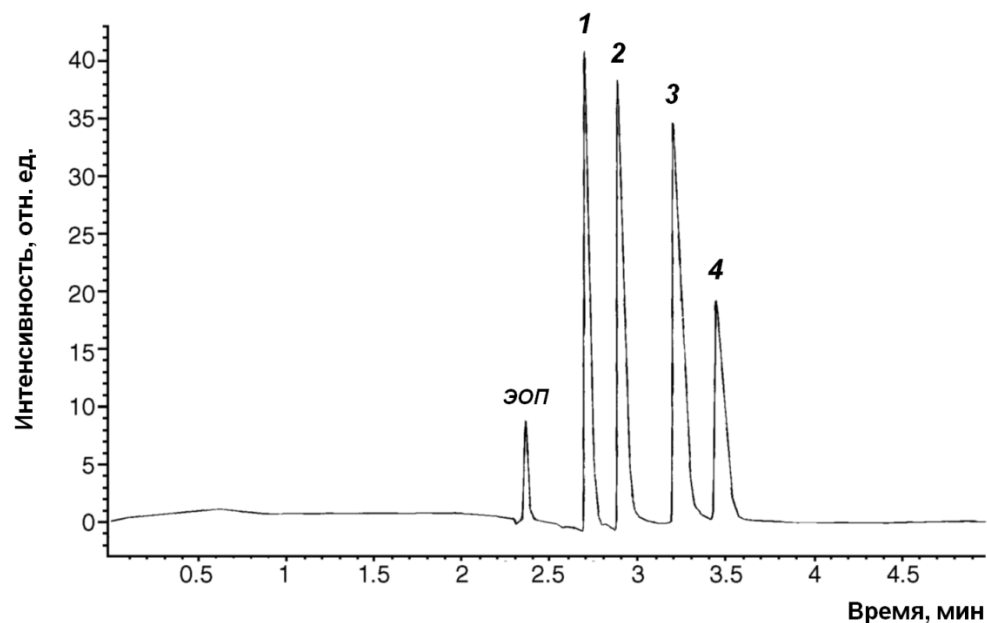


Рис. 9. Электрофореграмма тестовой смеси хиральных изомеров метилпсевдоэфедрина и эфедрина в варианте МЭЭКХ. 1 – R,R-метилпсевдоэфедрин, 2 – S,S-метилпсевдоэфедрин, 3 – R,S-эфедрин, 4 – S,R-эфедрин. Фоновый электролит: 1% (S)-ДДКВ, 1.2% бутанола-1, 0.5% этилацетата, 0.05% цвиттер-ионного водного буферного раствора. Напряжение +18 кВ [46].

Варьирование содержания ПАВ в составе микроэмульсионного буферного раствора может в значительной степени влиять на миграцию аналитов. Для снижения поверхностного натяжения между водной фазой и каплями масла и образования стабильной микроэмульсии требуются более высокие концентрации ПАВ, чем в варианте МЭКХ, однако это может приводить к значительному повышению тока в капилляре. В МЭЭКХ обычно используют ДДСН в концентрации 3.3 мас.% (118 мМ). Увеличение концентрации детергента влияет на времена миграции определяемых веществ в зависимости от их заряда и также способствует снижению ЭОП [45, 47]. В зависимости от степени взаимодействия с молекулами ПАВ на поверхности капли микроэмульсии увеличение их содержания может способствовать как снижению, так и увеличению подвижности аналитов и изменению разрешения пиков.

Тип и концентрация масла

В качестве масла в методе М/В МЭЭКХ обычно используют органические растворители с высокой гидрофобностью – н-гексан, н-гептан или н-октан [7]. Как правило, все эти алканы дают схожую селективность и времена удерживания, однако было установлено, что наиболее стабильные микроэмульсии образуются в случае н-октана, для которых характерно наилучшее разрешение, эффективность и воспроизводимость [48]. В качестве водонерастворимых соединений также часто используют циклогексан, пентан, толуол, 1-хлорпентан, 1-октанол, 1-гексанол, этилацетат, изопропилмиристат [49]. Для разделения энантиомеров готовят микроэмульсии с использованием хиральных масел – (S)-(+)-2-октанол, (R)-(-)-2-октанол и диэтилтартрат [50].

Варьирование концентрации органической фазы практически не сказывается на улучшении эффективности разделения аналитов. Однако это происходит не во всех случаях, например в работе [51] при разделении смеси восьми фенольных кислот и пяти дитерпеноидов разрешение пиков значительно изменялось при варьировании концентраций циклогексана в диапазоне от 0.3 до 1.2%. При содержании органической фазы выше 0.6% наблюдалось уменьшение эффективности разделения. Вероятно, это может быть обусловлено специфическими взаимодействиями между определяемыми веществами и микроэмульсионными каплями.

Тип и концентрация со-ПАВ

Со-ПАВ представляют собой органические растворители средней полярности и являются важной составляющей микроэмульсий, способствующей увеличению стабильности этих фоновых электролитов и значительно влияющей на селективность разделения аналитов. Одним из наиболее широко используемых со-ПАВ является бутанол-1; также часто применяют другие низкомолекулярные спирты (пропанол-1, пентанол-1, гексанол-1, циклогексанол). Спирты с разветвленной углеродной цепью, например, бутанол-2 или изопропанол, не образуют стабильных микроэмульсий, такие системы быстро расслаиваются с течением времени. В связи с достаточно низкими коэффициентами гидрофобности эти растворители преимущественно находятся в водной фазе и не взаимодействуют с микроэмульсионными каплями.

В работе [52] было исследовано влияние типа со-ПАВ на эффективность разделения смеси флаваноидов, полного разделения всех компонентов смеси удалось добиться только при использовании бутанола-1 (рис. 10).

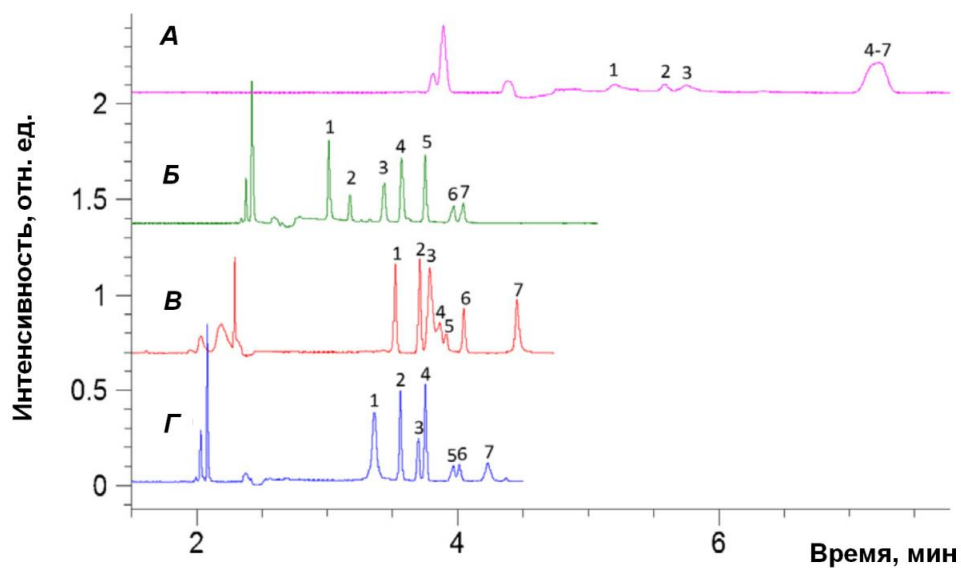


Рис. 10. Влияние типа со-ПАВ на селективность разделения флаваноидов методом М/В МЭЭКХ. Фоновый электролит – микроэмульсия состава 0.6% *N*-додецил-*N,N*-диметил-3-аммоний-1-пропансульфоната, 6.0% со-ПАВ, 0.5% этилацетата, 92.9% 5 мМ боратного буферного раствора (рН 9.0). Со-ПАВ: изопропанол (А), бутанол-1 (Б), пентанол-1 (В), циклогексанол (Г). 1 – каемпферол, 2 – апигенин, 3 – квертецин, 4 – изовитексин, 5 – апигенин 8-С-глюкозид, 6 – изокверцитрин, 7 – гиперозид [52].

Варьирование содержания со-ПАВ приводит к изменению скорости ЭОП и вязкости фонового электролита. Повышение его концентрации приводит к увеличению размера микроэмульсионных капель, повышая их способность противостоять ЭОП. Как правило, высокое содержание со-ПАВ способствует улучшению эффективности разделения, увеличению разрешения пиков и времен миграции [53].

Для разделения энантиомеров в качестве со-ПАВ используют оптически активные хиральные (R)-(2)-2-пентанол, (R)-(2)-2-гексанол, (R)-(2)-2-гептанол и изоамиловый спирт [54].

Тип и концентрация водного буферного раствора, использование дополнительных добавок

Разделение веществ в методе МЭЭКХ обычно осуществляются с использованием М/В микроэмульсий на основе водных буферных растворов с малой ионной силой (5-10 мМ), поскольку они дают необходимую величину ЭОП без чрезмерно высокого тока в капилляре [49]. При повышении концентрации буферного раствора наблюдается улучшение разрешения пиков определяемых веществ. Однако в свою очередь это приводит к подавлению электроосмотического потока и увеличению тока в капилляре, что ограничивает применение высокого напряжения и может способствовать увеличению времени анализа [55]. Таким образом, концентрация буферного раствора обычно составляет не более 50 мМ.

Часто используют боратный, фосфатный, ацетатный, карбонатный буферные растворы. Микроэмульсии на основе цвиттерионных буферов, таких как ТРИС (трис(гидроксиметил)аминометан) и АЦЭС (N-(2-ацетиламино)-2-аминоэтансульфоновая кислота), также применяют в методе МЭЭКХ, поскольку они дают низкие значения тока в капилляре, что позволяет увеличить скорость анализа за счет наложения более высокого напряжения [56, 57].

В некоторых случаях в микроэмульсионные буферные растворы вводят дополнительные добавки органических модификаторов для улучшения эффективности разделения аналитов. Наиболее распространенными являются добавки полярных растворителей, таких как метанол, ацетонитрил, изопропанол,

тетрагидрофуран. В работе [58] было установлено, что использование ацетонитрила и метанола значительно улучшило разрешение и форму пиков определяемых компонентов пробы. Содержание добавки обычно составляет не более 20 мас.%, увеличение концентрации органических модификаторов может негативно сказаться на устойчивости микроэмульсионной системы и привести к ее расслоению.

В микроэмульсионный фоновый электролит в некоторых случаях добавляют циклодекстрины, способствующие дополнительной солюбилизации аналитов и улучшающие распределительные свойства системы [59]. Использование добавки α -циклодекстрина позволило добиться полного разрешения пиков хиральных изомеров метаболитов 5-липноксигеназы [60].

pH микроэмульсии

pH микроэмульсии влияет как на скорость ЭОП, так и на степень ионизации определяемых веществ, это один из ключевых параметров в методе М/В МЭЭКХ. Варьирование pH напрямую влияет на ЭОП за счет диссоциации силанольных групп стенок кварцевого капилляра, что приводит к изменению времен миграции аналитов. Обычно используют pH микроэмульсии в диапазоне от 7 до 10 [49]. В случае разделения неионогенных соединений времена миграции увеличиваются при уменьшении pH. В некоторых случаях для подавления диссоциации аналитов используют буферные растворы с pH 9-12 для разделения основных [61] и pH 1.5-2.5 для разделения кислотных веществ [62]. В последнем случае низкие значения pH способствуют подавлению ЭОП, поэтому анализ необходимо проводить в режиме с обращением полярности (при отрицательном напряжении). Первыми будут мигрировать отрицательно заряженные микроэмульсионные капли, поэтому скорость миграции будет самой высокой у наиболее гидрофобных соединений.

В работе [63] проводили определение смеси натуральных и синтетических эстрогенов методом М/В МЭЭКХ, pH фонового электролита варьировали в диапазоне от 7.5 до 12.5. При значении pH 12.5 удалось добиться наилучшего разрешения веществ, разделение аналитов осуществлялось за счет распределительного механизма и собственной электрофоретической подвижности заряженных компонентов пробы – эстрадиол 3-бензоат находился в нейтральной форме, эстрадиол 17-гемисукцинат

диссоциирован по двум функциональным группам, остальные ионогенные аналиты были однозарядны при данном значении рН (рис. 11).

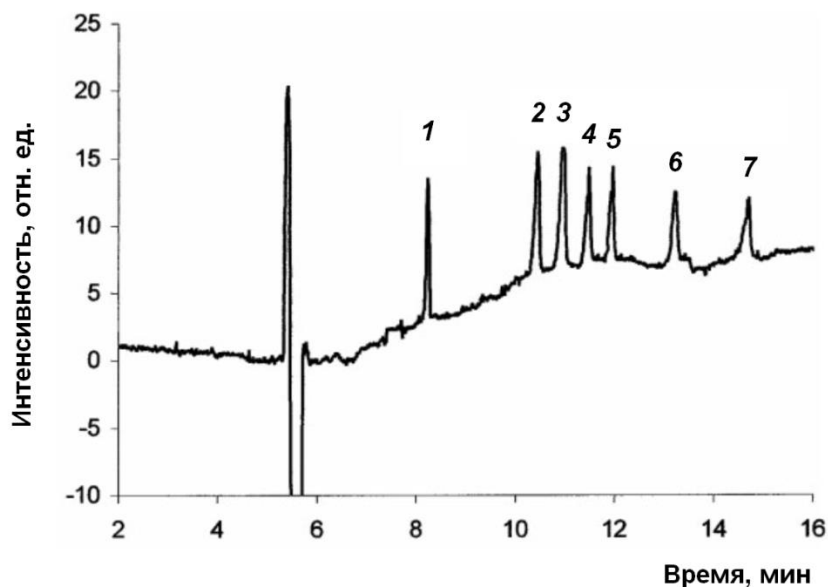


Рис. 11. Электрофореграмма производных эстрогена, определенных методом М/В МЭЭКХ. Фоновый электролит – М/В микроэмульсия состава 1.4% докузата натрия, 1.0% н-октана, 7.0% бутанола-1, 90.6% 20 мМ КАПСО (*N*-циклогексил-2-гидроксил-3-аминопропансульфоновой кислоты) и 10 мМ фосфатного буферного раствора, рН 12.5. 1 – эстриол, 2 – эстрадиол 17-гемисукцинат, 3 – эстрон, 4 – этиниоэстрадиол, 5 - 17 β -эстрадиол, 6 – эстрадиол 3-бензоат, 7 – эстрадиол 17-валерат [63].

Температура

Температура капилляра влияет на растворимость определяемых веществ и, как следствие, на их распределение между водной фазой и микроэмульсионными каплями. Варьирование температуры по-разному сказывается на селективность разделения нейтральных или заряженных аналитов [64, 65]. Увеличение температуры приводит к понижению вязкости микроэмульсии и, следовательно, увеличению скорости ЭОП и скорости миграции определяемых веществ, при этом селективность разделения незначительно уменьшается. Обычно подбирают температуру, при которой достигается приемлемое разрешение пиков при минимальном времени анализа. На рис. 12 продемонстрировано влияние температуры на разделение

аристолохиевых кислот в травяных лекарственных препаратах методом М/В МЭЭКХ [66].

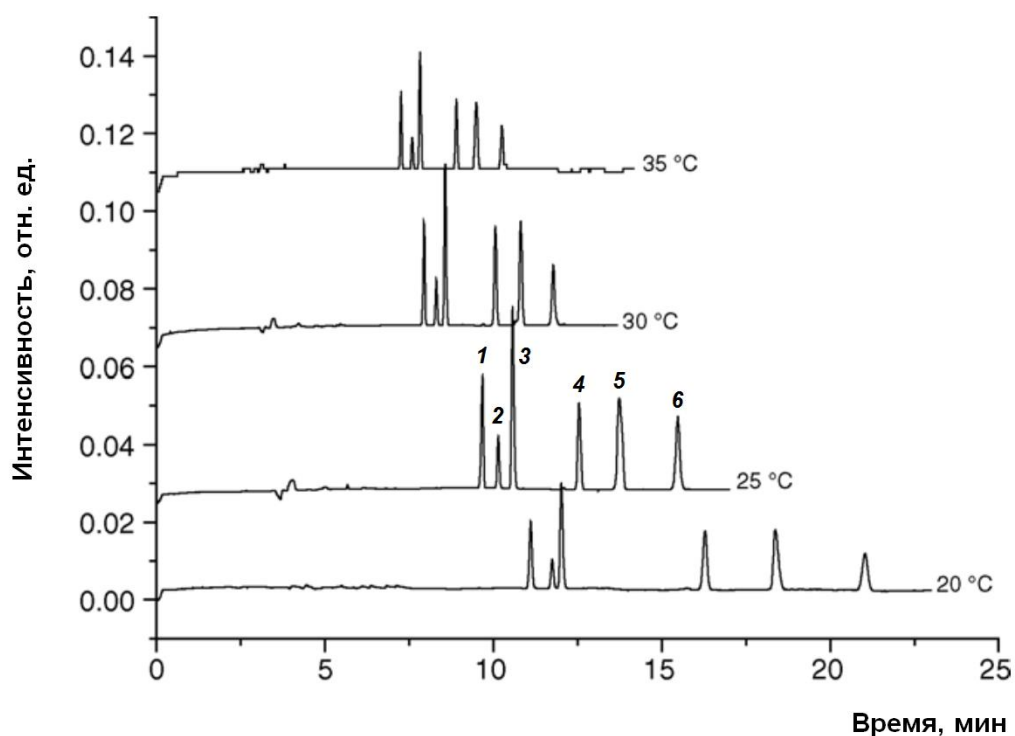


Рис. 12. Влияние температуры на разделение смеси аристолохиевых кислот. 7-гидрокси-аристолохиевая кислота А (1); аристолохиевая кислота D (2), аристолохиевая кислота С (3), аристолохиевая кислота В (4), аристолохиевая кислота А (5); аристолохиевая кислота (6) [66].

Напряжение

Величина напряжения влияет на скорость миграции определяемых веществ и ЭОП, его повышение приводит к ускорению анализа и незначительному увеличению эффективности [67]. Микроэмульсионные фоновые электролиты обладают достаточно большой электропроводностью, что может накладывать ограничения на наложение высоких значений напряжения в связи с увеличением тока в капилляре. Варьирование напряжения обычно в незначительной степени сказывается на селективности разделения веществ, однако в некоторых работах отмечено влияние этого параметра на разрешение пиков, например в работе [68] авторами отмечено перекрывание пиков дексаметазона фосфата натрия и пропилпарабена при напряжении выше +23 кВ.

1.3.1.2. Применение метода М/В МЭЭКХ

В последнее время количество публикаций, посвященных М/В МЭЭКХ, значительно растет. Этот метод нашел применение для анализа сложных смесей гидрофобных и гидрофильных веществ с упрощенной процедурой пробоподготовки, уникальной селективностью разделения веществ, высокой эффективностью. Он пригоден для определения широкого круга неорганических и органических веществ, представляющих собой как основные компоненты, так и примеси. Метод М/В МЭЭКХ применяют для анализа различных фармацевтических, косметических препаратов, биологических жидкостей, объектов окружающей среды, пищевых продуктов, взрывчатых веществ [7, 69].

Разделение стереоизомеров в данном варианте капиллярного электрофореза может быть достигнуто при добавлении в состав микроэмульсионного буферного раствора оптически активных ПАВ, масла, со-ПАВ или специальных хиральных селекторов (производных циклодекстрина) [70].

Наиболее часто используемыми в методе М/В МЭЭКХ детекторами являются спектрофотометрический или диодно-матричный. В последнее время широкое распространение также получил вариант М/В МЭЭКХ в сочетании с масс-спектрометрическим (МС) детектированием [41]. Он обладает рядом преимуществ, таких как низкое время анализа и высокая эффективность разделения, характерные для капиллярного электрофореза, а также низкие пределы обнаружения и возможность качественной идентификации определяемых веществ за счет МС-детектирования. Однако применение псевдостационарных мицеллярных или микроэмульсионных фаз в методах МЭКХ и МЭЭКХ, соответственно, ограничивает их совместимость с этим видом детектора. Фотоионизация при атмосферном давлении с использованием криптоновой лампы позволяет преодолеть недостаток этих фоновых электролитов (большого числа заряженных молекул ПАВ) путем подавляющего эффекта электроионизации [71], что позволило успешно сочетать МЭЭКХ с МС-детектированием. Этот метод был успешно применен при анализе смеси инсулина и его синтетических аналогов [72], лекарственных препаратов [73]. Также было предложено использование метода МЭЭКХ в сочетании с масс-спектрометрией с

индуктивно-связанной плазмой (МС-ИСП) для разделения Pt(II) и Pt(IV) противораковых препаратов [74].

Одной из областей МЭЭКХ является расчет различных физико-химических характеристик, таких как коэффициенты гидрофобности, константы диссоциации, коэффициенты диффузии [69].

Параметр гидрофобности Ганша ($\log P$) определяется при помощи стандартной системы 1-октанол – вода. Логарифм коэффициента распределения незаряженных форм субстрата и есть искомая величина, стандартно обозначаемая как $\log P$:

$$\text{Log}P_{\text{окт/вода}} = \text{Log} \left(\frac{C_{(\text{октанол})}}{C_{(\text{вода})}} \right) \quad (1)$$

Метод М/В МЭЭКХ является пригодными для определения гидрофобных веществ, при этом логарифм фактора емкости $\text{Log}K$ прямо пропорционален их гидрофобности:

$$\text{Log}P = b * \text{Log}K' + a \quad (2)$$

где a и b – константы. Фактор емкости k' определяемого методом МЭЭКХ вещества рассчитывают по формуле:

$$K' = \frac{t_m - t_{\text{ЭОП}}}{t_{\text{ЭОП}} \cdot \left(1 - \frac{t_m}{t_{\text{mc}}} \right)} \quad (3)$$

где t_m – время миграции определяемого вещества, $t_{\text{ЭОП}}$ – время миграции воды (или маркера ЭОП), t_{mc} – время миграции мицелл.

Линейная зависимость гидрофобности от $\text{Log}K'$ справедлива только для нейтральных веществ, для которых электрофоретическая подвижность обусловлена только их распределением между водной фазой и микроэмульсионными каплями.

В работе [75] авторы проводили расчет коэффициентов гидрофобности исследуемых пестицидов. Для этого также проводили анализ смеси стандартных веществ с известными коэффициентами $\text{Log}P$. Из полученных электрофореграмм для стандартной и исследуемой смесей рассчитывали факторы емкости, а затем строили зависимости параметра гидрофобности от $\text{Log}K'$, из которых рассчитывали неизвестные коэффициенты гидрофобности пестицидов (рис. 13).

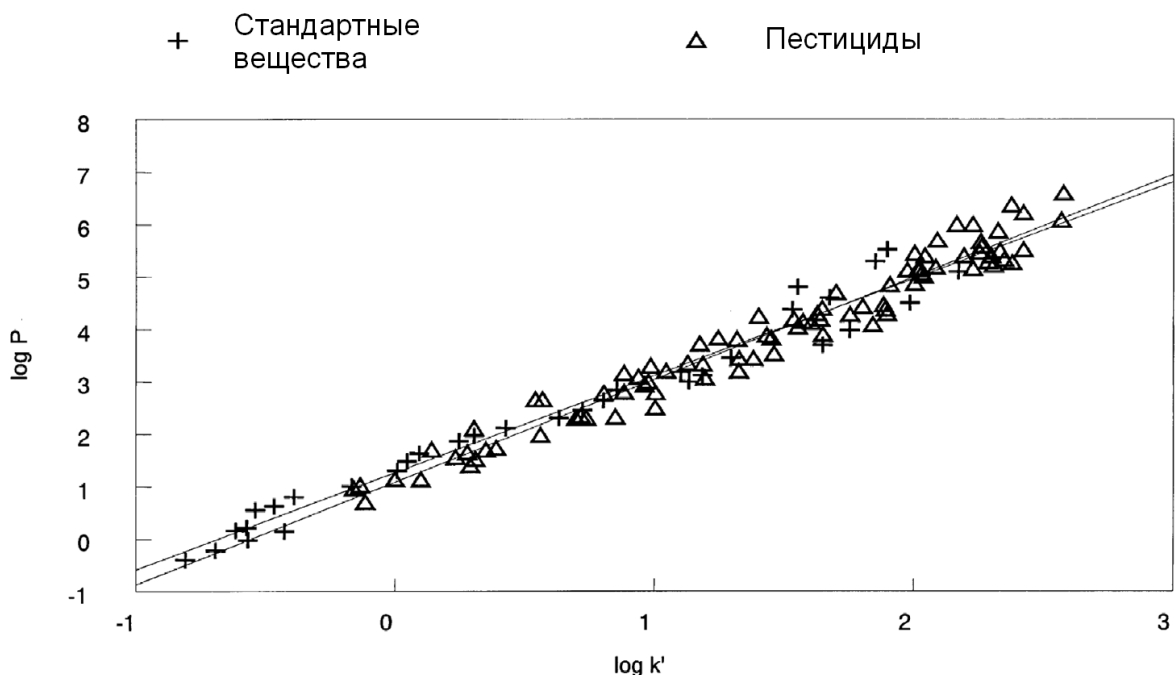


Рис. 13. Зависимость коэффициентов гидрофобности $\log P$ от логарифма факторов емкости для различных органических веществ и исследуемых пестицидов [75].

В статье [76] авторы продемонстрировали возможность расчета коэффициентов распределения большого числа аналитов методом анализа сдвига пиков, для которого не требуется использование стандартных образцов. Были изучены серии микроэмульсионных электролитов с варьируемой концентрацией органической фазы, и значения коэффициентов гидрофобности рассчитывали в соответствии с изменением эффективной подвижности аналитов в зависимости от концентрации капель микроэмульсии в составе буферного раствора.

Метод МЭЭКХ пригоден для оценки скоростей реакции, например в работе [77] проводили расчет константы скорости эимеризации амигдалина в основной микроэмульсии путем мониторинга изменения его концентрации.

Другие применения метода М/В МЭЭКХ представлены в табл. 2.

Таблица 2. Применение метода М/В МЭЭКХ для анализа фармацевтических, косметических образцов, пищевых продуктов и объектов окружающей среды.

Применение	Микроэмульсионный фоновый электролит	Лит-ра
Аминокислоты в продуктах питания, напитках и биологических образцах	2.16% ДДСН, 0.6% циклогексана, 6% бутанола-1, 4% ацетонитрила, 87.24% 30 мМ фосфатного буферного раствора (рН 6.0)	[78]
Фталаты в безалкогольных напитках	3.46% ДДСН, 0.5% н-октана, 7.0% бутанола-1, 0.25% Плюроники F-127, 10.0% метанола, 78.69% 30 мМ фосфатного буферного раствора (рН 2.5)	[79]
Кофеин в лекарственных препаратах и энергетических напитках	3.3% ДДСН, 1.5% н-гексана, 6.6% бутанола-1, 88.6% 8.85 мМ боратного буферного раствора (рН 9.5)	[80]
Лекарственные препараты, содержащие цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин	3.3% ДДСН, 0.78% н-гептана, 6.6% бутанола-1, 89.32% 20 мМ фосфатного буферного раствора (рН 7.0)	[81]
Ароматические амины в образцах природной воды	60 мМ холата натрия, 0.8 об.% этилацетата, 5.0 об.% бутанола-1, 94.2 об.% 10 мМ боратного буферного раствора (рН 9.0)	[61]
Катехины и катехоламины в природных объектах	3.5% ДДСН, 1.36% н-гептана, 9.72% бутанола-1, 85.5% 10 мМ ацетатно-аммонийного и формиатного буферного раствора (рН 2.0)	[82]
Бензофеноны (УФ-фильтры в косметических продуктах)	0.6% ДДСН, 0.5% этилацетата, 1.2% бутанола-1, 5% этанола, 92.7% ТРИС буферного раствора (рН 9.0)	[83]

1.3.2. Микроэмульсионная электрокинетическая хроматография с использованием микроэмульсий типа «вода в масле» (В/М МЭЭКХ)

Использованию обратных микроэмульсий типа «вода в масле» в методе МЭЭКХ посвящено лишь несколько работ. Первое упоминание об этой разновидности капиллярного электрофореза появилось в 2001 г., где авторы проводили сравнение прямых и обратных микроэмульсий, применяемых в качестве фоновых электролитов в капиллярном электрофорезе на примере разделения бензофенона и производных бензойной кислоты [84].

Метод МЭЭКХ с использованием В/М микроэмульсий (В/М МЭЭКХ) может быть пригоден для разделения веществ различной полярности. Как правило, в большинстве работ описывается возможность анализа сложных смесей гидрофильных аналитов как в нейтральной, так и в заряженной форме [85, 51]. В работе [86] продемонстрировано применение В/М МЭЭКХ для разделения сильно гидрофобных веществ – β -каротина и астаксантина с хорошим разрешением, чего не удалось добиться в варианте МЭЭКХ при использовании прямых микроэмульсий (рис. 14).

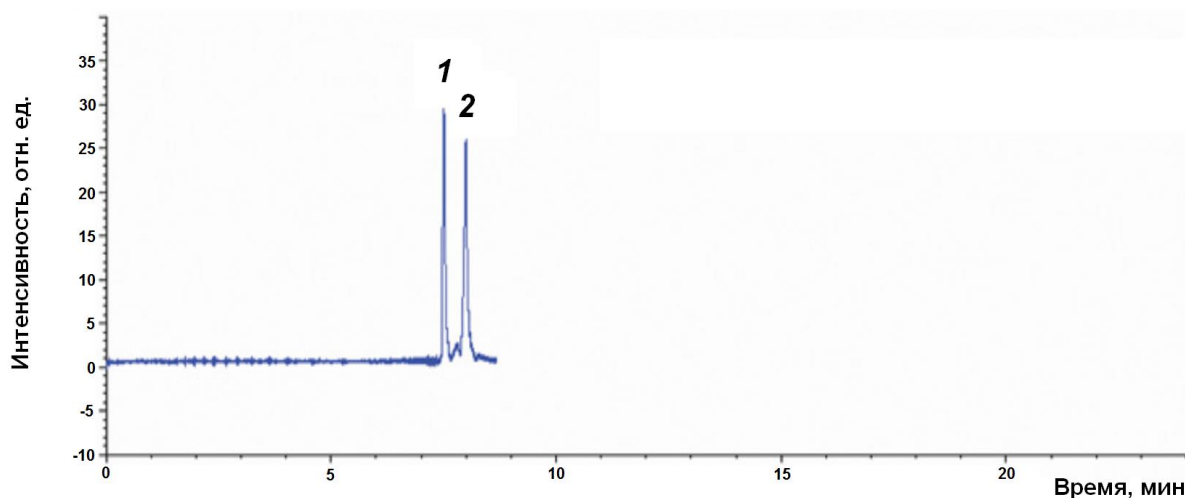


Рис. 14. Электрофореграмма смеси β -каротина (1) и астаксантина (2) в варианте В/М МЭЭКХ. Фоновый электролит: В/М микроэмульсия состава 9% ДССН, 80% бутанола-1, 11% 70 мМ ацетатного буферного раствора, рН 8.0 [86].

Варьирование состава В/М микроэмульсии (тип и концентрация ПАВ, масла, водного буферного раствора, рН) может оказывать значительное влияние на порядок миграции и селективность разделения аналитов. Как правило, в качестве органической основы этих фоновых электролитов используют низкомолекулярные спирты, ограниченно смешивающиеся с водой – бутанол-1 или пентанол-1. В роли ПАВ применяют анионные, такие как ДДСН, докузат натрия; использование катионного детергента ЦТАБ описано лишь в одной работе, при этом пики определяемых компонентов разделить не удалось [86]. В связи с низкой электрической проводимостью микроэмульсий типа В/М необходимо использование высоких концентраций буферных растворов в составе водной фазы обратных микроэмульсий.

На рис. 15 продемонстрировано сравнение вариантов В/М МЭЭКХ и М/В МЭЭКХ на примере разделения смеси полярных органических веществ.

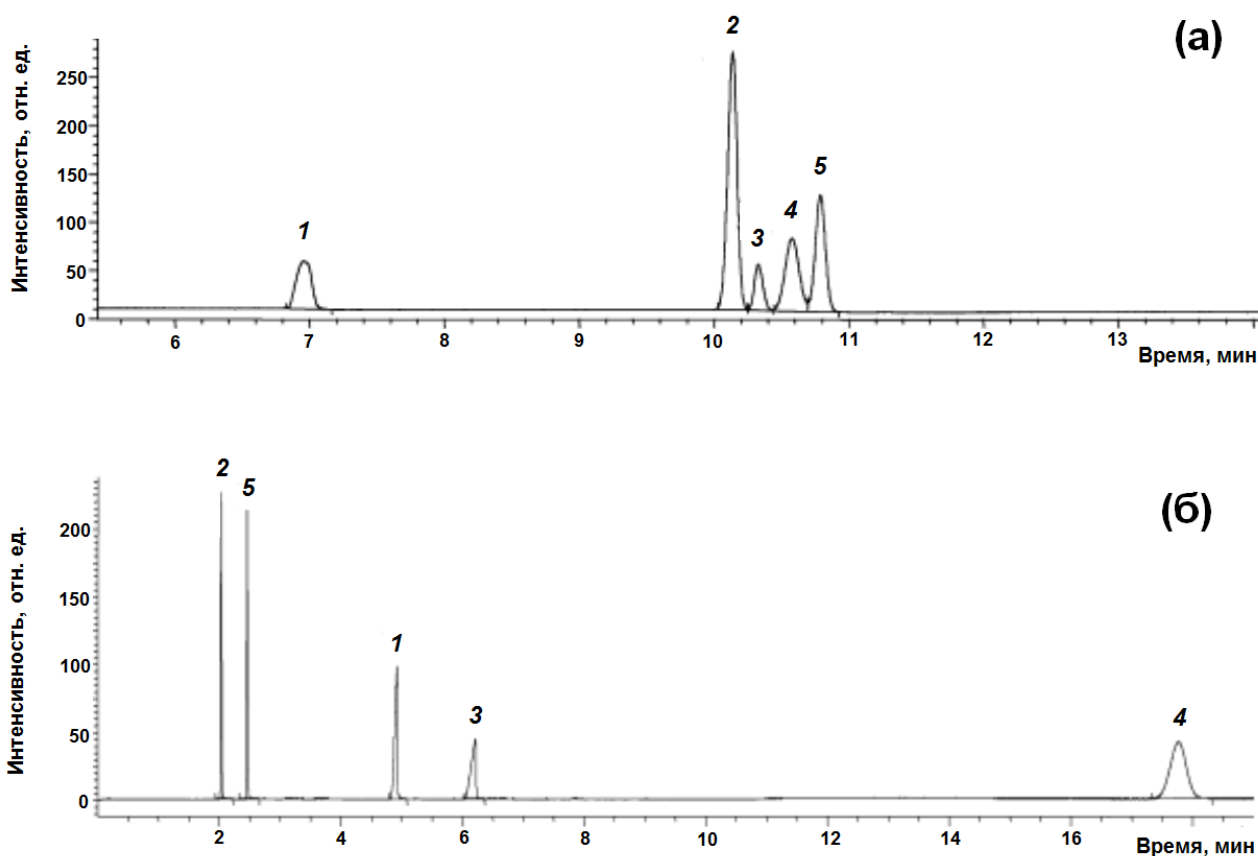


Рис. 15. Электрофореграммы модельной смеси органических веществ, определенных методами В/М МЭЭКХ (а) и М/В МЭЭКХ (б). 1 – 4-гидроксиацетофенон, 2 – тиомочевина, 3 – сорбиновая кислота, 4 – нафталин, 5 – кофеин [87].

Из представленных электрофореграмм видно, что порядок миграции аналитов для двух разновидностей метода МЭЭКХ значительно различается. Селективность разделения веществ при использовании обратных микроэмульсий обычно хуже, чем для прямых, однако на этот параметр можно влиять путем варьирования состава фонового электролита [51].

В отличие от метода М/В МЭЭКХ, где время миграции нейтральных веществ напрямую связано с их коэффициентами гидрофобности, в В/М МЭЭКХ электрофоретическая подвижность аналитов никак не коррелирует с их $\log P$, что может свидетельствовать о сложном механизме разделения в этом варианте капиллярного электрофореза. Одним из важных преимуществ этого метода является возможность создания фоновых электролитов на основе органического растворителя с большим содержанием водной составляющей (10-32%). Это позволяет расширить диапазон варьирования состава этих растворов в отличие от микроэмульсий типа «масло в воде», которые оказываются стабильными лишь при небольшом содержании масла (0.1-2%) [87].

Возможность сочетания В/М МЭЭКХ с предварительным он-лайн концентрированием – стэкингом с усилением поля – была рассмотрена лишь в одной работе [88]. Этот метод позволил снизить пределы обнаружения определяемых антибиотиков до 12 раз.

В/М МЭЭКХ нашел применение для анализа водонерастворимых лекарственных препаратов, косметических кремов [89]. Использование микроэмульсий типа «вода в масле» позволило значительно упростить процедуру пробоподготовки. Определение основных компонентов характеризуется приемлемой воспроизводимостью и точностью. На рис. 16 представлена электрофореграмма назального спрея.

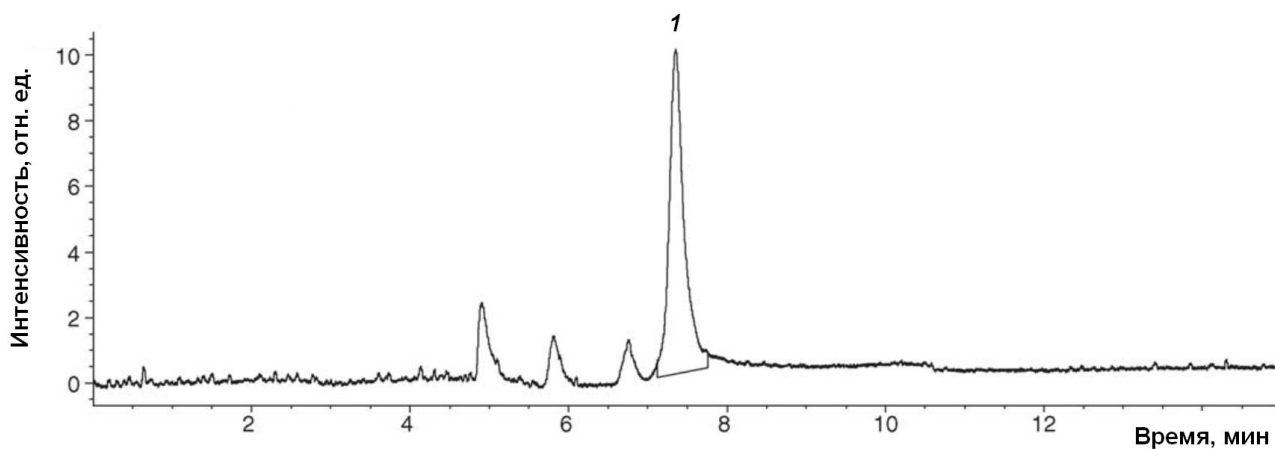


Рис. 16. Электрофореграмма назального спрея Flonase® в варианте В/М МЭЭКХ. 1 – флутиказона пропионат. Фоновый электролит: В/М микроэмульсия состава 10% ДССН, 78% бутанола-1, 2% н-октана, 10% 70 мМ ацетатного буферного раствора, рН 8.0. Ввод пробы гидродинамический при 50 мбар в течение 1 сек, напряжение -30 кВ, температура 25 °С, детектирование при 254 нм [89].

1.4. Другие применения микроэмульсий

Уникальная природа микроэмульсий как термодинамически стабильных дисперсий, состоящих из нано-размерных капель, делает их применимыми в различных областях.

1.4.1. Фармацевтика

Использование микроэмульсий в составе фармацевтических препаратов имеет множество преимуществ по сравнению с жидкокристаллическими и эмульсионными системами. За счет своей стабильности микроэмульсии способствуют продлению срока хранения многих жидких лекарственных форм. Дисперсная фаза микроэмульсии может выступать в качестве «резервуара» для водо- и жирорастворимых препаратов в зависимости от типа используемой микроэмульсии: «масло в воде» для липофильных веществ, «вода в масле» – для гидрофильных [90]. Кроме того, в связи с ее уникальной солюбилизующей способностью возможно одновременное введение как гидрофильных, так и гидрофобных компонентов. В отличие от эмульсий, микроэмульсии способствуют снижению реакции иммунной

системы, а также минимизируют риск эмболии, которая может быть вызвана высоким содержанием жира в препарате.

В некоторых работах было отмечено, что использование микроэмульсий в составе фармацевтических препаратов способствует увеличению адсорбции, улучшению клинической активности, а также в ряде случаев снижению токсичности лекарственных веществ [91, 92]. Таким образом, микроэмульсии отлично подходят для доставки лекарственных препаратов, таких как стероиды, гормоны, антибиотики и мочегонные средства. Для препаратов, содержащих пептиды и белки, наблюдается увеличение биодоступности, также отмечается отсутствие денатурации протеинов при длительном хранении [93].

1.4.2. Микроэмульсии как реакционные среды

Благодаря уникальному строению микроэмульсии могут быть использованы в качестве реакционных «контейнеров» для проведения множества химических реакций, к основным видам которых относят формирование неорганических частиц (наночастиц), реакции полимеризации, фотохимические, электрохимические, электрокаталитические реакции синтеза органических веществ [94]. Использование микроэмульсий нашло широкое применение и в ферментативном катализе. В биологических системах многие ферменты работают на стыке гидрофобных и гидрофильных областей, и обычно эти поверхности стабилизируются за счет полярных липидов и других природных амфифилов. Ферментативный катализ в микроэмульсиях может быть использован для различных реакций, таких как синтез сложных эфиров, различных реакций гидролиза, превращений с участием стероидов [95].

В работе [96] микроэмульсию типа «масло в воде», содержащую н-гексан (масло), н-бутанол (со-ПАВ) и цетилтриметиламмония бромид (ПАВ), использовали в качестве среды для реакции перекрестной альдольной конденсации между бензальдегидом и ацетоном. Было отмечено, что реакция протекает на границе раздела фаз между водой и каплями масла, при этом за счет варьирования состава микроэмульсии возможно достижение максимальной скорости реакции. Кроме того,

использование прямых микроэмульсий позволяет свести к минимуму содержание органических растворителей (масла) в реакционной системе.

В качестве реакционных сред нашли применение не только микроэмульсии типа «вода в масле» или «масло в воде», но также и биконтинуальные микроэмульсии, что было продемонстрировано на примере каталитического синтеза п-гексил-β-D-глюкопиранозида [97].

В работе [98] проводили изучение реакции сольволиза замещенных бензоил хлоридов в среде обратных микроэмульсий. Исследование кинетики при варьировании состава В/М микроэмульсионной среды позволило сделать предположение о протекания реакции на границе раздела фаз между изооктаном и водой (рис. 17).

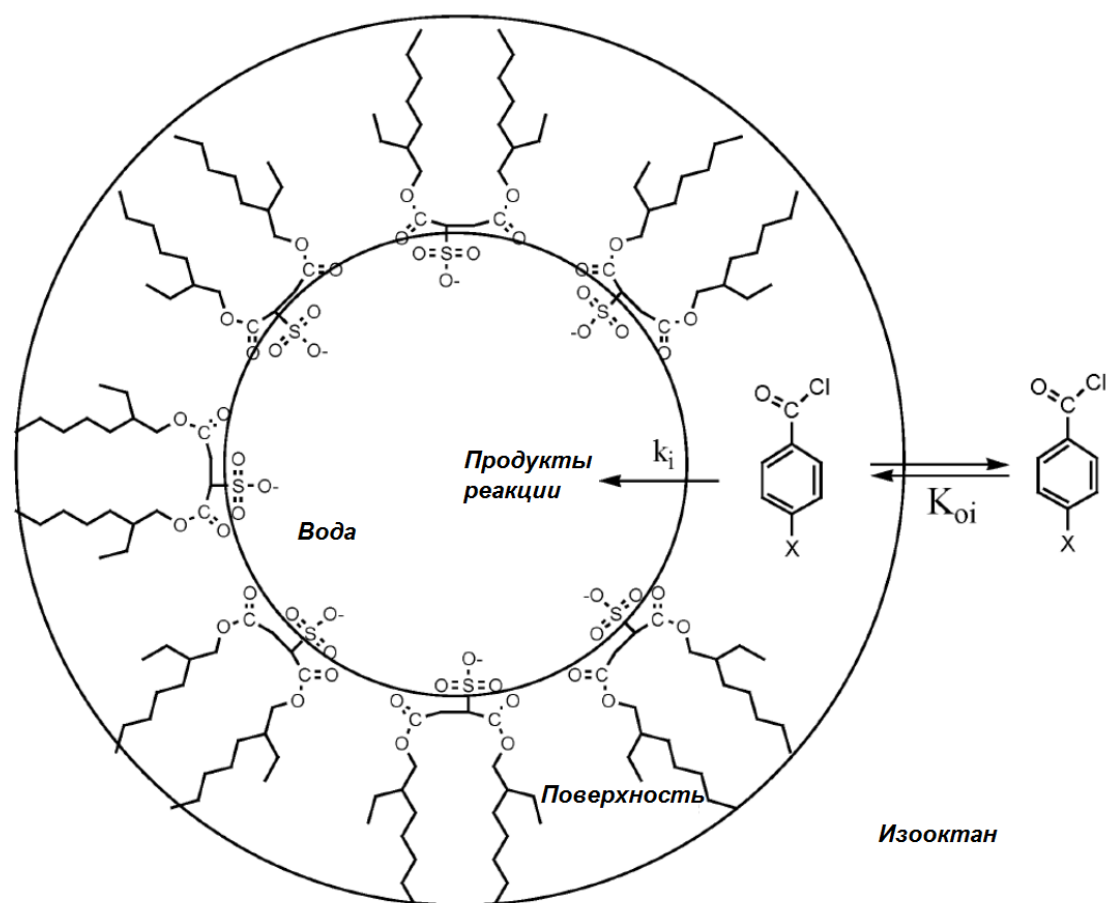


Рис. 17. Схема реакции сольволиза замещенных бензоил хлоридов в среде В/М микроэмульсии на основе воды, докузата натрия и изооктана [98].

1.4.3. Увеличение нефтеотдачи пластов

Возможность получения ультранизких значений межфазного натяжения порядка 10^{-3} мН/м определяет некоторые области применения микроэмульсионных систем, в частности для повышения степени нефтеотдачи пластов [99, 100]. Для этого микроэмульсионные системы вводятся во вспомогательные скважины, расположенные вокруг центральной промысловой на некотором расстоянии; затем во вспомогательные скважины закачивается вода, так что через породу проталкивается прослойка микроэмульсии. Проходя через нефтеносную породу, эта микроэмульсия, имеющая значительные концентрации ПАВ, как бы «смывает» нефть с породы, оттесняя ее к промысловой скважине.

1.4.4. Микроэмульсионная жидкостная хроматография (МЭЖХ)

Первое упоминание об использовании микроэмульсий в качестве элюентов в высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) появилось в 1986 году, когда в мицеллярную фазу на основе *n*-гексана добавляли небольшое количество воды с образованием В/М микроэмульсии [101]. Дальнейшие исследования в этой области продолжились лишь спустя 4-5 лет, при этом в качестве подвижных фаз начали использовать микроэмульсии обоих типов [102, 103]. С тех пор метод микроэмульсионной жидкостной хроматографии (МЭЖХ) начал активно развиваться, и в последнее время его все чаще используют для определения органических веществ различной природы в пищевых и лекарственных объектах. В отличие от варианта обращено-фазовой жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ), где для одновременного определения гидрофильных и гидрофобных соединений необходимо использовать градиентное элюирование, методом МЭЖХ возможно провести разделение такой смеси и в изократическом режиме.

1.4.4.1. МЭЖХ с использованием микроэмульсий типа «масло в воде»

Микроэмульсии типа «масло в воде» в сочетании с неполярными неподвижными фазами наиболее часто встречаются в литературе в связи с низкой вязкостью этих элюентов и популярностью режима ОФ ВЭЖХ. По сравнению с

обычно используемыми водно-органическими подвижными фазами микроэмульсии обладают уникальной селективностью разделения, которая позволяет достичь оптимального времени удерживания компонентов.

В связи с тем, что микроэмульсии являются многокомпонентными системами, механизм удерживания определяемых веществ заметно усложняется по сравнению с классическим обращенно-фазовым режимом жидкостной хроматографии [104]. Во-первых, как и в варианте мицеллярной ВЭЖХ, неподвижная фаза модифицируется за счет адсорбции на ней молекул поверхностно-активного вещества, при этом изменяются ее свойства. Во-вторых, возникает еще одно равновесие, основанное на распределении аналита между водной фазой и каплями масла. Гидрофобные вещества преимущественно находятся в неполярной фазе (масле), гидрофильные остаются в полярной (водной) фазе. Удерживание аналита зависит от следующих факторов [105]:

- растворимости вещества в полярной и неполярной фазах микроэмульсии;
- размеров капель масла;
- концентрации аналита во вводимой пробе;
- коэффициента распределения вещества между жидкостями, составляющими микроэмульсию.

Кроме того, влиять на удерживание аналитов можно за счет варьирования концентрации и типа ПАВ, со-ПАВ и масла, входящих в состав микроэмульсии, а также за счет изменения pH, температуры и введения добавок второго поверхностно-активного вещества [4].

1.4.4.2. МЭЖХ с использованием микроэмульсий типа «вода в масле»

Использование микроэмульсий типа «вода в масле» в качестве подвижной фазы в сочетании с полярной колонкой аналогично нормально-фазовому режиму ВЭЖХ с использованием полярных сорбентов [102]. Эта разновидность метода МЭЖХ мало изучена, ей посвящено лишь небольшое число исследований.

В силу того, что основой В/М микроэмульсий типа является гидрофобная фаза (масло), основное направление в области применения этих микроэмульсий связано с

их высокой солубилизирующей способностью по отношению к жирорастворимым соединениям (например, жирам и белкам) [106]. Поэтому они получили большое распространение при анализе фармацевтических, пищевых и косметических объектов как экстрагенты для пробоподготовки. На рис. 18 представлена хроматограмма водонерастворимых лекарственных препаратов и консерванта.

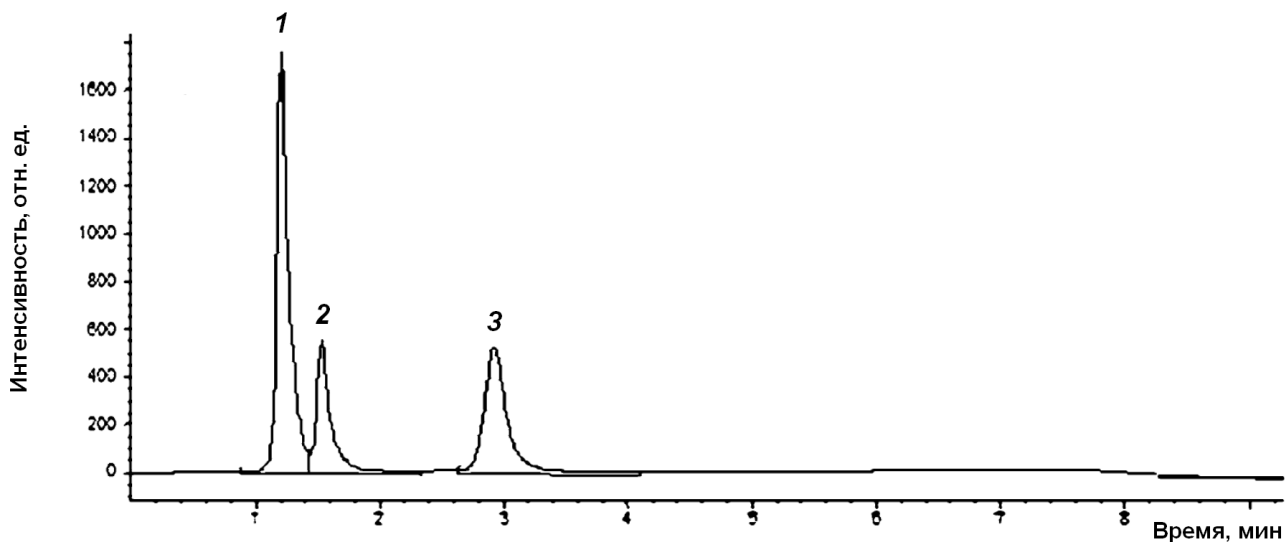


Рис. 18. Хроматограмма смеси водонерастворимых лекарственных препаратов и консерванта, определенных методом МЭЖХ с использованием микроэмульсии типа «вода в масле». Подвижная фаза: В/М МЭ состава 70% н-гептана, 16.6% пентанола-1, 8.3% ДДСН, 5% 70 мМ ацетатного буферного раствора. 1 – флутиказона пропионат, 2 – пропилпарабен, 3 – сальметерол [106].

Адсорбция молекул ПАВ на неподвижной фазе колонки, связанная с их высокими концентрациями может приводить к увеличению времен удерживания аналитов и размыванию пиков. В связи с этим важно регулярное промывание колонки для поддержания стабильности ее работы, для этого обычно последовательно используют различные смеси растворителей: изопропанол-метанол (60:40 об.%), затем изопропанол-вода (50:50 об.%) и, наконец, изопропанол-этанол (99:1 об.%) [106]. Однако эта процедура достаточно продолжительная и может занять порядка нескольких часов, что свидетельствует о важности автоматизации хроматографической системы.

К основным недостаткам данного класса подвижных фаз можно отнести высокую вязкость В/М микроэмульсий по сравнению с микроэмульсиями типа «масло в воде», следствием чего является более высокое давление в хроматографической системе. Кроме того, значительно увеличивается время приготовления микроэмульсии.

1.4.4.3. Применение МЭЖХ

В последние годы метод микроэмульсионной жидкостной хроматографии получил широкое распространение в связи с уникальной способностью микроэмульсий разделять сложные смеси различных по природе веществ и значительным упрощением пробоподготовки анализируемых образцов. Использование микроэмульсионных элюентов позволяет в изократическом варианте определять смеси веществ, сильно различающихся по гидрофобности.

В основном, область применения микроэмульсий связана с определением различных веществ в пищевых и косметических объектах, но наибольшее распространение получил анализ лекарственных препаратов как в фармацевтических субстанциях, так и в биологических жидкостях [107, 108].

Метод МЭЖХ может быть успешно применен для биоанализа, например, в работе [109] было проведено определение симвастина и симвастиновой кислоты в плазме крови с использованием микроэмульсии в качестве элюента. Было отмечено значительное упрощение пробоподготовки: образцы плазмы вводили непосредственно в хроматографическую колонку после разбавления их микроэмульсионной подвижной фазой.

В работе [110] микроэмульсию типа «масло в воде» использовали в качестве подвижной фазы для анализа жирорастворимых витаминов. Варьирование состава микроэмульсии позволило с высокой чувствительностью и эффективностью разделить сложную смесь веществ, при этом сократить время анализа до 30 минут (рис. 19).

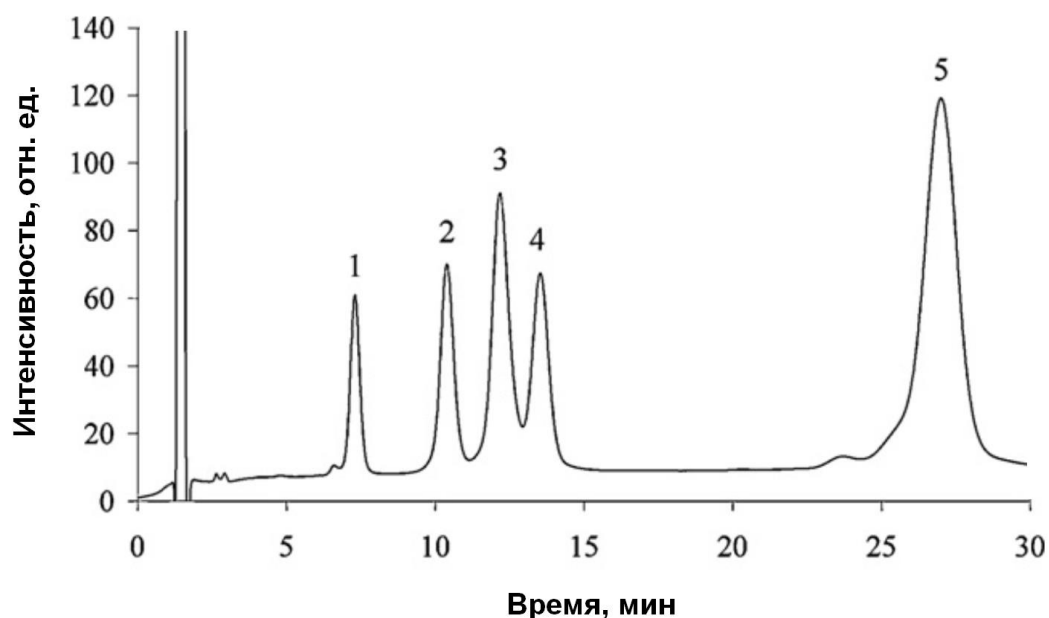


Рис. 19. Хроматограмма смеси жирорастворимых витаминов, определенных методом МЭЖХ. Подвижная фаза: М/В МЭ состава 73.3 мМ ДДСН, 0.48 об.% диэтилового эфира, 13.63 об.% бутанола-1, 85.89 об.% 20 мМ фосфатного буферного раствора, рН 6.99. 1 – витамин D₃, 2 – токоферол, 3 – витамин Е, 4 – витамин К₁, 5 – витамин А [110].

Возможности МЭЖХ для анализа лекарственных веществ в высокогидрофобной фармацевтической матрице была продемонстрирована на примере определения парацетамола и пяти его примесей в свечах [111]. Авторы отметили хорошую воспроизводимость предложенной методики, а также значительное сокращение времени пробоподготовки. Применение градиентного элюирования в варианте МЭЖХ позволило сократить время анализа до 7 минут, при этом отмечено высокое разрешение пиков и относительно высокая эффективность.

Одним из недостатков использования микроэмульсий в качестве подвижных фаз является высокое давление в хроматографической системе, обусловленное высокой вязкостью микроэмульсий. Наиболее перспективным вариантом снижения давления является использование монолитных неподвижных фаз. Данный тип сорбентов уже успел хорошо зарекомендовать себя в различных областях хроматографии. Благодаря уникальной макропористой структуре данных сорбентов возможно осуществлять высоко экспрессное и эффективное разделение широкого

круга соединений. В работе [112] проводили анализ тестовой смеси парабенов методом МЭЖХ с использованием стандартной обращенно-фазовой, а также монолитной колонки. Применение метода МЭЖХ в сочетании с монолитной колонкой позволило снизить давление в хроматографической системе в 3 раза при скорости потока элюента 4 мл/мин. Время анализа удалось сократить до 1 мин, при этом было достигнуто полное разделение всех пиков определяемых веществ.

Другие применения метода МЭЖХ представлены в табл. 3.

Таблица 3. Применение метода МЭЖХ для анализа фармацевтических, биологических образцов, пищевых продуктов.

Применение	Микроэмульсионная подвижная фаза	Литература
Определение коэффициентов гидрофобности logP органических веществ	3.0% ДДСН, 0.8% октанола-1, 6.0% бутанола-1, 90.2% деионизованной воды, рН 6.4	[113]
Консерванты в спредах	2.0% ДДСН, 0.6% н-гептана, 6.0% бутанола-1, 91.4% фосфатного буферного раствора, рН 3.0	[114]
Флавоноиды в экстракте листьев	1.2% Генапола X-080, 0.5% этилацетата, 2.5% бутанола-1, 95.8% 20 мМ фосфатного буферного раствора, рН 6.0	[115]
Определение эналаприла и гидрохлортиазида в лекарственных препаратах	0.2 М ДДСН, 1% октанола-1, 10% пропанола-1, 0.3% триэтиламина в 0.02 М растворе фосфорной кислоты, рН 3.5	[116]
Определение лоратадина и дезлоратадина в лекарственных препаратах	0.1 М ДДСН, 1% октанола-1, 10% пропанола-1, 0.3% триэтиламина в 0.02 М растворе фосфорной кислоты, рН 3.0	[117]

1.4.5. Микроэмульсии в других областях аналитической химии

В аналитической химии микроэмульсии получили широкое распространение в различных сепарационных методах, таких как капиллярный электрофорез и жидкостная хроматография, что было описано в предыдущих главах. В последнее время набирает популярность вариант тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием микроэмульсий в качестве подвижных фаз [118, 119]. В работе [120] метод микроэмульсионной ТСХ был успешно применен для оценки контроля содержания активных компонентов, идентификации и определения качественного состава солодки и других лекарственных трав. На рис. 20 продемонстрированы хроматограммы образцов растений в вариантах микроэмульсионной и классической ТСХ; определяемые компоненты представлены в виде ярких полос с высокой интенсивностью, позволяющих выявить различия композиционных особенностей образцов.

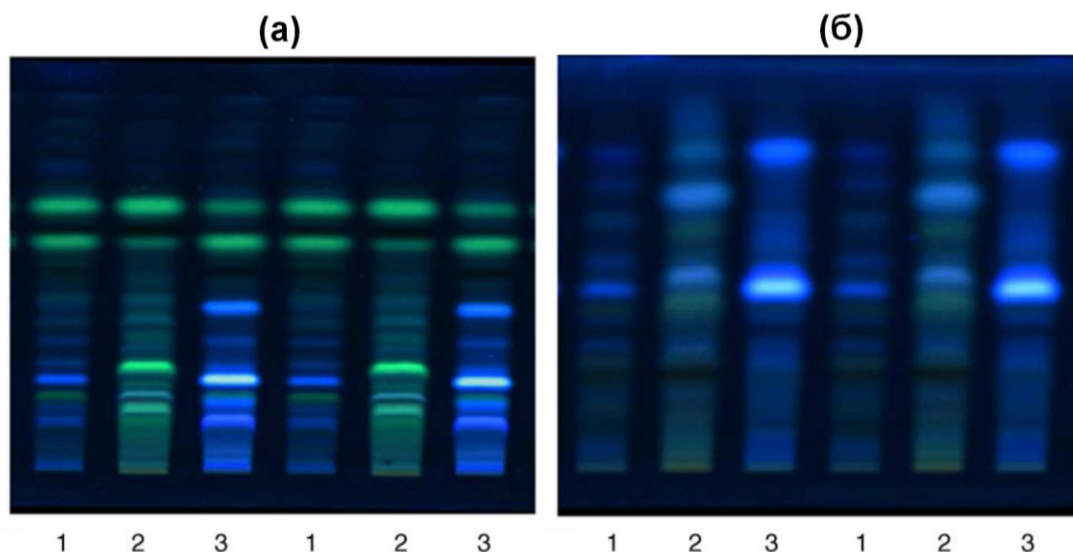


Рис. 20. Хроматограммы образцов экстракта солодки в вариантах микроэмульсионной (а) и классической (б) ТСХ. Виды солодки: 1 – *G. glabra*, 2 – *G. inflata*, 3 – *G. uralensis* [120].

Авторами отмечены преимущества метода микроэмульсионной ТСХ, такие как более высокое разрешение и лучшая воспроизводимость в сравнении с классическим

вариантом тонкослойной хроматографии, при этом механизмы разделения веществ значительно отличаются для обоих случаев.

Микроэмульсии нашли применение и в спектроскопических методах анализа в качестве растворителей в пробоподготовке, а также для увеличения интенсивности и сдвига максимумов длин волн поглощения, испускания или флуоресценции определяемых веществ.

В работе [121] проводили определение Fe, Cr и Cu в образцах использованных смазочных масел методом атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС) с электротермической ионизацией. Использование микроэмульсий позволило значительно упростить процедуру пробоподготовки и избежать использования токсичных органических растворителей.

В другой статье авторы отметили увеличение интенсивности флуоресценции белков в среде микроэмульсии на основе бис(2-этилгексил)сульфосукцината натрия [122]. Предложенный подход позволяет с высокой чувствительностью и низкими пределами обнаружения определять белки в пищевых продуктах.

1.5. Методы он-лайн концентрирования в капиллярном электрофорезе

Наряду с другими аналитическими методами капиллярный электрофорез обладает рядом преимуществ, таких как высокая эффективность, простота, экспрессность, минимальный расход растворителей. Одним из основных недостатков этого метода является низкая концентрационная чувствительность, связанная с малой длиной оптического пути (25-100 мкм) в варианте спектрофотометрического детектирования и небольшим объемом вводимой пробы (< 1% от общей длины капилляра ~ 2-10 нл) [123]. Капиллярный электрофорез в сочетании с УФ-детектированием характеризуется пределами обнаружения, как правило, в 30-100 раз выше, чем в ВЭЖХ, что ограничивает его использование при определении следовых количеств аналитов.

Увеличение чувствительности определения веществ в КЭ возможно за счет применения следующих подходов:

1. увеличение длины оптического пути (использование капилляров с различной геометрией – «bubble»-ячейка или Z-ячейка) [124];
2. использование высокочувствительных и селективных вариантов детектирования (детектор лазерно-индуцированной флуоресценции, масс-спектрометрический, амперометрический, электрохимический) [125, 126];
3. дериватизация определяемых веществ, способствующая увеличению их коэффициентов молярного поглощения [127];
4. предварительное (офф-лайн) сорбционное концентрирование определяемых компонентов [128].

Для значительного снижения пределов обнаружения зачастую используют различные варианты внутрикапиллярного (он-лайн) концентрирования, позволяющие в сотни и более раз увеличить чувствительность определения аналитов. Большинство способов он-лайн концентрирования основаны на гидродинамическом или электрокинетическом введении в капилляр большого объема пробы, сопровождающемся концентрированием определяемых веществ в виде узкой зоны перед началом разделения. В их основе лежит различие в скорости миграции в зоне пробы и рабочего буферного раствора, в то время как разделение веществ в капиллярном зонном электрофорезе происходит в гомогенном растворе, и электрофоретические подвижности аналитов остаются постоянными при наложении напряжения. Причиной изменения скорости миграции веществ при концентрировании является разница в электропроводности раствора пробы и фонового электролита или изменение их эффективного заряда [129]. Некоторые варианты концентрирования, такие как свипинг, основаны на хроматографическом принципе – скорость миграции варьируется в зависимости от степени взаимодействия аналита с псевдостационарной фазой.

Для количественной оценки степени концентрирования используется коэффициент концентрирования (SEF – sensitivity enhancement factor), рассчитываемый на основании высот пиков (SEF_{height}):

$$SEF_{height} = \frac{\text{высота пика, полученного при концентрировании}}{\text{высота пика, полученного при обычных условиях ввода пробы}} \cdot \Delta, \quad (4)$$

где Δ - коэффициент разбавления [130].

1.5.1. Стэкинг с усилением поля

Стэкинг с усилением поля является наиболее простым и широко используемым способом он-лайн концентрирования веществ. Однако коэффициенты концентрирования для этого метода являются небольшими (около 10), что связано с ограничением объема вводимой пробы. Стэкинг с усилением поля основан на различиях в электропроводности матрицы образца и рабочего буферного раствора, при этом ионная сила раствора образца должна быть значительно ниже, чем фонового электролита. Этот вариант концентрирования может быть реализован только для заряженных веществ (катионов или анионов) [131].

На рис. 21 представлена схема концентрирования определяемых компонентов для стэкинга с усилением поля.

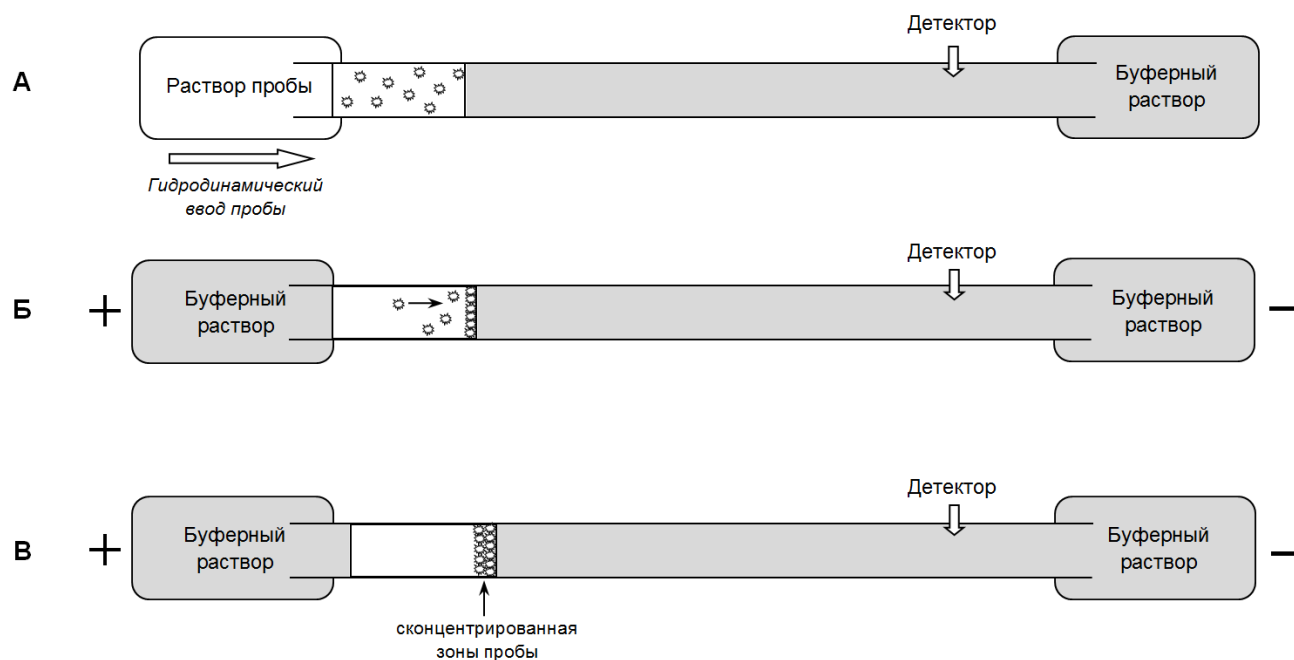


Рис. 21. Схема концентрирования аналитов в варианте стэкинга с усилением поля.

Пробу, растворенную в низкопроводящей матрице (воде), гидродинамически вводят в течение длительного времени с последующим наложением напряжения

(рис. 21А). В зоне пробы возникает высокое электрическое поле, и аналиты движутся с более высокой локальной скоростью (рис. 21Б). При достижении границы раздела зон образца и рабочего буферного раствора определяемые компоненты пробы резко замедляются, концентрируясь в виде узкой зоны (рис. 21В).

В качестве модификации рассматриваемого варианта он-лайн концентрирования в некоторых случаях используют стэкинг с усилением поля с водной пробкой или зоной органического растворителя, которые дополнительно вводят в капилляр перед зоной пробы [132]. По сравнению с обычным вариантом стэкинга эффективность этого подхода не ограничена объемом вводимой пробы, что и делает его более перспективным [26].

Стэкинг с усилением поля зачастую применяют в сочетании с предварительным офф-лайн концентрированием (твердофазной и жидкостно-жидкостной экстракцией) для предварительного обессоливания биологических объектов, что необходимо для снижения электропроводности матрицы образца [133].

1.5.2. Стэкинг с большим объемом образца

Стэкинг с большим объемом образца основан на концентрировании заряженных компонентов пробы, сопровождающемся электрокинетическим удалением матрицы образца. В отличие от стэкинга с усилением поля, для которого ограничением является ширина зоны вводимой пробы (до 30% от всего объема капилляра), в данном случае практически весь капилляр можно заполнить исследуемым раствором, что позволяет достичь более чем 100-кратного концентрирования определяемых веществ.

Для удаления матрицы образца возможно использование двух режимов стэкинга с большим объемом пробы – без переключения или с переключением полярности [134]. Второй вариант является наиболее распространенным и применяется в основном для концентрирования анионных компонентов пробы в низкопроводящей матрице (рис. 22).

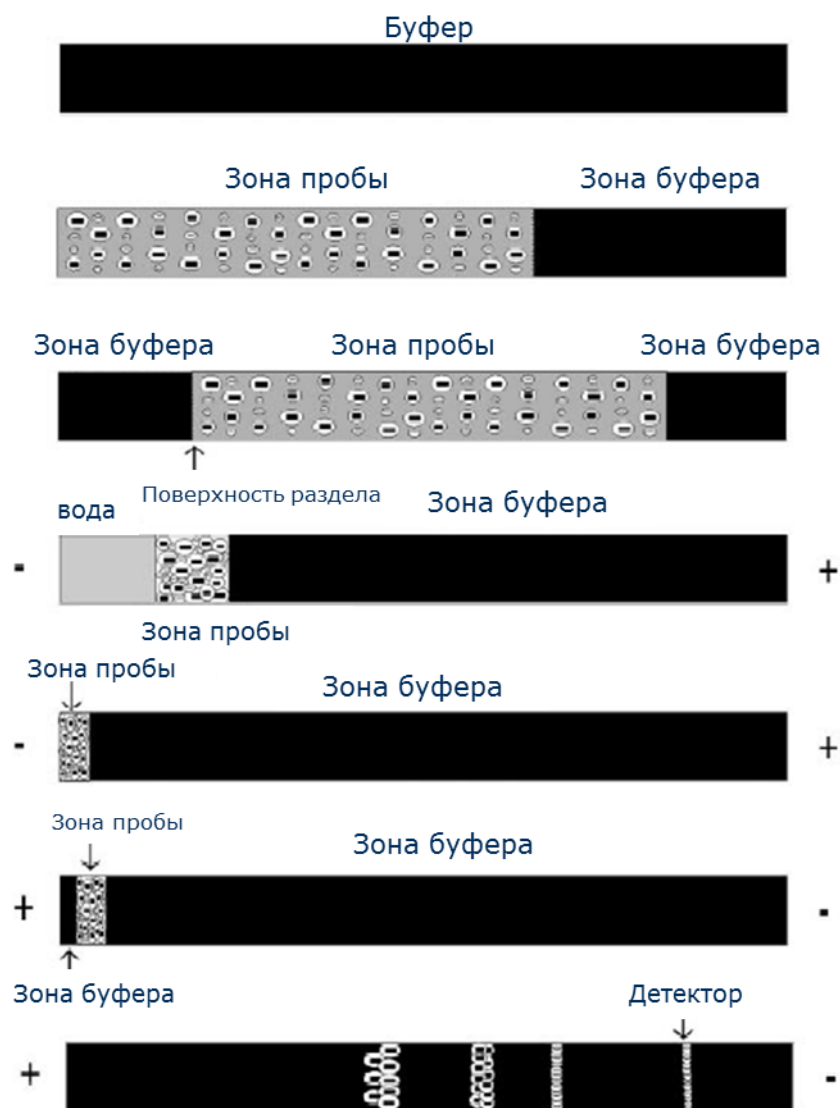


Рис. 22. Схема концентрирования аналитов в варианте стэкинга с большим объемом пробы и обращением полярности [135].

Фоновый электролит должен обладать высоким значением ЭОП, направленным к катоду. После ввода в капилляр достаточно большого объема пробы подается отрицательное напряжение, при этом капилляр с выходного конца постепенно заполняется раствором фонового электролита, в то время как анионные аналиты концентрируются на границе раздела фаз между зоной буферного раствора и зоной пробы. По мере заполнения капилляра фоновым электролитом, обладающим высокой электропроводностью, ток постепенно увеличивается, а матрица образца удаляется. При достижении 90-99% тока окончания процесса подачу напряжения отключают;

сконцентрированные анионы будут находиться в виде узкой зоны. Далее входной конец капилляра помещают в рабочий буферный раствор и подают положительное напряжение для разделения компонентов пробы.

Стэкинг с большим объемом образца в варианте без переключения полярности используют достаточно редко; этот вариант реализуется в условиях подавления ЭОП, обладающего противоположным направлением по сравнению с определяемыми компонентами, или когда электрофоретическая подвижность аналитов выше, чем электроосмотического потока [136].

Для концентрирования катионных аналитов обычно используют фоновые электролиты со специальными добавками для обращения ЭОП или капилляры, модифицированные нейтральными или катионными полимерами [137].

Стэкинг с большим объемом пробы нашел широкое применение при анализе фармацевтических препаратов и биологически активных молекул [138, 139]. Важно отметить, что данный способ позволяет сконцентрировать только анионы (или катионы) в течение одного анализа.

1.5.3. Электростэкинг

Стэкинг с усилением поля при вводе пробы, или *электростэкинг*, основан на электрокинетическом вводе в капилляр ионогенных компонентов пробы, растворенных в низкопроводящей матрице [140]. С использованием электростэкинга возможно с высокой степенью сконцентрировать только катионные или анионные аналиты, и при этом в большей степени – ионы с более высокой электрофоретической подвижностью. Зачастую для увеличения коэффициентов концентрирования перед электрокинетическим вводом пробы, как и в случае стэкинга с усилением поля, гидродинамически вводят зону воды или органического растворителя [141].

Различие методов стэкинга с усилением поля и электростэкинга заключается в том, что в первом случае стадия концентрирования аналита происходит после смены раствора пробы на входном конце капилляра на раствор фонового электролита в начале анализа. В варианте электростэкинга стадия концентрирования пробы происходит, когда входной конец капилляра помещен в раствор пробы, и приложено

напряжение на стадии ввода пробы (рис. 23). Заряженные компоненты быстро вводятся в капилляр и фокусируются на границе раздела фаз между водой и фоновым электролитом.

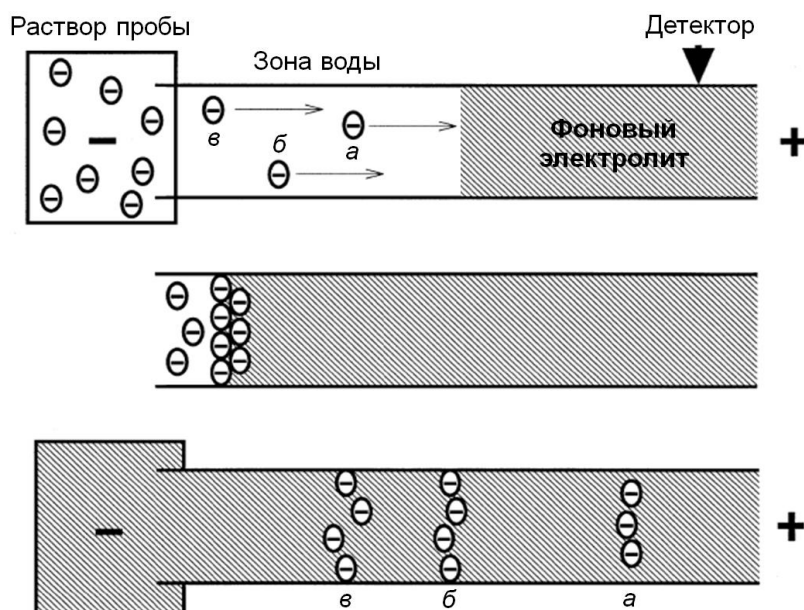


Рис. 23. Схема концентрирования аналитов в варианте электростэкинга [142].

Концентрация аналитов, введенных в капилляр в процессе электростэкинга, может быть значительно больше, чем в случае стэкинга с большим объемом образца, однако коэффициенты их концентрирования будут напрямую зависеть от их электрофоретической подвижности.

Электростэкинг является одним из наиболее эффективных вариантов концентрирования заряженных компонентов пробы, позволяющих добиться более чем 1000-кратного увеличения чувствительности. Однако этот способ имеет недостаток, обусловленный более низкой воспроизводимостью электрокинетического ввода пробы в сравнении с гидродинамическим. Одним из преимуществ электростэкинга является возможность селективного ввода ионогенных аналитов путем варьирования рН раствора пробы, что зачастую применяют для селективного ввода амфотерных веществ, например, белков или аминокислот [143].

1.5.4. Концентрирование с помощью изотахофореза

Если описанные ранее электрофоретические способы разделения веществ в капилляре были подобны элюентной хроматографии, для которой характерными являются прерывистый ввод проб, постоянный состав элюента, различные скорости движения компонентов пробы, то метод изотахофореза (ИТФ) аналогичен варианту вытеснительной хроматографии. В основе его лежит принцип, в соответствии с которым проба вводится между двумя электролитами с различной электропроводностью, которые выбираются таким образом, чтобы они ограничивали подвижности компонентов пробы. Как правило, ведущий электролит обладает максимальной, а замыкающий электролит – минимальной подвижностью из всех движущихся ионов. После достижения равновесия все одинаково заряженные ионы будут двигаться с одинаковыми скоростями. Внутри каждой зоны в состоянии равновесия напряженность поля постоянна, изменения происходят скачком на границах зон [144].

Метод ИТФ пригоден для разделения катионов или анионов. Используя детектор по электропроводности, получают ступенчатый сигнал. Принцип изотахофореза может быть использован в капиллярном электрофорезе для он-лайн концентрирования компонентов пробы. Этот вариант называют самоиндуцированный ИТФ, позволяющий достичь коэффициентов концентрирования около 100 [145]. Этот метод преимущественно применяют для разделения неорганических ионов или макромолекул (белков, ДНК) [146].

1.5.5. Динамический рН-скачок

Динамический рН-скачок представляет собой метод концентрирования, основанный на изменении ионного состояния определяемых веществ при различных значениях рН. Этот метод пригоден для концентрирования слабых кислот или оснований, а также цвиттерионных аналитов [147]. К примеру, для концентрирования слабой кислоты раствор пробы, обладающий низким значением рН, гидродинамически вводят в капилляр в виде широкой зоны, после чего входной конец

капилляра помещают в щелочной раствор фонового электролита и также вводят его гидродинамически. При наложении отрицательного напряжения (в режиме обращения полярности) кислотная зона пробы постепенно титруется гидроксид-ионами, мигрирующими с катодного конца капилляра, и определяемые компоненты пробы будут переходить в ионную форму. Отрицательно заряженные аналиты будут мигрировать в направлении анода но, вновь попадая в кислотную зону пробы, будут снова протонироваться, и их миграция приостановится. Таким образом, слабокислотные аналиты окажутся сконцентрированными в виде узкой зоны [129].

Динамический рН-скачок позволяет достичь коэффициентов концентрирования от нескольких десятков до нескольких тысяч. Этот вариант нашел применение для концентрирования аминокислот, биологически активных веществ, консервантов и других органических молекул [148, 149].

1.5.6. Сви́пинг

Сви́пинг представляет собой способ концентрирования нейтральных веществ, применяемый для методов МЭКХ или МЭЭКХ. Он представляет собой явление, при котором аналиты «собираются» псевдостационарной фазой (мицеллами или каплями микроэмульсии), проникающей в зону пробы [150]. Длину сконцентрированной зоны можно оценить по формуле:

$$l_{\text{сви́пинг}} = l_{\text{пробы}} \cdot \left(\frac{1}{1+k} \right), \quad (5)$$

где $l_{\text{пробы}}$ – длина зоны пробы, k – фактор удерживания, рассчитываемый как соотношение концентрации вещества, проникшего в мицеллу, к концентрации свободного аналита. Таким образом, очевидно, что для наиболее гидрофобных веществ характерны высокие коэффициенты концентрирования, до 5000. Для достижения высоких значений коэффициента k необходимо, чтобы раствор пробы не содержал добавок органических растворителей.

В отличие от рассматриваемых ранее вариантов стэкинга, где необходимым условием являлась более низкая электропроводность пробы по сравнению с фоновым электролитом, в случае сви́пинга проводимость обоих растворов должна быть

практически одинаковой. В работе [151] авторами отмечено повышение эффективности концентрирования лекарственного препарата нилутамида при добавлении солей в раствор пробы с целью увеличения его ионной силы.

Сви́пинг используют для концентрирования не только нейтральных веществ, но и ионогенных. При этом важно, чтобы аналит и мицеллы были противоположно заряжены. Например, некоторые органические амины могут быть сконцентрированы мицеллами на основе ДДСН при низких значениях рН раствора образца [152].

Помимо мицеллярных растворов или микроэмульсий в качестве фоновых электролитов возможно использование растворов с добавкой циклодекстринов, сви́пинг аналитов в этом случае также осуществляется за счет распределительного механизма [153].

* * *

Из проведенного анализа литературных данных можно сделать вывод, что, в отличие от широко используемого метода МЭЭКХ с применением микроэмульсий типа «масло в воде», метод микроэмульсионной электрокинетической хроматографии в варианте микроэмульсий «вода в масле» остается в настоящее время практически неизученным. Представляется интересным изучение особенностей использования такого рода фоновых электролитов в капиллярном электрофорезе. Уникальная природа В/М микроэмульсий открывает возможности использования этих фаз в пробоподготовке, а также в роли реакционных сред.

Глава 2. Аппаратура, материалы и техника эксперимента

2.1. Используемые реактивы

В работе использовали следующие реактивы: додецилсульфат натрия (содержание основного компонента $\geq 85\%$), бутанол-1 ($\geq 99.5\%$), пентанол-1 ($\geq 99\%$), октанол-1 ($\geq 99\%$), *n*-пентан ($\geq 99,5\%$), *n*-гептан ($\geq 99\%$), *n*-октан ($\geq 99\%$), циклогексан ($\geq 99,5\%$), гидроксид натрия ($\geq 98\%$), фосфорная кислота ($\geq 85\%$), гидрофосфат натрия моногидрат ($\geq 99.5\%$), дигидрофосфат натрия дигидрат ($\geq 98\%$), гидрофталат калия ($\geq 99\%$), сорбат калия ($\geq 99\%$), 4-аминобензойная кислота ($\geq 99\%$, все производства Ranгeас, Испания); тетраборат натрия десятиводный х.ч., бензол ос.ч., толуол ос.ч. (все Химмед, Россия); гексанол-1 ($\geq 99\%$), циклогексанол-1 ($\geq 99\%$), бис(2-этилгексил)сульфосукцинат натрия ($\geq 99\%$), (2-этилгексил)сульфат натрия (50 %-ный раствор), цетилтриметиламмония хлорид (25 %-ный раствор), цетилтриметиламмония бромид ($\geq 99\%$), цитрат натрия дигидрат ($\geq 99\%$), три(гидроксиметил)аминометан ($\geq 99,8\%$), этилбензол ($\geq 99\%$), пропилбензол ($\geq 98\%$), бутилбензол ($\geq 99\%$), гексилбензол ($\geq 97\%$), ампициллин ($\geq 96\%$), амоксициллин ($\geq 99\%$), флуоренилметилоксикарбонил хлорид ($\geq 97\%$, все Sigma-Aldrich, США); ацетат натрия ($\geq 99\%$), тиоцианат калия ($\geq 99\%$), йодид калия ($\geq 99\%$), бромид калия ($\geq 99\%$), нитрат натрия ($\geq 99\%$), нитрит натрия ($\geq 99\%$, все Merck, Германия); бензойная кислота ($\geq 99\%$, ZOCh, Польша); *n*-гексан ($\geq 99\%$, Компонент-Реактив, Россия); гептилсульфонат натрия х.ч., октилсульфонат натрия х.ч., нонилсульфонат натрия х.ч. (все НПФ «ДИА-ФАРМ», Россия); ацесульфам калия ($\geq 99\%$), сахарин ($\geq 97\%$), аспартам ($\geq 99\%$, все Fluka, Германия); 2,3-нафталиндиальдегид ($\geq 99\%$, Токуо Chemical Industry, Япония); гексаметилендиамин ($\geq 99,9\%$, BASF, Германия); деионизованная вода с сопротивлением не менее 18.2 МОм (Millipore, США). Все исследованные образцы лекарственных препаратов, а также продуктов питания были приобретены в магазинах г. Москва.

2.2. Аппаратура

Эксперименты проводили на следующих системах для капиллярного электрофореза:

Agilent 3DCE с диодно-матричным детектором, автосэмплером, системой контроля температуры в диапазоне $(15 - 60) \pm 0.1$ °C (Agilent Technologies, США). Электрофореграммы регистрировали с помощью персонального компьютера и программного пакета «3D-CE ChemStation Rev. A.10.02 [1757]» (Agilent Technologies, США).

Agilent 7100 с диодно-матричным детектором, автосэмплером, системой контроля температуры в диапазоне $(15 - 60) \pm 0.1$ °C (Agilent Technologies, США). Электрофореграммы регистрировали с помощью персонального компьютера и программного пакета «OpenLab CDS ChemStation Edition for CE & CE/MS Systems Rev. C.01.05[35]» (Agilent Technologies, США).

Кроме того, в работе использовали хроматографическую систему Agilent 1100, снабженную кварценом градиентным насосом, он-лайн дегазатором подвижной фазы, термостатом колонок, спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны и флюоресцентным детектором (Agilent Technologies, США).

В работе использовали кварцевые капилляры общей длиной 64.5, 48.5 и 33.5 см (эффективной длиной 56, 40 и 25 см, соответственно) и внутренним диаметром 50 или 75 мкм (Polymicro Technologies, Phoenix, USA), а также капилляр общей длиной 48.5 см (эффективной длиной 40 см), внутренним диаметром 75 мкм с увеличенной длиной оптического пути (Z-ячейка).

Для хроматографического анализа применяли колонку Synergi Hydro C18 250×4.6 мм (Phenomenex, США), а также универсальную предколонку для ВЭЖХ Security Guard C18 (Phenomenex, США).

Точные аликвоты веществ отбирали автоматическими дозаторами объемом 5-50, 20-200 и 100-1000 мкл с пределом допускаемой погрешности измерения не более $\pm 5\%$ (ЛАВМАТЕ, Польша).

Ультразвуковую обработку проводили с использованием ультразвуковой термостатируемой ванны (САПФИР, Россия).

Точные навески взвешивали на весах Explorer Pro (Ohaus Corporation, США), точность которых составляла 0.0001 г.

Для центрифугирования образцов использовали центрифугу CM-50 (Elmi, Латвия) с максимальной скоростью вращения 16 000 об./мин.

2.3. Способ приготовления микроэмульсий

2.3.1. Способ приготовления микроэмульсий типа «масло в воде»

1. Точную навеску ПАВ растворяли в необходимом количестве дистиллированной воды или буферного раствора и выдерживали в ультразвуковой ванне до его полного растворения.
2. К полученному раствору добавляли точно измеренное количество масла и тщательно перемешивали.
3. В полученную макроэмульсию вводили со-ПАВ и помещали смесь в ультразвуковую ванну на 5-10 минут до образования стабильной микроэмульсии.
4. При необходимости доводили рН микроэмульсии фосфорной кислотой или раствором гидроксида натрия.

2.3.2. Способ приготовления микроэмульсий типа «вода в масле»

1. Точную навеску ПАВ растворяли в необходимом количестве масла и выдерживали в ультразвуковой ванне.
2. К полученному раствору добавляли водный буферный раствор с известным значением рН и помещали смесь в ультразвуковую ванну на 5-10 минут до образования стабильной микроэмульсии.

2.4. Пробоподготовка образцов продуктов питания

2.4.1. Способ пробоподготовки образцов куриных яиц

Навеску предварительно гомогенизированного куриного яйца (белок + желток) массой 0.2 г смешивали с 0.8 мл ацетонитрила и тщательно перемешивали, полученную смесь помещали в ультразвуковую ванну на 3 мин. Смесь разбавляли деионизованной водой в 10 раз, после центрифугировали в течение 3 мин. Надосадочную жидкость отбирали для последующего анализа.

При анализе белка и желтка по отдельности пробоподготовка для каждого случая была аналогичной описанной выше.

2.4.2. Способ пробоподготовки образцов морской капусты

1) Пробоподготовка свежей морской капусты

Навеску морской капусты массой 0.5 г измельчали в ступке, затем добавляли 10 мл деионизованной воды. Полученную смесь помещали в ультразвуковую ванну на 10 мин, после чего проводили центрифугирование в течение 3 мин. Надосадочную жидкость отбирали для последующего анализа.

2) Пробоподготовка высушенной морской капусты

Образец морской капусты предварительно высушивали при температуре 110° С в течение 2 часов до постоянной массы. Точную навеску 0.2 г высушенного образца тщательно измельчали в ступке, затем добавляли 10 мл деионизованной воды. Полученную смесь помещали в ультразвуковую ванну, после чего центрифугировали при 16000 об./мин в течение 3 мин. Экстракт отбирали для последующего анализа.

2.4.3. Способ пробоподготовки образцов майонеза

Точную навеску майонеза массой 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 или 0.2 г растворяли в 1 мл обратной микроэмульсии (В/М) в ультразвуковой ванне в течение 2 мин до получения оптически прозрачного раствора.

2.5. Пробоподготовка образцов лекарственных препаратов

2.5.1. Способ пробоподготовки лекарственного препарата «Ацикловир» в мазевой форме (5%)

0.01 г мази растворяли в 50 мл бутанола-1 или В/М микроэмульсии, полученную смесь помещали в ультразвуковую ванну в течение 10 мин до полного растворения образца мази.

2.5.2. Способ пробоподготовки лекарственного препарата «Д-пантенол» в мазевой форме (5%)

0.02 г мази растворяли в 1 мл экстрагента, полученную смесь помещали в ультразвуковую ванну в течение 10 мин. В вариантах пробоподготовки с использованием в качестве экстрагентов воды, метанола, а также микроэмульсии М/В для отделения экстракта от нерастворенной мази проводили дополнительное центрифугирование при 16000 об./мин. в течение 5 мин, после чего отбирали фазу, содержащую определяемый компонент для последующего анализа.

2.6. Пробоподготовка образцов мочи

В исследуемый образец мочи вводили добавку ампициллина и амоксициллина с концентрацией 30 мг/л для каждого антибиотика. Далее пробу объемом 1 мл смешивали с этанолом объемом 2 мл, полученную смесь центрифугировали в течение 5 мин со скоростью 10000 об./мин. Для последующего анализа отбирали надосадочную жидкость объемом 100 мкл и разбавляли деионизованной водой объемом 900 мкл.

Глава 3. Характеристика В/М микроэмульсий как фоновых электролитов в капиллярном электрофорезе

3.1. Оценка применимости метода В/М МЭЭКХ

Оценка применимости метода МЭЭКХ с использованием микроэмульсий типа «вода в масле» проведена для смесей веществ различной полярности. Для начала проводили определение гидрофобных веществ неионогенной природы, форма существования которых в растворе не зависит от рН фонового электролита. В качестве исследуемой смеси выбрана смесь бензола и пяти алкилбензолов. Для сравнения эти вещества определяли также методом МЭЭКХ с использованием микроэмульсии типа «масло в воде» состава 3.3% ДДСН, 0.8% *n*-гептана, 8.0% бутанола-1, 87.9% 10 мМ боратного буферного раствора (рН 9.3). Электрофореграммы, полученные двумя методами, представлены на рис. 24.

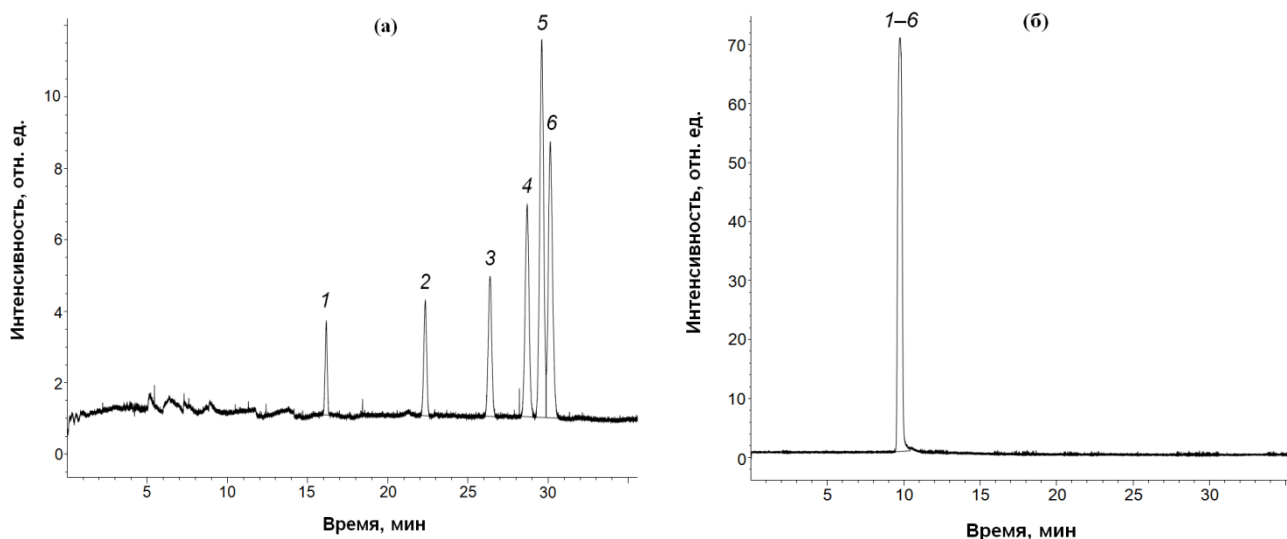


Рис. 24. Электрофореграммы модельной смеси бензола и алкилбензолов ($c = 100$ мг/л) методом МЭЭКХ в вариантах М/В (а) и В/М (б), с фоновым электролитом 3.3% ДДСН, 0.8% *n*-гептана, 8.0% бутанола-1, 87.9% 10 мМ боратного буферного раствора (рН 9.3) (а) и 5% ДДСН, 80% бутанола-1, 15% 70 мМ фосфатного буферного раствора (рН 7.0) (б). 1 – бензол, 2 – толуол, 3 – этилбензол, 4 – пропилбензол, 5 – бутилбензол, 6 – гексилбензол. Условия разделения: ввод пробы гидродинамический (25 мбар/10 сек); напряжение +10 кВ (а), -30 кВ (б); 25° С; детектирование при 210 нм.

Видно, что смесь гидрофобных веществ удалось разделить только в случае МЭЭКХ с использованием прямых микроэмульсий. В этом варианте электрофореза разделение гидрофобных компонентов основано на распределении веществ между неполярной фазой масла и полярной водной фазой. С увеличением гидрофобности аналитов увеличивается их сродство к каплям масла за счет дисперсионных взаимодействий и, как следствие, уменьшается их электрофоретическая подвижность. В варианте В/М МЭЭКХ смесь веществ разделить не удалось, все аналиты обладают одинаковой электрофоретической подвижностью.

Подвижность гидрофобных аналитов в этом варианте МЭЭКХ обусловлена, по-видимому, движением веществ вместе с электроосмотическим потоком в направлении анода. Величина тока составляет порядка 10 мкА при приложенном напряжении -30 кВ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что гидрофобные вещества, имеющие сродство к неполярной органической фазе, преимущественно находятся в бутаноле-1, при этом не проникая в более полярную фазу капель. Таким образом, метод В/М МЭЭКХ с использованием микроэмульсии исследуемого состава, по-видимому, мало пригоден для разделения смесей гидрофобных веществ одного гомологического ряда. В литературе описаны примеры разделения гидрофобных веществ с близкими коэффициентами гидрофобности в этом варианте МЭЭКХ, однако определяемые вещества имели в своем составе различные функциональные группы, способные вступать в специфические взаимодействия с полярными микроэмульсионными каплями [86].

Метод В/М МЭЭКХ использовали для разделения смесей гидрофильных веществ как нейтрального, так и ионогенного характера. На рис. 25 представлена электрофореграмма модельной смеси неорганических анионов, полярных органических кислот и пропиленбензола.

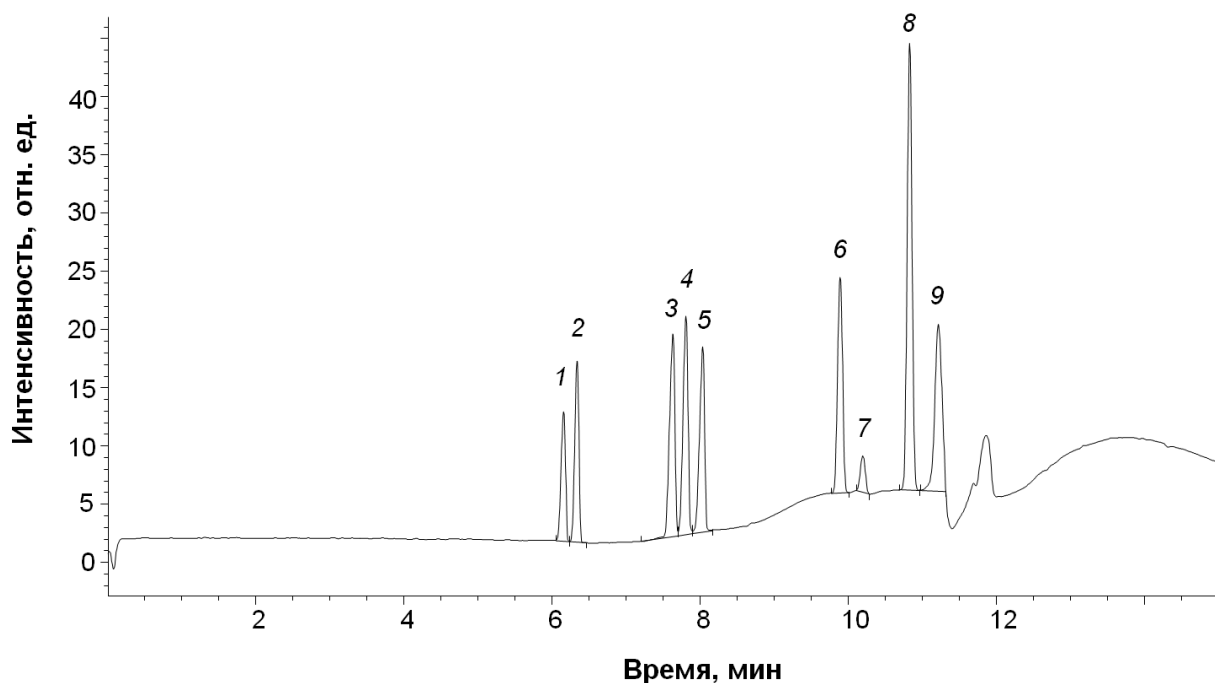


Рис. 25. Электрофореграмма модельной смеси неорганических анионов, органических кислот и пропилбензола ($c = 50$ мг/л) с микроэмульсией типа В/М (5% ДДСН, 80% бутанола-1, 15% 70 мМ фосфатного буферного раствора, рН 7.0). 1 – тиоцианат, 2 – йодид, 3 – бромид, 4 – нитрат, 5 – нитрит, 6 – бензойная кислота, 7 – сорбиновая кислота, 8 – 4-аминобензойная кислота, 9 – пропилбензол. Условия разделения: детектирование при 200 нм; остальные условия указаны в подписи к рис. 24б.

Показано, что метод В/М МЭЭКХ пригоден для определения полярных веществ не только органической, но и неорганической природы. Разделение нейтральных гидрофильных веществ основано на их распределении между органической фазой бутанола-1 и полярными водными каплями. Можно предположить, что в случае смеси веществ ионогенного характера разделение аналитов основано как на различии в собственной подвижности ионов, так и распределении веществ между каплями и органической фазой.

3.2. Влияние состава В/М микроэмульсий на селективность разделения неорганических анионов

Микроэмульсии, используемые в качестве фоновых электролитов в капиллярном электрофорезе, состоят из многих компонентов, тип и концентрация которых могут в значительной степени влиять на селективность и эффективность разделения веществ. Влияние состава В/М микроэмульсий на времена миграции определяемых веществ рассмотрено на примере модельной смеси пяти неорганических анионов (тиоцианат-, йодид-, бромид-, нитрат- и нитрит-ионов). Данные вещества имеют сильное поглощение в УФ области спектра и могут быть определены в варианте спектрофотометрического детектирования. Кроме того, рассмотрено влияние температуры и напряжения на разделение аналитов.

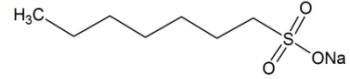
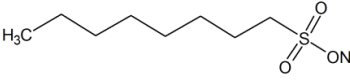
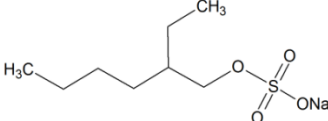
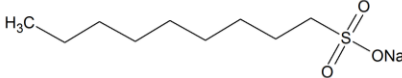
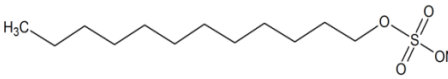
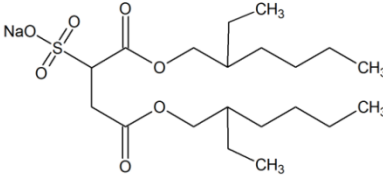
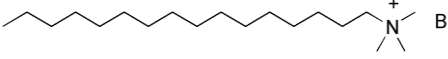
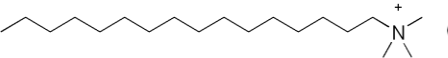
3.2.1. Тип и концентрация ПАВ

Тип и концентрация ПАВ в составе микроэмульсии может влиять на разделение веществ в варианте МЭЭКХ за счет изменения заряда и размера капель, направление и величину ЭОП, а также ион-парных взаимодействий между аналитами и микроэмульсионными каплями. В методе В/М МЭЭКХ обычно используют анионные поверхностно-активные вещества для определения нейтральных и анионных веществ, в этом случае разделение проводят в варианте с обращением полярности; в работе также исследовали микроэмульсии на основе двух катионных ПАВ. Додecilсульфат натрия (ДДСН) – наиболее часто используемое ПАВ в составе как прямых, так и обратных микроэмульсий. Структуры исследуемых ПАВ с разной длиной углеродного хвоста представлены в табл. 4.

При использовании в качестве фоновых электролитов микроэмульсий на основе катионных ПАВ (ЦТАБ и ЦТАХ) наблюдали уменьшение тока в капилляре с 12 до 5 μA с пятой минуты анализа. Падение тока сопровождалось увеличением шума базовой линии, при этом определяемые вещества детектировать не удалось в обоих режимах полярностей электродов. Вероятно, полученные результаты могут быть обусловлены окислительно-восстановительными процессами молекул ПАВ при

наложении высокого напряжения (30 кВ), что приводит к нестабильности фонового электролита и разрушению микроэмульсионных капель.

Таблица 4. Структуры и молярные массы исследуемых ПАВ.

Название ПАВ	Сокращение	Молекулярная формула	Структура	М, г/моль
<i>Анионные ПАВ</i>				
Гептилсульфонат натрия	ГСН	$C_7H_{15}SO_3Na$		202
Октилсульфонат натрия	ОСН	$C_8H_{17}SO_3Na$		216
(2-этилгексил)-сульфат натрия	ЭГСН	$C_8H_{17}SO_4Na$		232
Нонилсульфонат натрия	НСН	$C_9H_{19}SO_3Na$		230
Додецилсульфат натрия	ДСН	$C_{12}H_{25}SO_4Na$		288
Бис(2-этилгексил)-сульфосукцинат натрия (докузат натрия)	ДЗН	$C_{20}H_{37}SO_3Na$		444
<i>Катионные ПАВ</i>				
Цетилтриметил-аммония бромид	ЦТАБ	$C_{19}H_{42}NBr$		364
Цетилтриметил-аммония хлорид	ЦТАХ	$C_{19}H_{42}NCl$		320

В/М микроэмульсии на основе анионных ПАВ оказались более устойчивыми при наложении электрического поля, зависимость времен миграции определяемых веществ от типа ПАВ в составе обратной микроэмульсии представлена на рис. 26.

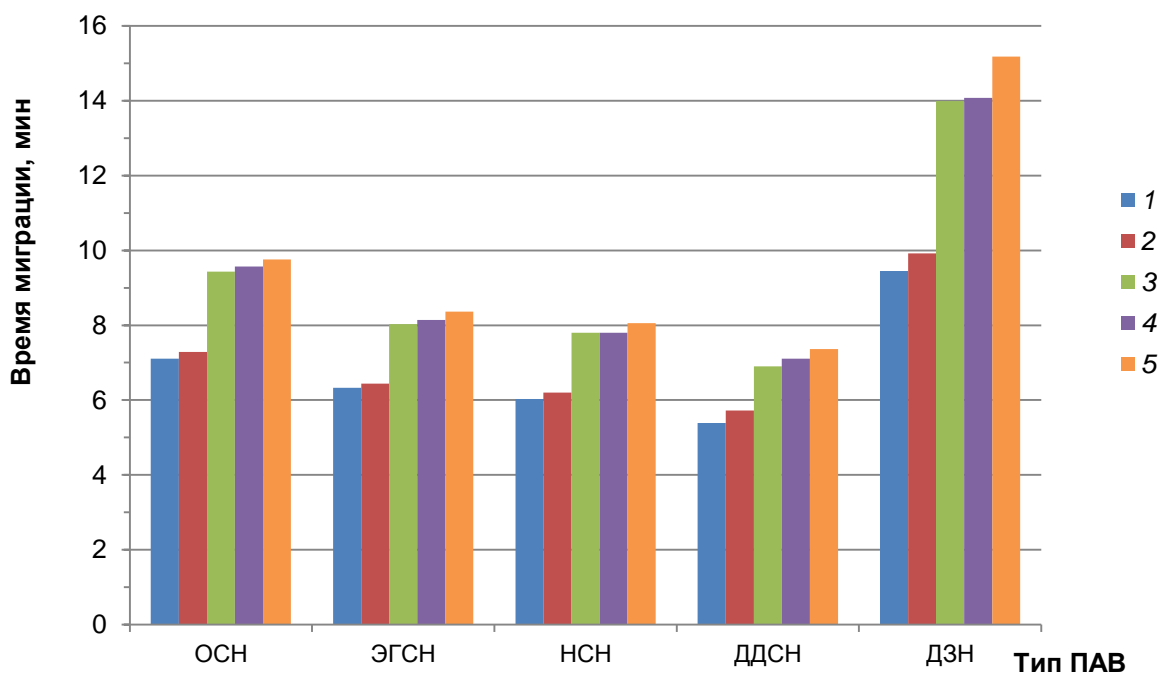


Рис. 26. Зависимость времен миграции неорганических анионов от типа анионного ПАВ в методе В/М МЭЭКХ. 1 – тиоцианат, 2 – йодид, 3 – бромид, 4 – нитрат, 5 – нитрит. Фоновый электролит: В/М МЭ состава 5% ПАВ, 80% бутанола-1, 15% 70 мМ фосфатного буферного раствора, рН 7.0.

Использование гептилсульфоната натрия (C_7) привело к высокому шуму базовой линии и плохому разделению веществ. Установлено, что увеличение длины углеродного радикала в составе ПАВ (от C_8 до C_{12}) приводит к снижению времен миграции анионов, в случае нонилсульфоната натрия (C_9) наблюдали наложение пиков нитрата и бромида. Использование ДДСН позволило добиться лучшего разрешения пиков всех анионов. Время анализа в варианте с бис(2-этилгексил)сульфосукцинатом натрия оказалось в 2 раза больше, чем в случае ДДСН, кроме того, наблюдалось наложение пиков бромида и нитрата. Таким образом, додецилсульфат натрия был выбран для дальнейших исследований.

Содержание ДДСН варьировали в диапазоне от 3 до 10% при неизменном содержании водной фазы микроэмульсии. Увеличение концентрации ДДСН способствует росту числа капель микроэмульсии и плотности их заряда. При этом

анионы сильнее отталкиваются от отрицательно заряженных капель, и основной вклад в электрофоретическую подвижность, вероятно, вносит их собственная миграция в направлении анода. Увеличение концентрации ПАВ приводит к замедлению миграции анионов и улучшению разрешения. Микроэмульсии с содержанием ПАВ 6% и выше оказались неустойчивыми и расслаивались через некоторое время (при постоянной концентрации водной фазы 15%). Таким образом, в качестве оптимальной была выбрана концентрация ДДСН 5%, при которой достигается разделение всех компонентов с лучшим разрешением пиков.

3.2.2. Тип и концентрация масла, дополнительная добавка органической фазы

В качестве неполярной органической фазы в составе обратных микроэмульсий обычно используют низкомолекулярные спирты, ограниченно смешивающиеся с водой. Найдено, что фоновые электролиты на основе пентанола-1, гексанола-1 и циклогексанола-1 при наложении электрического поля в кварцевом капилляре дают высокий шум базовой линии и низкое разрешение пиков определяемых веществ, использование же октанола-1 приводит к расслаиванию водной и органической фаз. Установлено, что стабильную микроэмульсию образует только бутанол-1. В сравнении с другими спиртами он обладает меньшей вязкостью и более высокой проводимостью, что соответствует достаточному значению тока в капилляре. Разделение анионов с использованием микроэмульсии на основе бутанола-1 позволяет добиться хорошего разрешения пиков при низких временах миграции.

Содержание бутанола-1 варьировали в диапазоне от 60 до 85% при неизменном соотношении водной фазы и ПАВ (3:1, мас.). При увеличении концентрации бутанола-1, по-видимому, происходит уменьшение числа капель микроэмульсии и, как следствие, снижение ЭОП и тока в капилляре. Снижение величины ЭОП приводит к замедлению миграции всех определяемых анионов. При содержании бутанола-1 меньше 80% наблюдали перекрытие пиков бромидов и нитратов (рис. 27). Таким образом, в качестве оптимальной была выбрана концентрация органической фазы 80%.

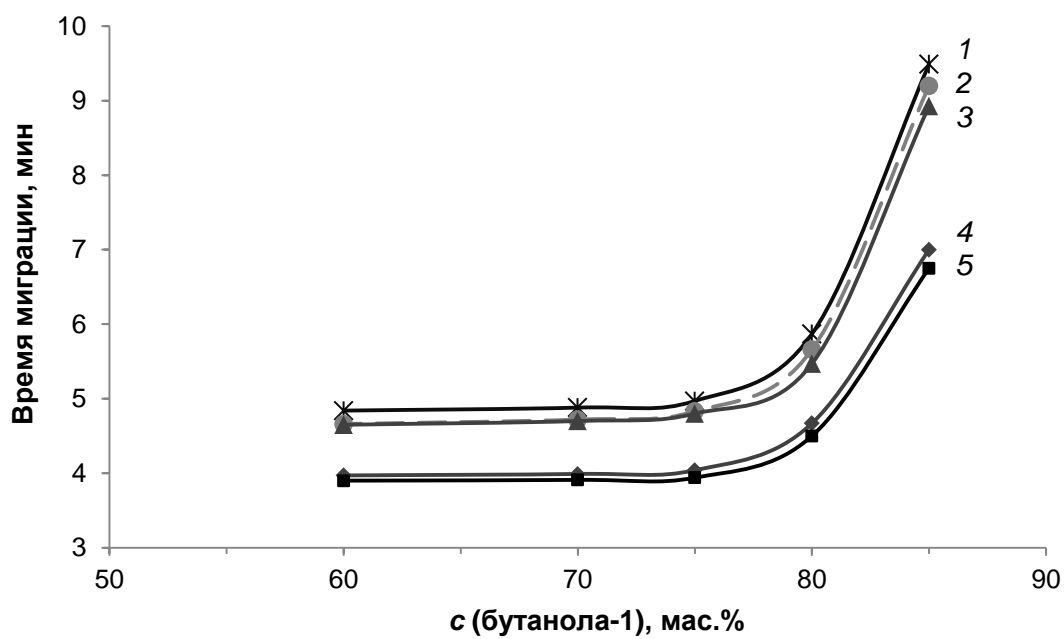


Рис. 27. Влияние содержания бутанола-1 на времена миграции неорганических анионов. 1 – нитрит, 2 – нитрат, 3 – бромид, 4 – йодид, 5 – тиоцианат.

Добавление различных н-алканов с концентрацией 2 мас.% (н-пентана, н-гексана, н-гептана, н-октана, циклогексана) в микроэмульсию состава 78 мас.% бутанола-1, 5 мас.% ДДСН, 15 мас.% 70 мМ фосфатного буферного раствора не оказало влияния на времена миграции и разрешение пиков. Таким образом, в использовании дополнительной добавки второго органического растворителя нет необходимости.

3.2.3. Содержание водной фазы, тип и концентрация буферного раствора

Содержание водной фазы, при котором образуется стабильная микроэмульсия, варьировали в диапазоне от 10 до 15% (при постоянной концентрации ДДСН 5%). Увеличение концентрации водной фазы привело к повышению скорости миграции аналитов и улучшению разрешения (рис. 28).

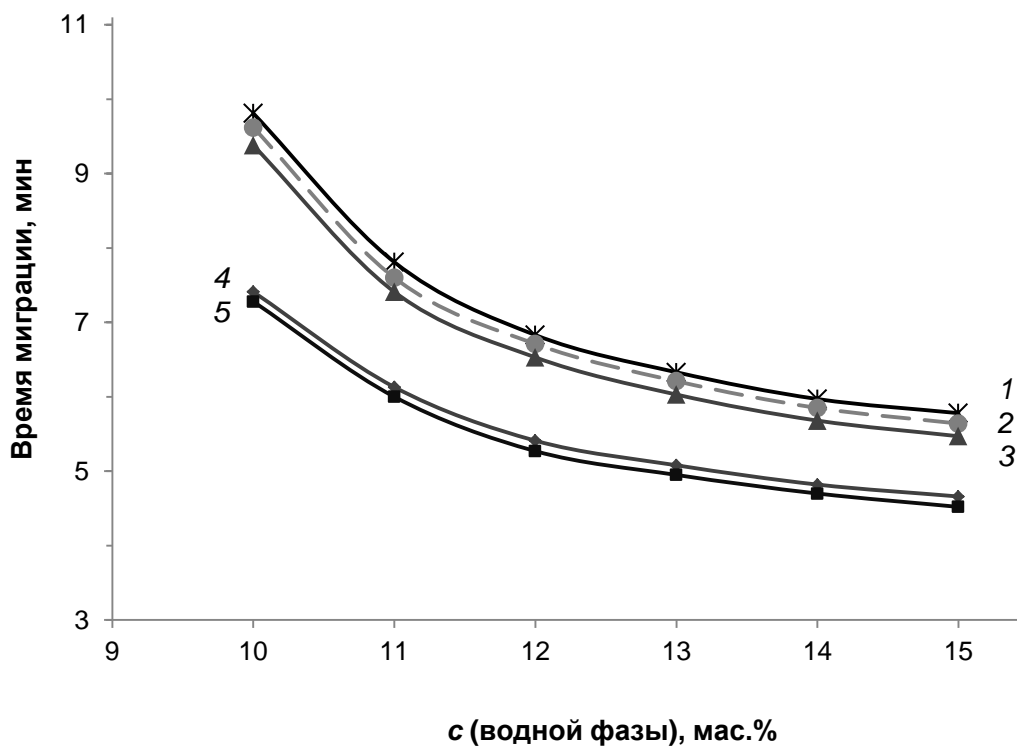


Рис. 28. Влияние содержания водной фазы на времена миграции неорганических анионов. 1 – нитрит, 2 – нитрат, 3 – бромид, 4 – йодид, 5 – тиоцианат.

Тип и концентрация водных буферных растворов играет важную роль в дисперсии фаз микроэмульсионной системы [51]. Рассмотрено влияние различных типов буферных растворов (ацетатного, боратного, гидрофталатного, фосфатного, цитратного, ТРИС) с рН 7.0 на разделение аналитов. Гидрофталатный буферный раствор в составе обратной микроэмульсии дает высокий шум базовой линии, в то время как при использовании других буферных растворов достигается достаточное значение тока с более высокой чувствительностью. Фосфатный и ацетатный буферные растворы показали полное разделение всех пиков определяемых анионов.

При увеличении концентрации фосфатного буферного раствора от 20 до 70 мМ времена миграции анионов практически не изменились, при этом наблюдалось незначительное улучшение разрешения пиков (рис. 29). Кроме того, уменьшение концентрации буферного раствора привело к увеличению шума базовой линии. Таким образом, 70 мМ фосфатный буферный раствор был выбран для дальнейших экспериментов.

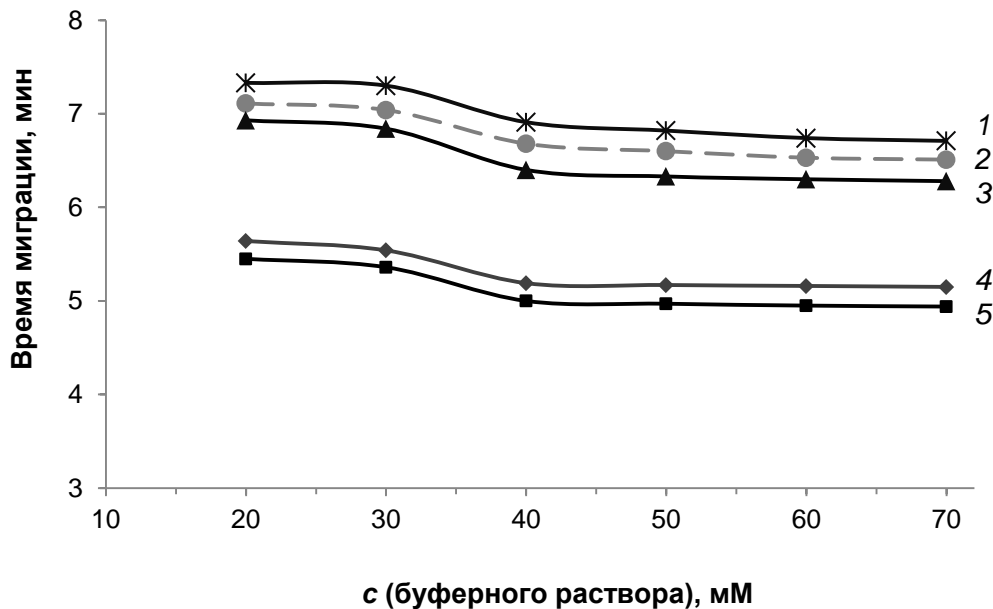


Рис. 29. Влияние концентрации фосфатного буферного раствора на времена миграции неорганических анионов. 1 – нитрит, 2 – нитрат, 3 – бромид, 4 – йодид, 5 – тиоцианат.

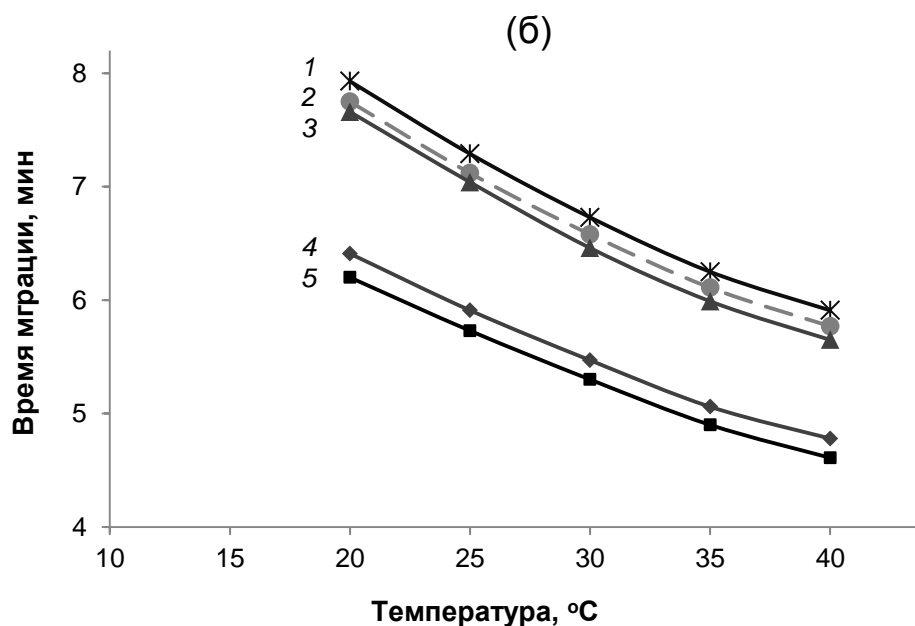
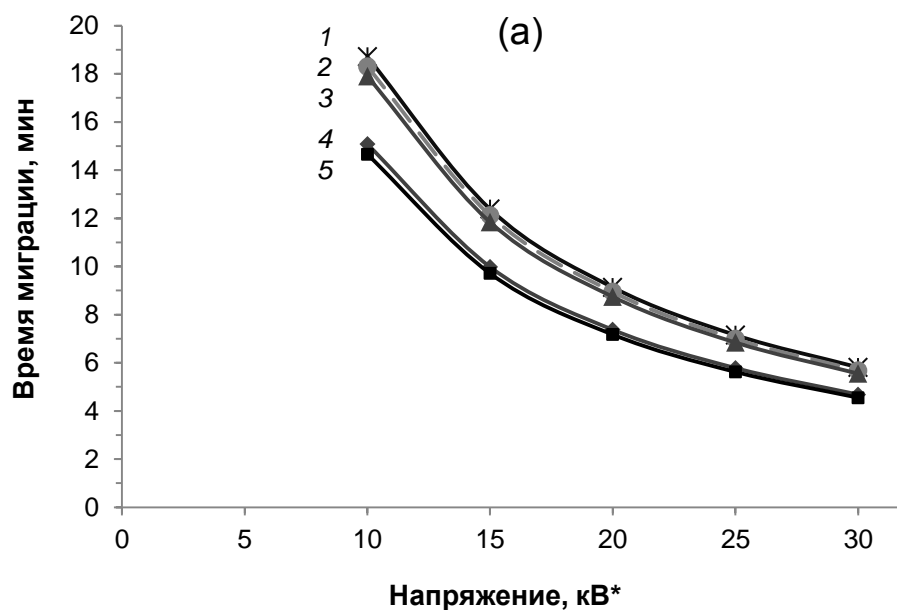
3.2.4. Варьирование рН микроэмульсии

Рассмотрено влияние рН водной фазы микроэмульсии на времена миграции анионов. Значение рН фосфатного буферного раствора в составе В/М микроэмульсии варьировали в диапазоне от 3.0 до 8.0.

Использование в качестве фоновых электролитов микроэмульсий со значениями рН водной фазы 6.0 и ниже привело к ухудшению разрешения и перекрытию пиков нитрата и нитрита. В качестве оптимального выбрано значение рН 7.0, при котором наблюдалось наилучшее разрешение всех пиков определяемых анионов.

3.2.5. Варьирование напряжения и температуры

Зависимость приложенного напряжения и температуры термостатирования на селективность разделения анионов представлено на рис. 30.



* - напряжение в режиме с обращением полярности электродов

Рис. 30. Влияние напряжения (а) и температуры (б) на времена миграции неорганических анионов. 1 – нитрит, 2 – нитрат, 3 – бромид, 4 – йодид, 5 – тиоцианат.

Повышение напряжения приводит к ускорению миграции и улучшению разрешения пиков всех определяемых веществ. Влияние температуры носит аналогичный характер. Высокие температуры способствуют снижению вязкости

микроэмульсии и, как следствие, уменьшению времен миграции. Температура термостатирования в течение анализа может влиять на растворимость аналитов и их взаимодействие с микроэмульсионными каплями. Для экспрессного анализа с хорошим разрешением пиков были выбраны оптимальные значения температуры 40 °С и напряжения 30 кВ (в варианте с обращением полярности).

На рис. 31 представлена электрофореграмма модельной смеси анионов в варианте В/М МЭЭКХ при оптимальных условиях разделения.

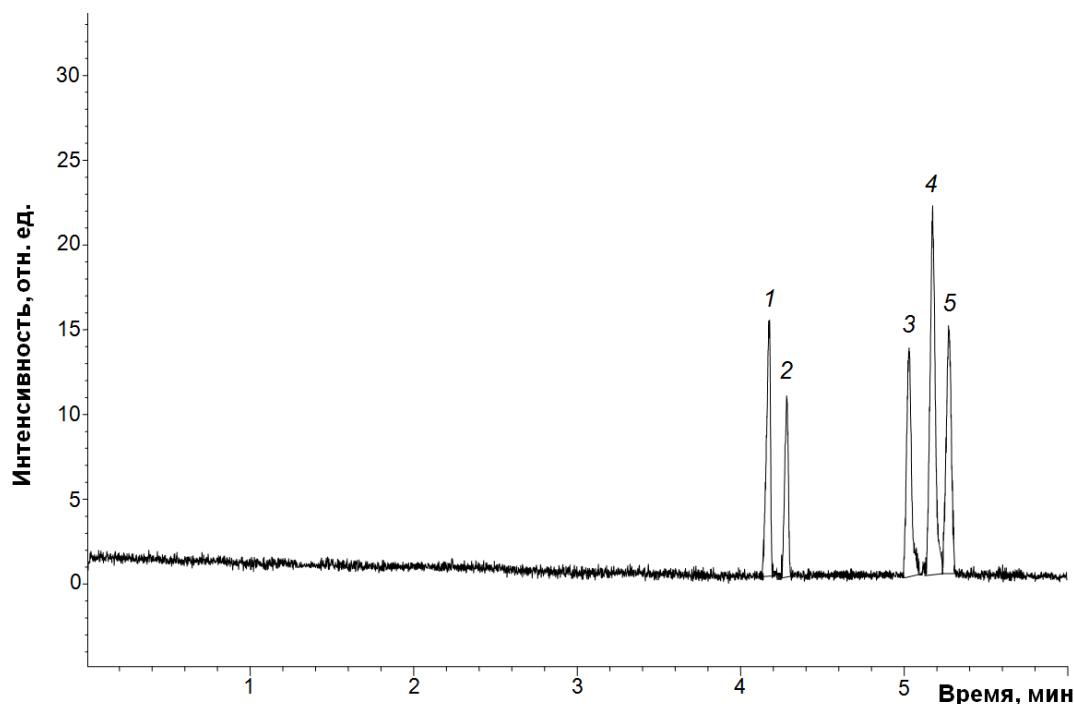


Рис. 31. Электрофореграмма модельной смеси неорганических анионов ($c = 25$ мг/л) в варианте В/М МЭЭКХ. Фоновый электролит: В/М микроэмульсия состава 5% ДДСН, 80% бутанола-1, 15% 70 мМ фосфатного буферного раствора, рН 7.0. 1 – тиоцианат, 2 – йодид, 3 – бромид, 4 – нитрат, 5 – нитрит. Ввод пробы гидродинамический: 50 мбар в течение 10 сек. Условия разделения: кварцевый капилляр общей длиной 33.5 см (эффективной длиной 25 см) и диаметром 50 мкм, напряжение -30 кВ, детектирование при 200 нм.

3.3. Сравнение электрофоретических подвижностей анионов в методе В/М МЭЭКХ и других вариантах капиллярного электрофореза

Механизм разделения аналитов в варианте МЭЭКХ с использованием микроэмульсий типа «вода в масле» является сложным и на данный момент не доказанным. Для изучения характера миграции заряженных аналитов было проведено сравнение электрофоретических подвижностей неорганических анионов, определенных в различных вариантах капиллярного электрофореза: классический КЗЭ, М/В МЭЭКХ и В/М МЭЭКХ. В первом случае в качестве фонового электролита использовали 70 мМ фосфатный водный буферный раствор, рН 7.0. Вариант М/В МЭЭКХ отличался от КЗЭ добавлением органической фазы и ПАВ, водная составляющая осталась идентичной: 3.3% ДДСН, 0.8% гептана, 8.0% бутанола-1, 87.9% 70 мМ фосфатного буферного раствора (рН 7.0). Для расчета электрофоретических подвижностей анионов в пробу добавляли маркер ЭОП – в обоих случаях использовали тиомочевину, представляющую собой полярное незаряженное вещество, не имеющее собственной электрофоретической подвижности и не взаимодействующее с каплями масла в случае МЭЭКХ. Помимо фоновых электролитов остальные условия электрофоретического разделения для обоих вариантов были одинаковыми (капилляр, температура, ввод пробы, рабочее напряжение). Определение анионов проводили в режиме обращения полярности, в этом случае направление ЭОП оказалось противоположно направлению миграции анионов, полученные электрофореграммы представлены на рис. 32. Электрофоретическую подвижность тиомочевины определяли в режиме положительной полярности.

Из полученных электрофореграмм видно, что лучшего разделения анионов удалось достичь в варианте М/В МЭЭКХ: пики, соответствующие бромид- и йодид-иону, разрешились практически полностью. Порядок миграции аналитов в обоих случаях оказался идентичным, что может свидетельствовать о незначительном вкладе микроэмульсионных капель в подвижность определяемых компонентов.

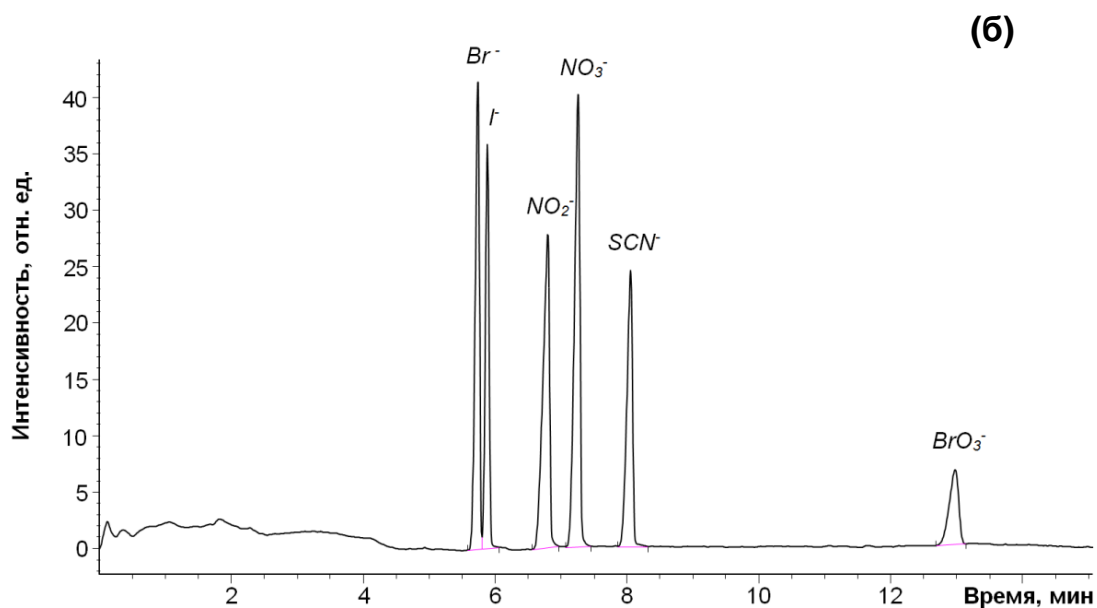
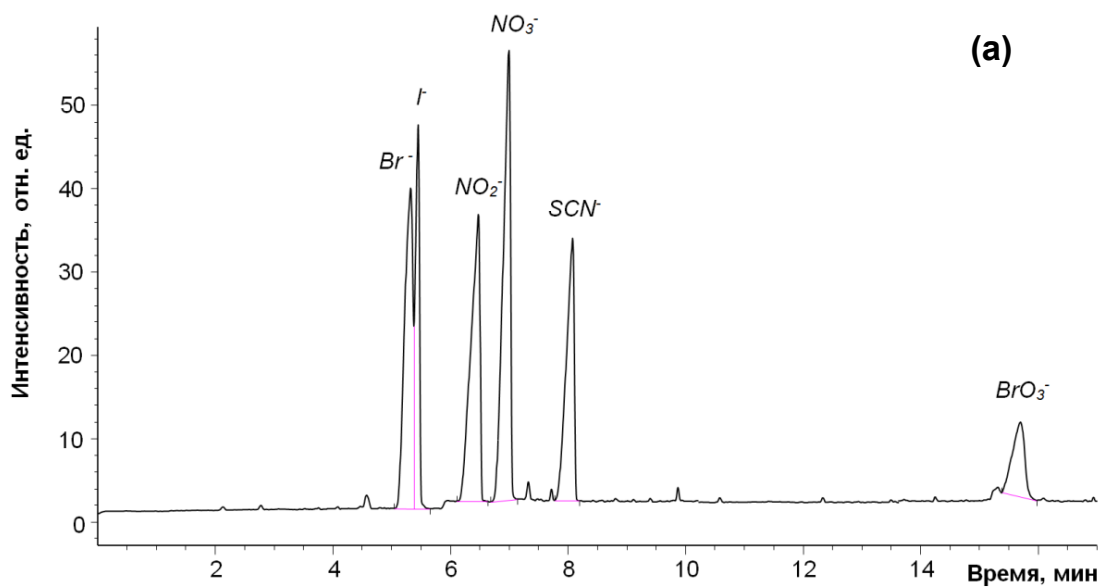


Рис. 32. Электрофореграммы модельной смеси неорганических анионов ($c = 50$ мг/л) в варианте КЗЭ (а) и М/В МЭЭКХ (б). Фоновый электролит: 70 мМ фосфатный буферный раствор, рН 7.0 (а) и 3.3% ДДСН, 0.8% гептана, 8.0% бутанола-1, 87.9% 70 мМ фосфатного буферного раствора, рН 7.0 (б). Условия разделения: капилляр общей длиной 41.5 см (эффективной длиной 33 см) и диаметром 50 мкм, ввод пробы: 50 мбар в течение 10 сек, напряжение -12 кВ, температура 25 °С, детектирование при 200 нм.

Для сравнения миграции анионов в различных вариантах капиллярного электрофореза исследуемые вещества были определены в варианте В/М МЭЭКХ, где водная фаза была та же, что и в двух предыдущих случаях. Фоновый электролит: 5% ДДСН, 80% бутанола-1, 15% 70 мМ фосфатного буферного раствора, рН 7.0. Для оценки влияния водных капель обратной микроэмульсии на электрофоретическую подвижность анионов проводили их определение при использовании в качестве фонового электролита только бутанола-1. В связи с его крайне низкой электропроводностью электроосмотический поток в капилляре практически отсутствовал, что очень сильно увеличивало время анализа. Для повышения проводимости фонового электролита к бутанолу-1 добавили ацетат натрия до образования насыщенного раствора; для отделения не растворившейся соли полученный раствор центрифугировали, надосадочную жидкость отбирали для дальнейшего использования.

Для расчета электрофоретических подвижностей в модельную смесь добавляли маркер ЭОП – пропилбензол. Это вещество нейтрально и достаточно гидрофобно, поэтому оно не обладает собственной подвижностью и не взаимодействует с полярными каплями водной фазы микроэмульсии в методе В/М МЭЭКХ. Определение как анионов, так и маркера ЭОП проводили в режиме обращенной полярности. Интересно, что в МЭЭКХ с использованием В/М микроэмульсий направление ЭОП к аноду оказывается противоположным по сравнению с потоком в вариантах КЗЭ и М/В МЭЭКХ. Можно предположить, что в этом случае электроосмотический поток возникает за счет движения направленных к аноду отрицательно заряженных капель микроэмульсии, увлекающих за собой в силу межмолекулярного сцепления всю массу жидкости в капилляре. При этом в практически неводной среде диссоциация силанольных групп стенок капилляра подавлена.

На рис. 33 представлены электрофореграммы анионов в варианте КЭ с использованием бутанола-1 в качестве фонового электролита, а также в варианте В/М МЭЭКХ. Видно, что добавление в фазу бутанола-1 водной составляющей не

оказывает влияние на порядок миграции анионов, однако значительно улучшает разрешение и форму пиков.

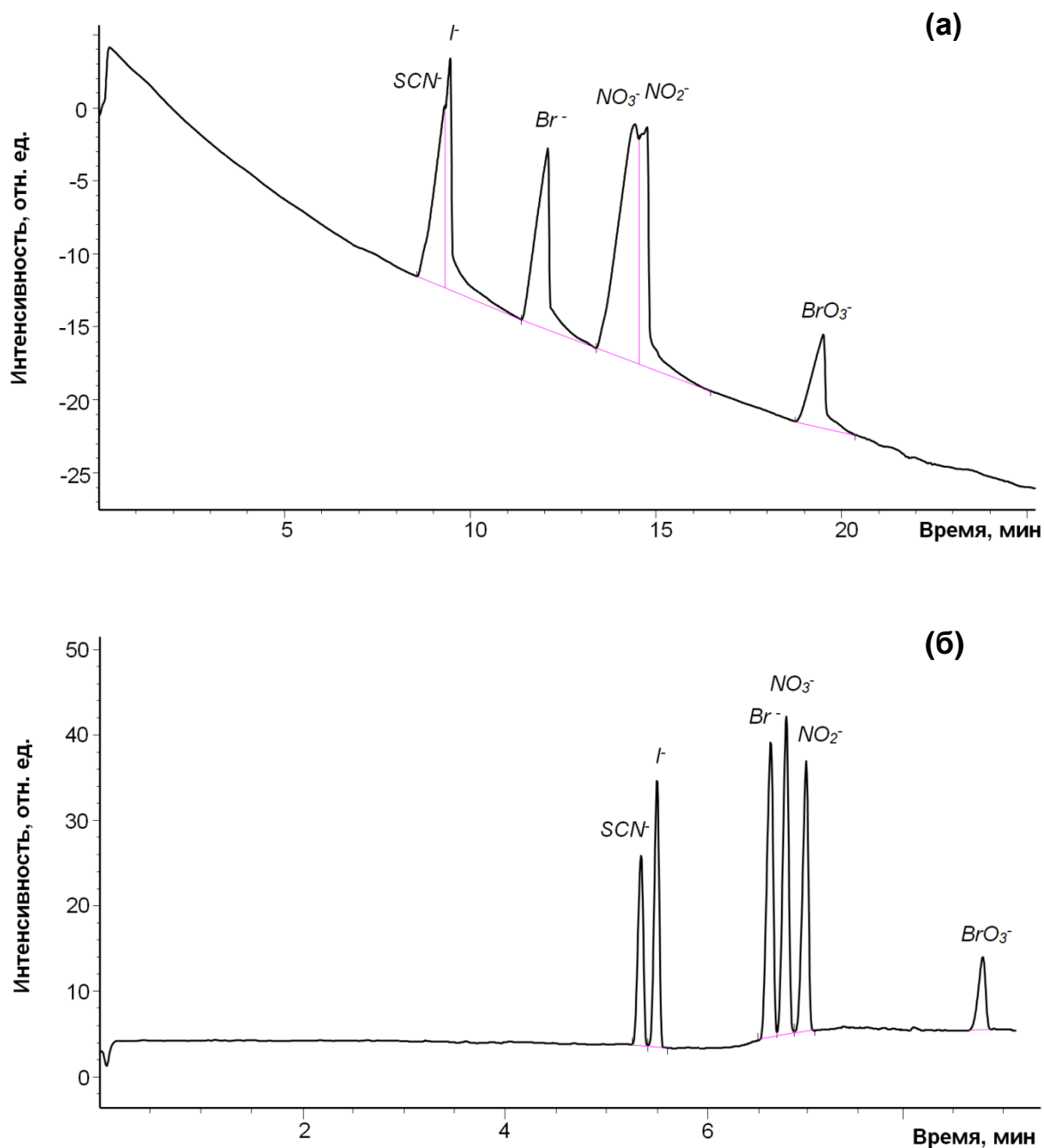


Рис. 33. Электрофореграммы модельной смеси неорганических анионов ($c = 50$ мг/л) при использовании бутанола-1 (а) и В/М МЭЭКХ (б). Фоновый электролит: насыщенный раствор ацетата натрия в бутаноле-1 (а) и 5% ДДСН, 80% бутанола-1, 15% 70 мМ фосфатного буферного раствора, рН 7.0 (б). Напряжение - 30 кВ. Остальные условия указаны в подписи к рис. 32.

Электрофоретические подвижности определяемых анионов для всех фоновых электролитов рассчитывали по формуле:

$$\mu_{эф} = \mu_{общ} - \mu_{ЭОП} = \frac{L_{общ} * L_{эф}}{t_m * U} - \frac{L_{общ} * L_{эф}}{t_{ЭОП} * U}, \quad (6)$$

где $L_{общ}$ и $L_{эф}$ – общая и эффективная длина капилляра соответственно, U – напряжение, t_m и $t_{ЭОП}$ – времена миграции аналита и маркера ЭОП, соответственно. Для всех вариантов были рассчитаны электрофоретические подвижности $\mu_{эф}$ исследуемых анионов, полученные результаты представлены на рис. 34.

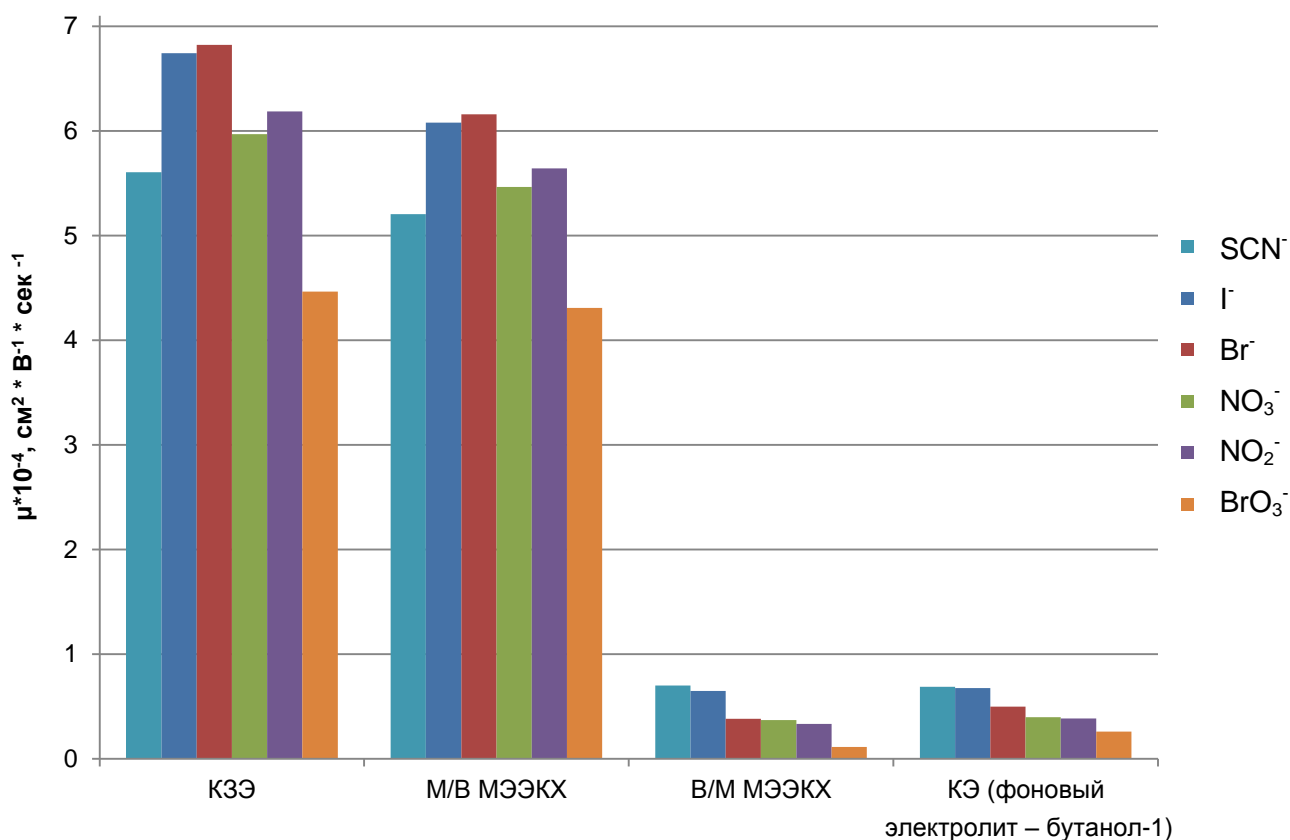


Рис. 34. Зависимость электрофоретической подвижности неорганических анионов от варианта электромиграционных методов.

Из полученных результатов видно, что в вариантах КЗЭ и М/В МЭЭКХ подвижность анионов приблизительно в 10 раз выше, чем для случаев В/М МЭЭКХ и капиллярного электрофореза с использованием бутанола-1 в качестве фонового

электролита. Важно отметить, что порядок миграции анионов в М/В МЭЭКХ значительно отличается от варианта В/М МЭЭКХ, что свидетельствует о принципиально другом механизме разделения аналитов. Вероятно, это может быть обусловлено разницей в сольватационных эффектах растворителей, являющихся основой фоновых электролитов (водной фазы или бутанола-1, соответственно). Добавление в эти фазы противоположных по гидрофобности капель микроэмульсии (масла или воды) сказывается в основном на улучшении разрешения пиков определяемых компонентов.

Таким образом, предполагается, что электрофоретическая подвижность анионов в варианте В/М МЭЭКХ может быть обусловлена их собственной подвижностью в направлении анода, а также их взаимодействием с отрицательно заряженными каплями микроэмульсии, при этом вклад каждого из процессов оценить сложно. Сравнение электрофоретических подвижностей в различных вариантах капиллярного электрофореза показало, что скорость миграции неорганических анионов в В/М МЭЭКХ на порядок меньше по сравнению с методами КЗЭ и М/В МЭЭКХ.

Глава 4. Сочетание различных вариантов он-лайн концентрирования с В/М МЭЭКХ

В работах, посвященных использованию В/М микроэмульсий в качестве фоновых электролитов в капиллярном электрофорезе, описан только один вариант использования предварительного он-лайн концентрирования (*стэкинга с усилением поля*) при определении смеси антибиотиков [88].

Ранее в работе рассмотрено влияние состава В/М микроэмульсий, а также напряжения и температуры термостатирования на селективность разделения аналитов. При этом удалось добиться полного разделения модельной смеси неорганических анионов, однако пределы обнаружения аналитов оказались достаточно высокими (1.7–3.6 мг/л). Для значительного увеличения чувствительности определения веществ нами изучена возможность сочетания метода В/М МЭЭКХ с различными вариантами он-лайн концентрирования.

4.1. Стэкинг с усилением поля

Стэкинг с усилением поля является одним из наиболее простых вариантов он-лайн концентрирования, основанным на гидродинамическом вводе широкой зоны образца, растворенного в низкопроводящей матрице, с последующим концентрированием заряженных компонентов пробы на границе с фоновым электролитом. В нашей работе для более эффективного концентрирования изучено сочетание метода В/М МЭЭКХ со стэкингом с усилением поля и пробкой органического растворителя.

В качестве дополнительной зоны был использован бутанол-1, являющийся основной составляющей В/М микроэмульсии. Обнаружено, что наилучшие коэффициенты концентрирования были достигнуты при следующих условиях: гидродинамический ввод (при 50 мбар) зоны бутанола-1 в течение 10 сек, затем раствора пробы в течение 100 сек. После стадии ввода пробы входной конец капилляра помещают в раствор фонового электролита и прикладывают напряжение -30 кВ. При этом наблюдается концентрирование анионов в зоне бутанола-1. На

рис. 35 представлена электрофореграмма модельной смеси неорганических анионов в варианте В/М МЭЭКХ в сочетании с предварительным стэкингом с усилением поля.

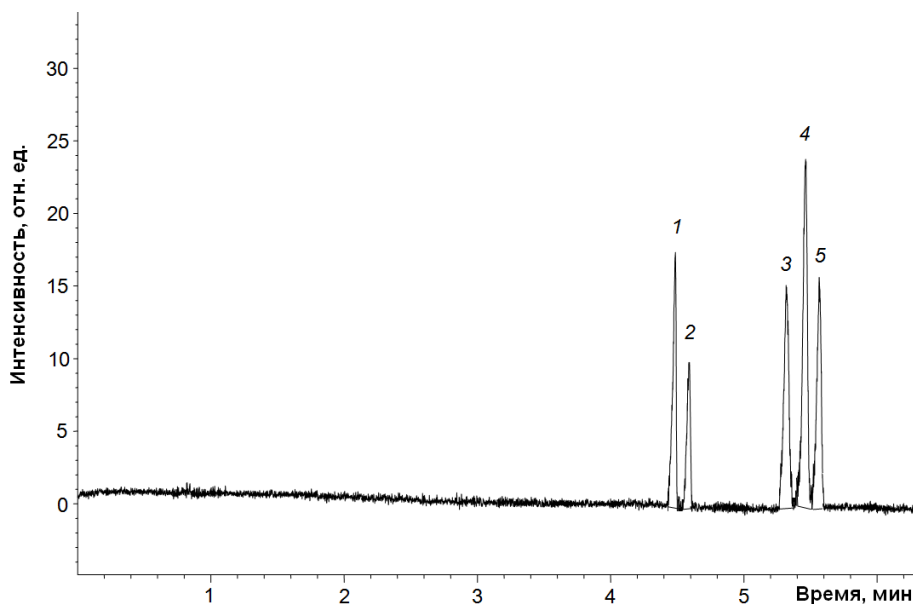


Рис. 35. Электрофореграмма модельной смеси неорганических анионов ($c = 2.5$ мг/л) в варианте В/М МЭЭКХ в сочетании со стэкингом с усилением поля. 1 – тиоцианат, 2 – йодид, 3 – бромид, 4 – нитрат, 5 – нитрит. Ввод пробы: гидродинамический ввод зоны бутанола-1 (50 мбар/10 сек), затем ввод пробы (50 мбар/100 сек). Остальные условия указаны в подписи к рис. 31.

Применение подхода рассмотрено на примере определения бромид-иона в морской воде. Обычное содержание этого компонента составляет порядка десятков единиц мг/л. Анализ морской воды проводили методом В/М МЭЭКХ в сочетании с предварительной стадией концентрирования. Полученная электрофореграмма представлена на рис. 36. Небольшое размывание пика может быть обусловлено мешающим влиянием высокой концентрации хлорид-иона в образце.

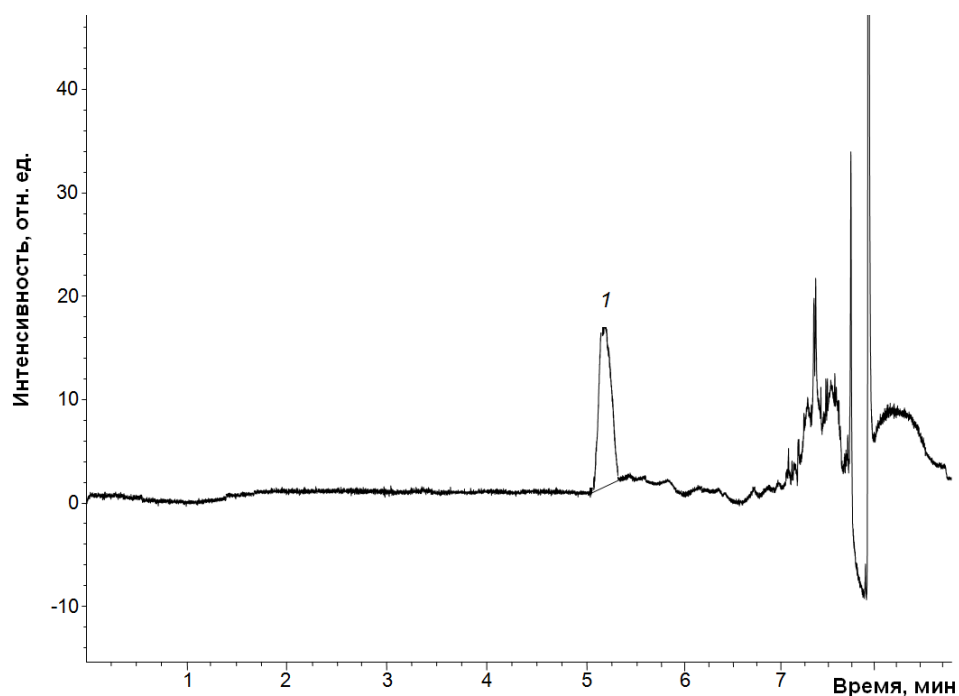


Рис. 36. Электрофореграмма образца морской воды, разбавленной в 20 раз деионизованной водой в варианте В/М МЭЭКХ в сочетании со стэкингом с усилением поля. 1 – бромид. Ввод пробы: гидродинамический ввод зоны бутанола-1 (50 мбар/ 10 сек), затем ввод пробы (50 мбар/ 120 сек). Остальные условия указаны в подписи к рис. 35.

Содержание бромид-иона рассчитывали с использованием метода добавок известных концентраций аналита в образец морской воды. В рассматриваемой пробе содержание бромида составило (81 ± 5) мг/л.

4.2. Электростэкинг

Одним из важных требований для осуществления электростэкинга является низкая электрическая проводимость фонового электролита, поэтому в варианте КЗЭ важно использовать разбавленные водные буферные растворы с низким значением рН для подавления ЭОП. Это связано с побочной миграцией фонового электролита в капилляре в процессе электрокинетического ввода пробы, что может негативно сказаться на степени концентрирования аналитов. В/М микроэмульсии обладают достаточно низкой электропроводностью, что делает возможным сочетание электростэкинга с методом В/М МЭЭКХ.

В отличие от стэкинга с усилением поля, который ограничен объемом вводимой пробы (20-50% от всего объема капилляра), в случае электростэкинга возможно полностью сконцентрировать ионогенные компоненты образца, что в теории делает этот способ одним из наиболее эффективных.

4.2.1. Концентрирование неорганических веществ с использованием электростэкинга

Нами рассмотрена возможность применения электростэкинга на примере модельной смеси неорганических анионов. В качестве органического модификатора для дополнительного увеличения коэффициента концентрирования перед электрокинетическим вводом пробы гидродинамически вводят зону бутанола-1 (50 мбар/ 10 сек). Затем входной конец капилляра помещают в раствор пробы и прикладывают напряжение -20 кВ в течение 30 сек (в варианте с обращением полярности). Деионизованная вода, в которой растворены определяемые вещества, имеет низкую электропроводность, поэтому анионы быстро мигрируют в направлении анода и замедляются при достижении зоны бутанола-1, где и происходит фокусирование аналитов. После электрокинетического ввода пробы входной конец капилляра помещают в раствор фонового электролита (В/М микроэмульсию) и прикладывают напряжение -30 кВ для начала разделения компонентов пробы. На рис. 37 представлена электрофореграмма модельной смеси неорганических анионов в варианте В/М МЭЭКХ в сочетании с электростэкингом.

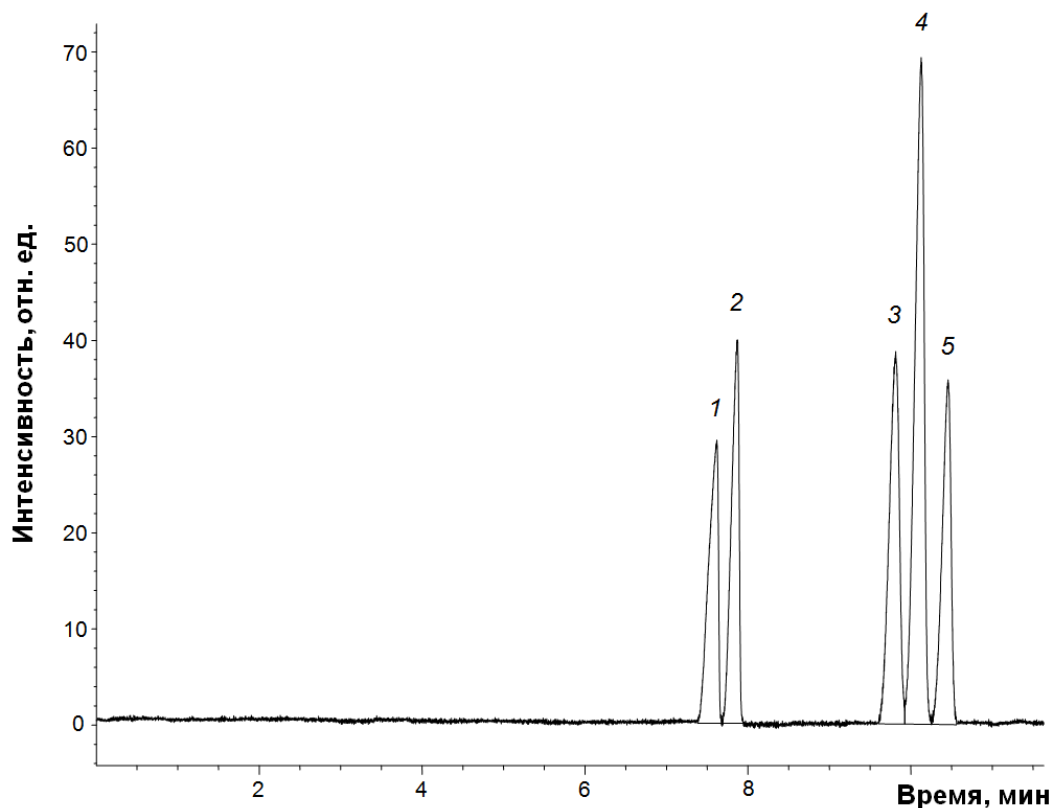


Рис. 37. Электрофореграмма модельной смеси неорганических анионов ($c = 0.1$ мг/л) в варианте В/М МЭЭКХ в сочетании электростэкинггом. Пики: 1 – тиоцианат, 2 – йодид, 3 – бромид, 4 – нитрат, 5 – нитрит. Ввод пробы: гидродинамический ввод зоны бутанола-1 (50 мбар/ 10 сек), затем ввод пробы (-20 кВ/ 30 сек). Условия электрофоретического разделения: кварцевый капилляр общей длиной 48.5 см (эффективной длиной 40 см) и диаметром 50 мкм. Остальные условия указаны в подписи к рис. 31.

В таблице 5 показано использование вариантов В/М МЭЭКХ в сочетании с электростэкинггом и стэкинггом с усилением поля в сравнении с обычным вводом пробы. В отличие от обычного стэкинга, который дает коэффициенты концентрирования порядка 10-15, электростэкингг позволяет снизить пределы обнаружения аналитов до 10^3 раз, $C_{\text{мин}}$ составил 2-5 мкг/л для определяемых анионов.

Таблица 5. Сравнение различных вариантов концентрирования, используемых в сочетании с методом В/М МЭЭКХ, с обычным вводом пробы.

Анион	С _{мин} , мг/л			Коэффициент концентрирования	
	Обычный ввод пробы	Стэкинг с усилением поля	Электро-стэкинг	Стэкинг с усилением поля	Электро-стэкинг
Тиоцианат	3	0.2	0.005	15	600
Йодид	4	0.4	0.004	10	1000
Бромид	3	0.3	0.004	10	750
Нитрат	2	0.2	0.002	10	1000
Нитрит	3	0.2	0.004	15	750

На примере модельной смеси анионов проведена оценка метрологических характеристик метода В/М МЭЭКХ в сочетании с электростэкингом. Градуировочные графики оказались линейными в диапазоне 5-500 мкг/л для йодида, бромида и нитрата и в диапазоне 10-500 мкг/л для тиоцианата и нитрита (табл. 6).

Таблица 6. Метрологические характеристики определения анионов методом В/М МЭЭКХ в сочетании с электростэкингом.

Анион	Линейный диапазон градуировочного графика (мкг/л)	Уравнение градуировочной зависимости	R
Тиоцианат	10–500	$y = 2.379x + 0.098$	0.9991
Йодид	5–500	$y = 2.586x + 1.013$	0.9990
Бромид	5–500	$y = 3.325x + 0.351$	0.9995
Нитрат	5–500	$y = 5.523x + 0.267$	0.9998
Нитрит	10–500	$y = 2.705x + 0.45$	0.9997

Градуировочные зависимости были получены с использованием модельной смеси анионов в трех повторностях на каждом уровне концентраций. Сходимость рассчитывали на трех уровнях концентраций (25, 100 и 200 мкг/л) по результатам определения содержания анионов, полученным в течение одного дня ($n = 9$); внутрилабораторную прецизионность – по результатам, полученным в течение 5 дней. Относительное стандартное отклонение (s_r), рассчитанное по площадям пиков и временам миграции, оказалось менее 7.4% и 4.2%, соответственно (табл. 7). Внутрилабораторную прецизионность оценивали для трех уровней концентраций анионов (25, 100 и 200 мкг/л) по результатам, полученным в течение пяти дней. Относительное стандартное отклонение оказалось менее 9.0% для площадей пиков и 5.8% для времен миграции, соответственно.

Таблица 7. Сходимость и внутрилабораторная прецизионность результатов определения неорганических анионов методом В/М МЭЭКХ в сочетании с электростэкинггом.

Концентрация анионов (мг/л)		Относительное стандартное отклонение s_r , %									
		Времена миграции					Площадь пиков				
		SCN ⁻	Г	Br ⁻	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	SCN ⁻	Г	Br ⁻	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻
Сходимость ($n = 9$)	25	4.2	2.3	3.8	3.9	2.6	7.4	6.8	3.2	6.4	6.9
	100	0.8	0.9	1.0	0.7	1.1	2.4	3.3	2.3	1.7	3.8
	200	0.6	0.6	0.9	0.5	0.8	6.2	4.4	6.1	6.7	6.6
Внутрилабораторная прецизионность ($n = 45$)	25	3.4	3.5	5.0	3.0	5.4	8.3	9.0	8.8	6.6	6.6
	100	2.8	3.0	5.8	2.5	4.8	6.2	5.5	6.5	4.9	6.2
	200	1.4	1.5	2.6	1.2	1.4	3.2	5.2	4.6	3.2	4.8

4.2.2. Концентрирование органических веществ с использованием электростэкинга

Помимо заряженных соединений неорганической природы с помощью метода В/М МЭЭКХ с электростэкингом возможно определение органических ионогенных веществ, что продемонстрировано на примере определения трех подсластителей – сахарина, аспартама и ацесульфам. Данные вещества широко используются в пищевой промышленности в качестве сахарозаменителей, однако исследования показали, что некоторые из них могут быть токсичными. Например, установлено, что аспартам, являющийся вторым по популярности подсластителем и входящий в состав огромного количества продуктов питания и напитков, в результате метаболизма в организме человека распадается на две аминокислоты и метанол. Последний является ядом, действующим на нервную и сосудистую системы. Поэтому важной задачей является определение этой группы веществ с высокой чувствительностью.

Электрофореграмма, полученная при определении смеси подсластителей методом В/М МЭЭКХ в сочетании с электростэкингом, представлена на рис. 38.

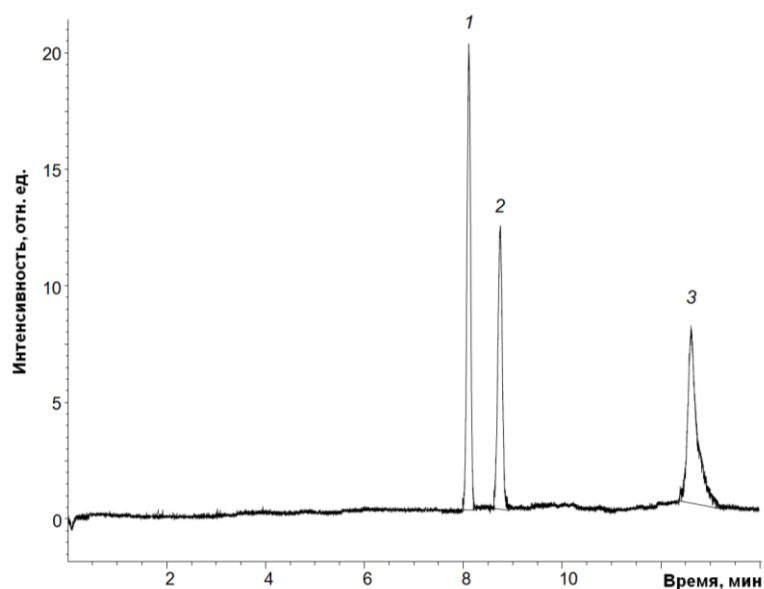
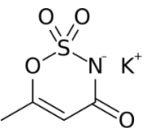
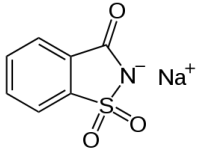
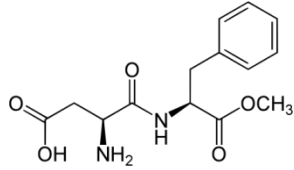


Рис. 38. Электрофореграмма модельной смеси подсластителей ($c = 0.5$ мг/л) в варианте В/М МЭЭКХ в сочетании с электростэкингом. 1 – ацесульфам К, 2 – сахарин, 3 – аспартам. Ввод пробы: гидродинамический ввод зоны бутанола-1 (50 мбар/ 10 сек), затем ввод пробы (-20 кВ/ 90 сек). Детектирование при 210 нм. Остальные условия указаны в подписи к рис. 37.

При концентрировании в варианте электростэкинга определяемые вещества должны быть в ионогенном виде. Сахарин и ацесульфам К в модельном растворе находились в виде анионов, для перевода аспартама в заряженную форму за счет диссоциации карбоксильной группы раствор пробы довели до значения рН 9.3.

Пределы обнаружения, коэффициенты концентрирования, а также эффективности разделения подсластителей N представлены в табл. 8.

Таблица 8. Пределы обнаружения, коэффициенты концентрирования и эффективность разделения подсластителей методом В/М МЭЭКХ в сочетании с электростэкингом.

Подсластитель	Структурная формула	$C_{мин}$, мкг/л	Коэффициент концентрирования	N, т.т.
Ацесульфам К		20	710	57 000
Сахарин		40	160	45 000
Аспартам		60	320	31 000

Метод В/М МЭЭКХ способствовал разделению подсластителей с высокой селективностью, использование электростэкинга позволило значительно улучшить чувствительность определения аналитов.

4.2.3. Концентрирование высокомолекулярных веществ с использованием электростэкинга

Дополнительные возможности электростэкинга продемонстрированы на примере концентрирования полимера – полигексаметиленгуанидина (ПГМГ), структурная формула которого представлена на рис. 39.

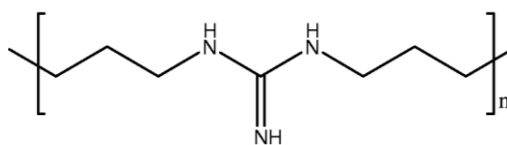


Рис. 39. Структурная формула полигексаметиленгуанидина.

Необходимым условием концентрирования данного вещества является переводение его в заряженную форму, что достигается при низких значениях pH путем добавления к водному раствору полимера соляной кислоты. Важно отметить, что в отличие от предыдущих вариантов использования электростэкинга, где осуществлялось концентрирование анионных компонентов пробы, в данном случае ПГМГ находится в катионной форме, поэтому при электрокинетическом вводе пробы важно прикладывать напряжение в режиме положительной полярности. В этом случае миграция катионных аналитов противонаправлена движению ЭОП и каплям В/М микроэмульсии. В качестве дополнительной низкопроводящей зоны перед вводом пробы в капилляр гидродинамически вводили зону деионизованной воды (при использовании бутанола-1 коэффициент концентрирования оказался значительно ниже). При наложении электрического поля на стадии концентрирования положительно заряженные молекулы ПГМГ мигрируют в направлении катода и фокусируются на границе раздела фаз между фоновым электролитом и водой. В свою очередь, под действием направленного к аноду ЭОП происходит частичное удаление зоны воды, поэтому важно вводить достаточно широкую зону воды.

Таким образом, для концентрирования полимера выбраны следующие условия: гидродинамический ввод воды (20 мбар/ 40 сек), затем электрокинетический ввод пробы (+20 кВ/ 40 сек); полученная в данных условиях электрофореграмма представлена на рис. 40.

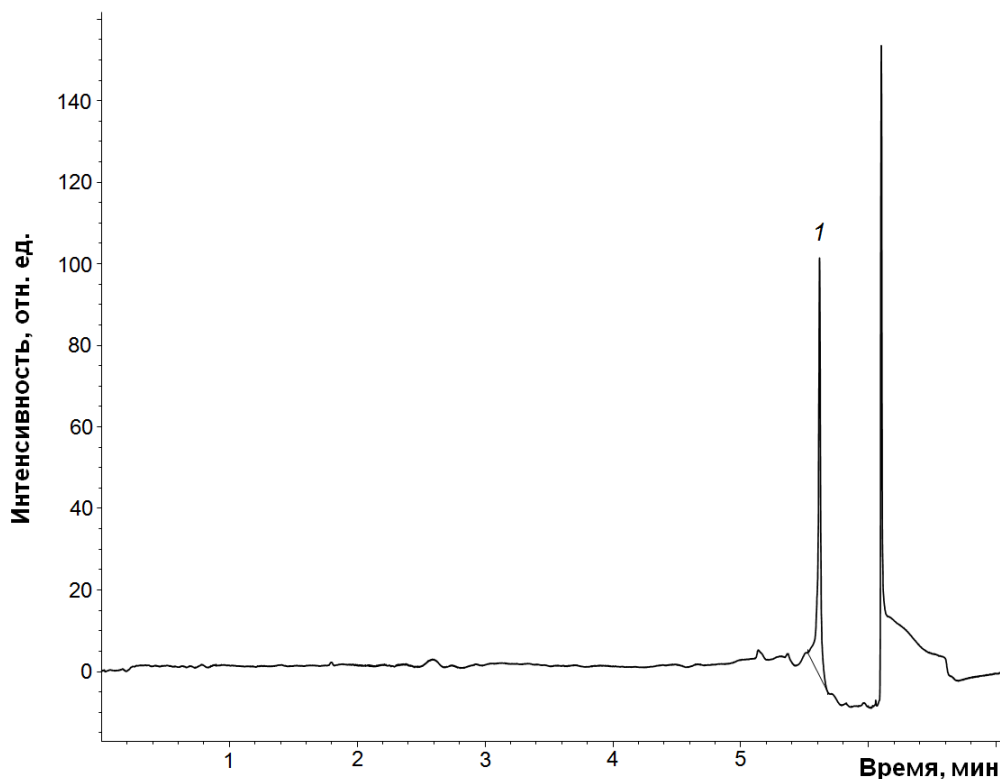


Рис. 40. Электрофореграмма ПГМГ ($c = 10$ мг/л) в варианте В/М МЭЭКХ в сочетании с электростэкинггом. 1 – ПГМГ. Ввод пробы: гидродинамический ввод зоны воды (20 мбар/ 40 сек), затем ввод пробы (+20 кВ/ 40 сек). Детектирование при 200 нм. Кварцевый капилляр общей длиной 33.5 см (эффективной длиной 25 см) и диаметром 50 мкм. Остальные условия указаны в подписи к рис. 37.

При таком способе определения ПГМГ удалось снизить пределы обнаружения аналита до $C_{\text{мин}} = 40$ мкг/л с коэффициентом концентрирования около 230.

Таким образом, из полученных результатов определения неорганических, органических веществ, а также высокомолекулярного соединения видно, что метод В/М МЭЭКХ в сочетании с предварительным электростэкинггом характеризуется приемлемой воспроизводимостью и низкими пределами обнаружения и может быть применен для определения заряженных аналитов в анионной и катионной форме в реальных объектах с высокой чувствительностью.

4.3. Свипинг полярных соединений неионогенной природы

подавляющее большинство всех способов он-лайн концентрирования, таких как стэкинг, изотахофорез, рН-контролируемый стэкинг, позволяет сконцентрировать в капилляре аналиты только ионогенной природы. Существует способ концентрирования незаряженных веществ, называемый *свипингом*. Он основан на концентрировании аналитов псевдостационарной фазой (мицеллами, каплями микроэмульсий, комплексообразующими веществами), которая проникает в зону образца, не содержащую мицелл. Концентрирование происходит за счет хроматографического распределения определяемых компонентов между рабочим буферным раствором и псевдостационарной мицеллярной фазой с компонентами буферной системы. В наибольшей степени концентрируются вещества, имеющие сродство с мицеллами, т.е. факторы концентрирования возрастают с увеличением гидрофобности аналитов. Таким образом, в варианте свипинга не удастся с высокой эффективностью сконцентрировать полярные вещества. Нами впервые предложен вариант свипинга для концентрирования нейтральных веществ гидрофильной природы, основанный на взаимодействии аналитов с полярными каплями микроэмульсий типа «вода в масле».

На рис. 41 проиллюстрирован механизм свипинга полярных соединений в варианте В/М МЭЭКХ с использованием отрицательно заряженной псевдостационарной фазы (водных капель обратной микроэмульсии). В кварцевый капилляр гидродинамически вводят большой объем пробы, растворенной в органическом растворителе (рис. 41а). Затем концы капилляра помещают в раствор фонового электролита (В/М микроэмульсию). После того, как приложено напряжение, гидрофильные незаряженные аналиты, не имеющие собственной подвижности, концентрируются полярными микроэмульсионными каплями, проникающими в зону пробы со стороны катода (рис. 41б, 41в). Скорость отрицательно заряженных капель выше скорости их комплексов с определяемыми компонентами. Далее происходит разделение сконцентрированных зон методом В/М МЭЭКХ (рис. 41г).

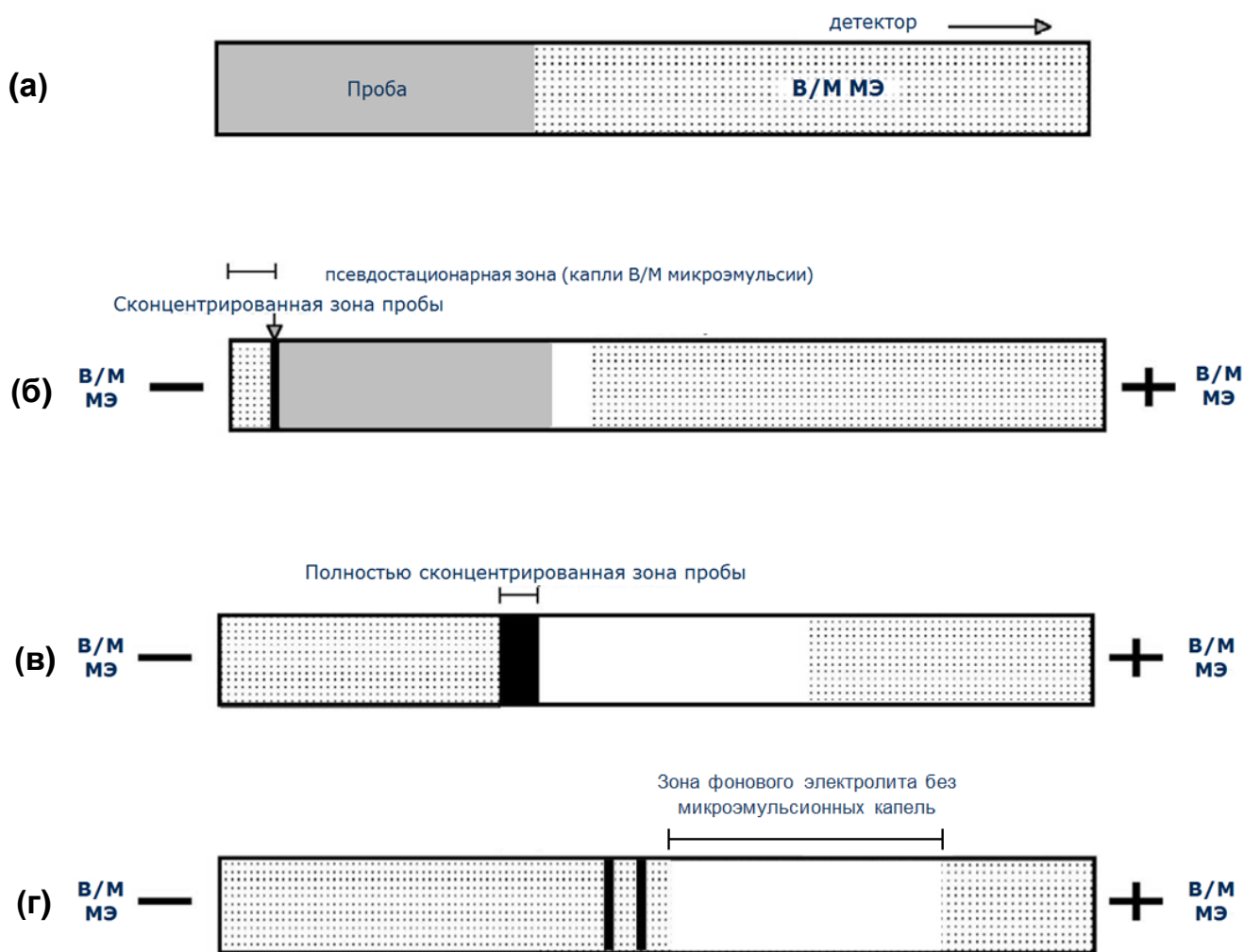


Рис. 41. Схема свипинга полярных соединений в методе В/М ВЭЭКХ.

В данном варианте концентрирования в наибольшей степени концентрируются гидрофильные вещества, имеющие сродство с полярными микроэмульсионными каплями.

Применение свипинга нейтральных молекул рассмотрено на примере определения лекарственного вещества ацикловира в образце мази (рис. 42). Для данного соединения значения pK_a составляют 2.27 и 9.25, при значениях pH порядка 6-7 вещество находится в незаряженном состоянии. Вещество является достаточно гидрофильным, значение коэффициента гидрофобности $\log P$ для него составляет -1.76.

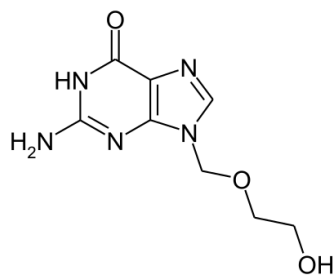


Рис. 42. Структурная формула ацикловира.

Пробоподготовка образца мази с содержанием ацикловира 5% описана в п. 2.5.1. При использовании в качестве экстрагентов бутанола-1 и В/М микроэмульсии степень извлечения определяемого компонента составила $(98 \pm 3) \%$ и $(99 \pm 2)\%$ соответственно; концентрация ацикловира в пробе после растворения мази оказалась равной 10 мг/л. На рис. 43 представлена электрофореграмма растворенного в бутаноле-1 образца мази «Ацикловир», определенного методом В/М МЭЭКХ при обычном вводе пробы (рис. 43а) и при длительном гидродинамическом вводе пробы, соответствующему заполнению порядка 37% относительно всего объема капилляра (рис. 43б, вариант свипинга). Для сравнения на рис. 43в представлена электрофореграмма ацикловира с использованием В/М микроэмульсии в качестве экстрагента в случае длительного ввода пробы.

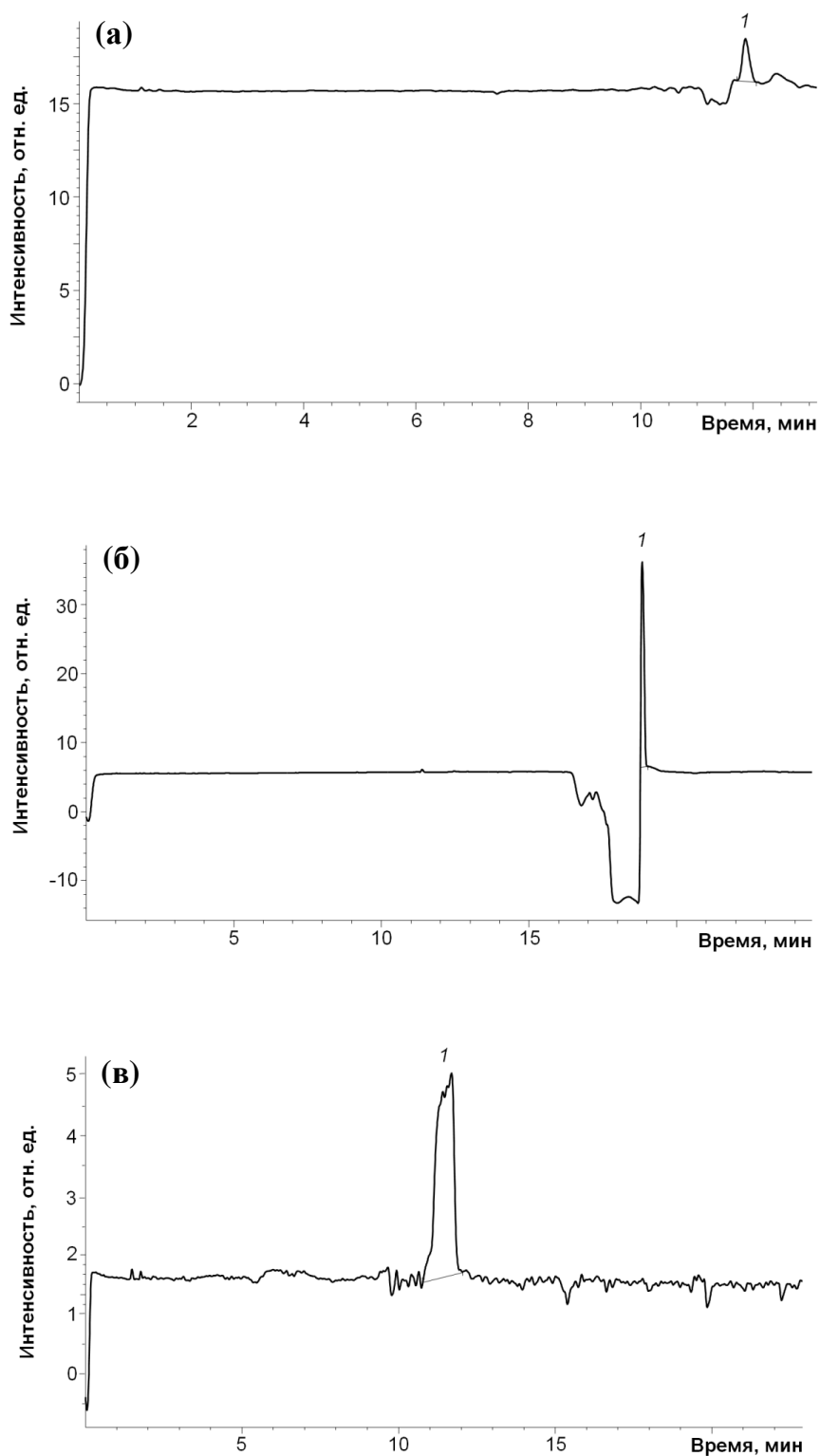


Рис. 43. Электрофореграмма образца 5%-ной мази «Ацикловир» массой 0.01 г, растворенной в 50 мл бутанола-1 (а, б) или В/М микроэмульсии (в). 1 – ацикловир. Гидродинамический ввод пробы при давлении 50 мбар в течение 10 сек (а) или 200 сек (б, в). Детектирование при 254 нм. Остальные условия указаны в подписи к рис. 37.

В табл. 9 представлено сравнение пределов обнаружения и эффективности в методе В/М МЭЭКХ в сочетании со свипингом и обычным вводом пробы при использовании различных экстрагентов в пробоподготовке.

Таблица 9. Сравнение пределов обнаружения и эффективности определения ацикловира методом В/М МЭЭКХ в зависимости от типа экстрагента и времени гидродинамического ввода пробы.

Экстрагент для извлечения ацикловира	Ввод пробы	$C_{мин}$, мг/л	N, т.т.
Бутанол-1	10 мбар/ 10 сек	0.9	96 000
	10 мбар/ 200 сек	0.05	148 000
В/М микроэмульсия	10 мбар/ 10 сек	2	40 000
	10 мбар /200 сек	1	4 400

При использовании в качестве экстрагента В/М микроэмульсии с увеличением ширины зоны пробы происходит значительное размывание пика ацикловира и уменьшение эффективности. Вероятно, этот факт можно объяснить взаимодействием аналита с заряженными водными каплями в зоне пробы, которые мигрируют в направлении анода при наложении электрического поля. В силу этого, для экстракции ацикловира целесообразно использовать бутанол-1.

Использование бутанола-1 в пробоподготовке приводит к значительному улучшению эффективности определяемого компонента. При гидродинамическом вводе пробы в течение длительного времени (200 сек) с последующим приложением напряжения происходит концентрирование аналита в варианте свипинга. При наложении электрического поля в процессе анализа ацикловир, не имеющий собственной подвижности в среде бутанола-1, взаимодействует лишь с каплями микроэмульсии, проникающими в зону пробы, и концентрируется. Таким образом, для осуществления рассмотренного варианта концентрирования важен выбор используемого в пробоподготовке растворителя, который не должен оказывать влияния на миграцию определяемого компонента в зоне пробы.

Предложенный способ позволил снизить пределы обнаружения ацикловира до $C_{\text{мин}} = 50$ мкг/л с коэффициентом концентрирования около 30.

4.4. Применение метода В/М МЭЭКХ в сочетании с электростэкингом при определении йодид-иона в продуктах питания (куриных яйцах и морской капусте)

Йод имеет большое значение для организма человека – он является необходимым компонентом щитовидной железы, входя в состав ее гормонов (тироксин, трийодтиронин). Этот элемент является биостимулятором и иммуностимулятором, препятствует свертываемости крови и образованию тромбов, повышает потребление кислорода тканями организма. Согласно оценкам исследователей Всемирной организации здравоохранения, около одного миллиарда людей в развивающихся странах имеет высокую вероятность развития заболеваний, вызванных дефицитом йода. Недостаток этого элемента можно компенсировать за счет употребления морепродуктов (креветок, морской рыбы, морской капусты). В меньших количествах йод содержится также и в других продуктах (печень, яйца, молоко).

Важной задачей является определение содержания йода в различных продуктах питания с высокой чувствительностью. Для определения йода применяют как достаточно чувствительные, простые и доступные методы (титриметрический, фотометрический, ионометрический, вольтамперометрический) [154], так и менее доступные, высокоинформативные и чувствительные, но требующие хорошего инструментального оснащения или специальных реагентов методы. К последним могут быть отнесены методы изотопного разбавления, нейтронно-активационного анализа и МС-ИСП [155]. Практически все методы определения йодида требуют предварительной пробоподготовки, для большинства способов детектирования йода органическая составляющая пищевого продукта мешает проведению анализа. Нами предложен способ определения йодид-иона в продуктах питания методом В/М МЭЭКХ с электрокинетическим вводом пробы, позволяющим селективно вводить в капилляр только заряженные компоненты пробы.

4.4.1. Определение содержания йода в куриных яйцах

4.4.1.1. Анализ гомогенизированного образца куриного яйца

Процедура пробоподготовки куриного яйца описана в п. 2.4.1. Стадия смешивания гомогенизированного яйца с ацетонитрилом необходима для осаждения белков, которые могут оказывать мешающее влияние при последующем анализе образца. Подготовленную к анализу пробу определяли методом В/М МЭЭКХ в сочетании с предварительным электростэкингом. В качестве длины волны детектирования была выбрана 222 нм, соответствующая максимуму спектра поглощения йодид-иона (рис. 44).

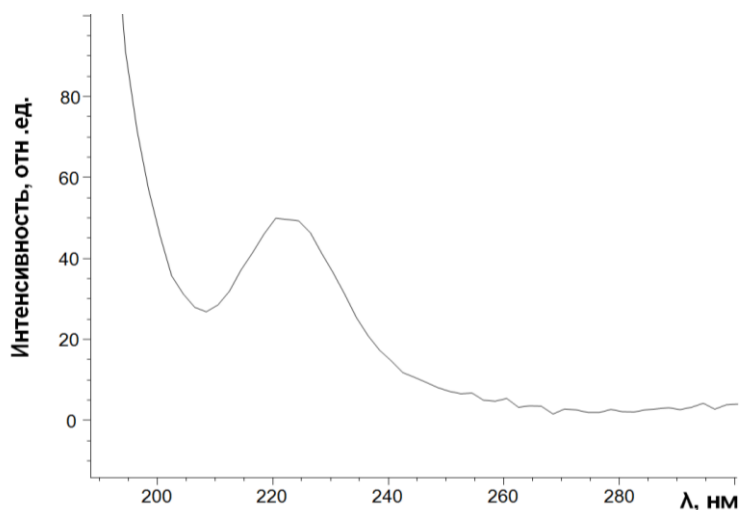


Рис. 44. Спектр поглощения йодид-иона.

Оценку степени извлечения йодид-иона проводили путем введения добавок йодид-иона с концентрациями 100, 200 и 500 мкг/кг в образец гомогенизированного яйца. Степень извлечения определяемого аниона во всех случаях оказалась выше $(98 \pm 3)\%$.

Важно отметить, что для количественной оценки содержания аналитов, определяемых в варианте капиллярного электрофореза в сочетании с предварительным электростэкингом целесообразно использование метода добавок, поскольку степень концентрирования компонентов пробы при электрокинетическом вводе пробы может в значительной степени зависеть от матрицы образца и

мешающего влияния других компонентов пробы. Метод добавок позволяет нивелировать влияние этих факторов в отличие от метода градуировочного графика. Добавку йодид-иона известной концентрации вводили в раствор пробы, полученный после центрифугирования реального образца.

Результаты определения йодида в образцах куриных яиц различных марок представлены в табл. 10.

Таблица 10. Результаты определения йодид-иона в образцах куриных яиц различных марок (n = 3, P = 0.95).

Куриное яйцо (производитель)	Найдено йодида, мкг/кг куриного яйца
«Натуральный продукт для здорового питания (яйцо куриное)» (ООО «ВЕЛЕС»)	370 ± 20
Яйцо куриное «Окское» (ЗАО «Окская птицефабрика»)	440 ± 20

4.4.1.2. Анализ белка и желтка по отдельности

Предложенный подход по определению йодид-иона в гомогенизированном образце куриного яйца также может быть применен для анализа отдельно белка и желтка. Установлено, что определяемый компонент содержится исключительно в курином желтке, в белке содержание йода оказалось ниже предела обнаружения для всех анализируемых образцов яиц. На рис. 45 представлена электрофореграмма яичного желтка.

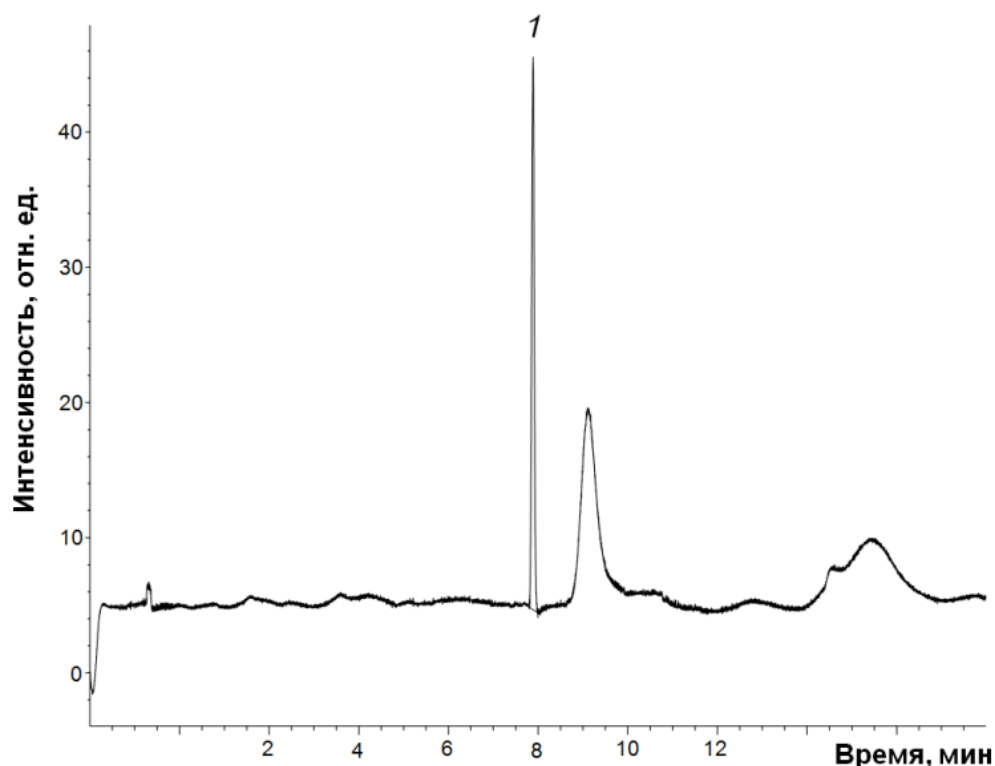


Рис. 45. Электрофореграмма куриного желтка образца «Натуральный продукт для здорового питания (яйцо куриное)» в варианте В/М МЭЭКХ в сочетании с предварительным электростэкингом. 1 – йодид-ион. Фоновый электролит: микроэмульсия типа «вода в масле», содержащая 5 мас.% ДДСН, 80 мас.% бутанола-1, 15 мас.% фосфатного буферного раствора (рН 7.0). Ввод пробы: гидродинамический ввод зоны бутанола-1 (50 мбар/ 10 сек), затем электрокинетический ввод пробы (-20 кВ/ 30 сек). Условия электрофоретического разделения: кварцевый капилляр общей длиной 48.5 см (эффективной длиной 40 см) и диаметром 50 мкм, напряжение -30 кВ (в варианте с обращением полярности), температура 40 °С, детектирование при 222 нм.

Определение йодид-иона характеризуется высокой эффективностью ($N = 148\ 000$ т.т.). Использование электрокинетического ввода пробы в процессе электростэкинга позволяет селективно вводить только анионные компоненты пробы, тем самым нивелируется мешающее влияние катионных и нейтральных аналитов, входящих в состав реального образца.

4.4.1.3. Оценка метрологических характеристик

Предел обнаружения ($C_{\text{мин}}$) йодида составил 20 мкг/кг желтка куриного яйца (7 мкг/кг в пересчете на гомогенизированный образец яйца). Сходимость рассчитывали по пяти результатам определения содержания йодид-иона в яичном желтке, полученным в течение одного дня; внутрилабораторную прецизионность – по результатам, полученным в течение 5 дней. Для образца «Натуральный продукт для здорового питания (яйцо куриное)» с концентрацией йодид-иона 1400 мкг/кг желтка сходимость составила 6.5%, внутрилабораторная прецизионность – 8.2%. Предложенный способ определения йодида характеризуется приемлемой правильностью и воспроизводимостью, а также низкими пределами обнаружения, что важно для анализа продуктов питания с низким содержанием определяемого компонента.

4.4.2. Определение содержания йода в морской капусте

4.4.2.1. Анализ свежей морской капусты

Подробная процедура пробоподготовки описана в п. 2.4.2. Подготовленную к анализу пробу определяли методом В/М МЭЭКХ в сочетании с предварительным онлайн концентрированием. Ввод пробы проводили следующим образом: гидродинамический ввод зоны бутанола-1 (50 мбар в течение 10 сек), затем электрокинетический ввод анализируемого образца (-20 кВ в течение 90 сек). Оценку степени извлечения определяемого аниона проводили за счет введения добавки йодид-иона в измельченный образец свежей морской капусты. Установлено, что оптимальное время ультразвуковой (УЗ) обработки пробы при экстракции водой составляет 12 мин, при этом достигается максимальная степень извлечения йодида (72 ± 7) %.

4.4.2.2. Анализ высушенной морской капусты

После высушивания образца в течение нескольких часов потеря массы составила (92 ± 2) %. Оценку степени извлечения определяемого аниона проводили за счет введения добавки йодид-иона в измельченный образец высушенной морской капусты. Зависимость степени извлечения йода от времени УЗ обработки показана на рис. 46.

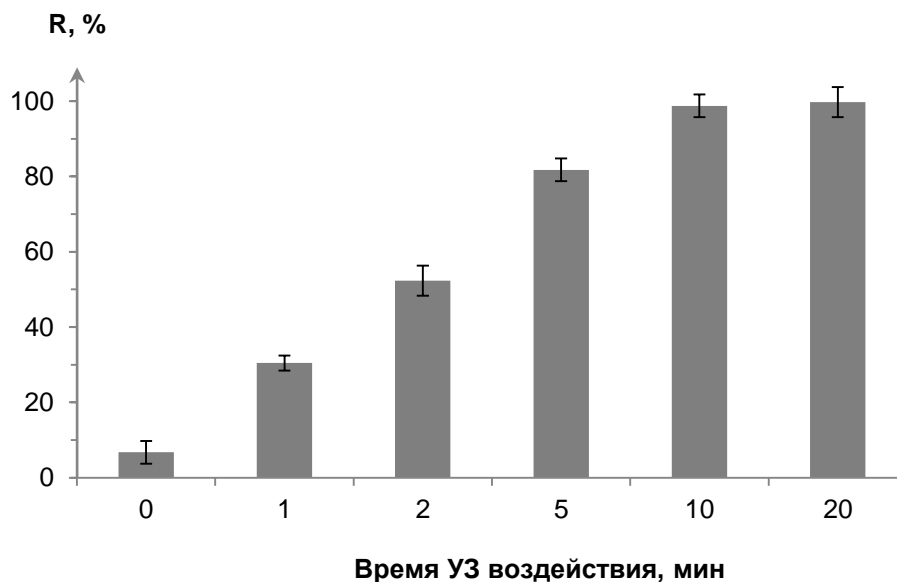


Рис. 46. Зависимость степени извлечения йодид-иона из образца высушенной морской капусты от времени УЗ воздействия.

При проведении пробоподготовки в течение 10 мин достигается практически количественное извлечение определяемого вещества (99 ± 3) %. Из полученных результатов видно, что определение йода наиболее целесообразно проводить в высушенной морской капусте, нежели в свежем образце, поскольку в этом случае достигается наиболее полное извлечение аналита.

На рис. 47 представлена электрофореграмма образца высушенной морской капусты, полученная при оптимальных условиях. Количественное содержание йодид-иона проводили методом добавок, при этом добавку определяемого вещества известной концентрации вводили в раствор пробы, полученный после центрифугирования реального образца.

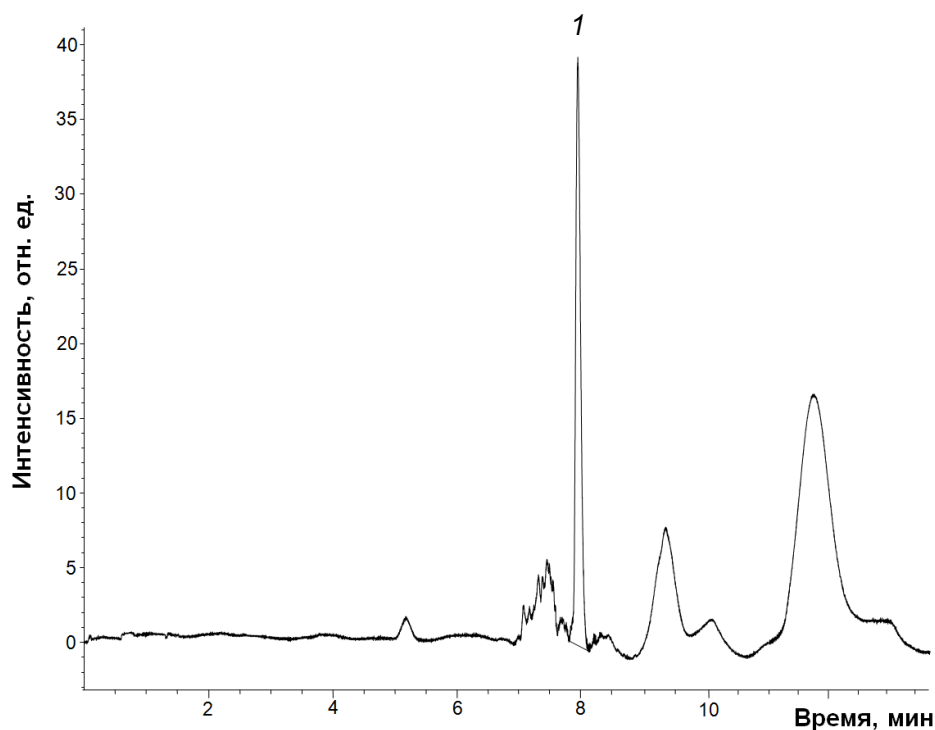


Рис. 47. Электрофореграмма образца высушенной морской капусты «Балтийский берег» в варианте В/М МЭЭКХ в сочетании с предварительным электростэкингом. 1 – йодид-ион. Фоновый электролит: микроэмульсия типа «вода в масле», содержащая 5 мас.% ДДСН, 80 мас.% бутанола-1, 15 мас.% фосфатного буферного раствора (рН 7.0). Ввод пробы: гидродинамический ввод зоны бутанола-1 (50 мбар в течение 10 сек), затем электрокинетический ввод пробы (-20 кВ в течение 90 сек). Условия электрофоретического разделения: напряжение -30 кВ (в варианте с обращением полярности), температура 40 °С, детектирование при 222 нм.

Результаты определения йодида в образцах морской капусты различных марок представлены в табл. 11. При пересчете на свежую морскую капусту (с учетом потери массы воды при высушивании образцов) содержание йодида составляет порядка 3.2-4.0 мг/кг свежей морской капусты, что хорошо согласуется с литературными данными (0.05-5 мг/кг).

Таблица 11. Результаты определения йодид-иона в образцах морской капусты различных марок ($n = 3$, $P = 0.95$).

Морская капуста (производитель)	Найдено йодида, мг/кг высушенной морской капусты
«Балтийский берег»	49 ± 3
«Русское море»	40 ± 2

4.4.2.3. Оценка метрологических характеристик

Предел обнаружения ($C_{\text{мин}}$) йодида составил 100 мкг/кг высушенного образца (9 мкг/кг в пересчете на свежую морскую капусту). Сходимость рассчитывали по пяти результатам определения содержания йодид-иона в высушенном образце, полученным в течение одного дня; внутрилабораторную прецизионность – по результатам, полученным в течение 5 дней. Для образца «Русское море» с концентрацией йодид-иона 40 мг/кг высушенной морской капусты сходимость составила 5.2%, внутрилабораторная прецизионность – 7.3%. Из представленных результатов видно, что предложенный способ определения йодид-иона в образцах морской капусты характеризуется приемлемой правильностью и воспроизводимостью, а также низкими пределами обнаружения.

Таким образом, показано применение метода В/М МЭЭКХ в сочетании с электростэкингом на примере анализа продуктов питания. Высокая солюбилизующая способность обратных микроэмульсий позволяет анализировать концентрированные растворы проб, которые могут привести к забиванию капилляра в процессе анализа. Электростэкинг позволяет селективно вводить в капилляр заряженные аналиты и сконцентрировать их в высокой степени.

Глава 5. Применение В/М микроэмульсий в пробоподготовке

Одной из распространенных задач является анализ объектов с высоким содержанием жира в матрице, например, лекарственных препаратов в мазевой и кремовой формах, продуктов питания, косметических препаратов. Отличительной особенностью всех этих объектов анализа является наличие сложной многокомпонентной матрицы, что обуславливает необходимость проведения сложной и многоступенчатой процедуры пробоподготовки. Это увеличивает стоимость, длительность и трудоемкость анализа. К основным методам пробоподготовки относятся твердофазная и жидкостная экстракция, экстракция в аппарате Сокслета. При этом наблюдаются потери образца, возникает необходимость использования внутреннего стандарта. Дополнительные трудности возникают в связи с тем, что определяемые соединения могут быть различной природы. Соответственно, в каждом конкретном случае нужно подбирать оптимальные условия пробоподготовки. Нами предложен альтернативный вариант пробоподготовки, заключающийся в разбавлении (либо растворении) образца в В/М микроэмульсии.

5.1. Определение консервантов в образцах майонеза

Одной из актуальных на сегодняшний день задач является анализ майонеза на содержание консервантов – сорбиновой и бензойной кислот. Данный объект обладает матрицей с высоким содержанием жира ~67%. В соответствии с нормативным документом ГОСТ 31762-2012, определение сорбиновой и бензойной кислот проводят методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией с длительной (порядка 2 ч) пробоподготовкой [156]. Пробоподготовка включает повторную экстракцию консервантов водой с последующим отделением водного слоя от матрицы образца с помощью делительной воронки, а также осаждение примесей и фильтрование полученного раствора через бумажный фильтр.

Нами предложен альтернативный способ пробоподготовки майонеза, заключающийся в растворении навески образца в небольшом объеме обратной микроэмульсии в ультразвуковой ванне в течение 2 мин с последующим

определением консервантов методом В/М МЭЭКХ. Обратные микроэмульсии, сочетающие в себе одновременно полярную и неполярную фазы, обладают уникальной солюбилизующей способностью и могут выступать в роли экстрагентов веществ различной природы. Предложенный подход с использованием В/М микроэмульсий в пробоподготовке был успешно применен для анализа четырех майонезов различных марок, полученные результаты представлены в табл. 12.

Таблица 12. Результаты определения сорбиновой кислоты в майонезах различных марок (n = 3, P = 0.95).

Марка майонеза	Найдено, г/кг
Московский Провансаль постный	3.5 ± 0.1
Вкуснотека	1.28 ± 0.07
Каждый день (оливковый)	1.19 ± 0.08
Скит Провансаль	< 0.01

На рис. 48 представлена электрофореграмма образца майонеза “Московский провансаль постный”. Во всех выбранных для анализа образцах майонеза бензойной кислоты обнаружено не было. В соответствии с СанПин 2.3.2.1293-03 общее содержание сорбиновой и бензойной кислот не должно превышать 0.2% (масс.), т.е. не более 2 г/кг продукта, в том числе бензойной кислоты должно быть не более 1 г/кг. Полученные результаты (табл. 12) по содержанию сорбиновой кислоты для образцов марок “Вкуснотека”, “Каждый день” и “Скит провансаль” согласуются с требованиями СанПина, в то время как в случае майонеза “Московский Провансаль постный” наблюдается превышение предельно-допустимой концентрации сорбиновой кислоты.

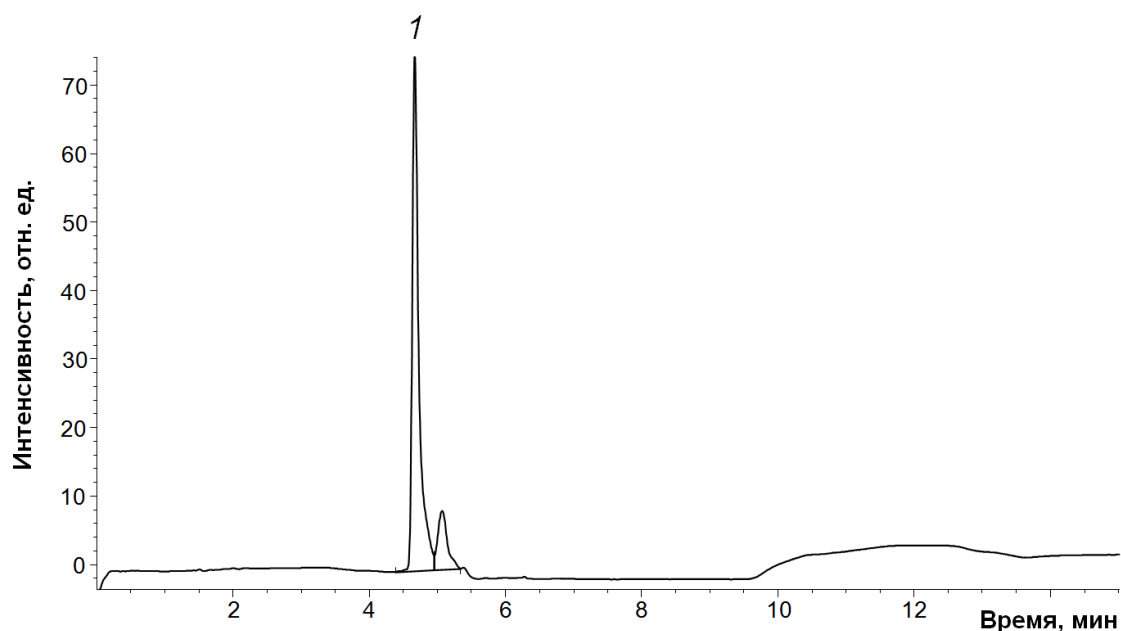


Рис. 48. Электрофореграмма 0.1 г образца майонеза “Московский Провансаль постный” в 1 мл В/М микроэмульсии. 1 – сорбиновая кислота. Фоновый электролит: В/М микроэмульсия, содержащая 5 мас.% ДДСН, 80 мас.% бутанола-1, 15 мас.% фосфатного буферного раствора (рН 7.0). Ввод пробы гидродинамический (50 мбар в течение 10 сек). Условия разделения: напряжение -30 кВ, кварцевый капилляр общей длиной 33.5 см (эффективной длиной 25 см) и диаметром 50 мкм, температура 25 °С, детектирование при 254 нм.

Изучено влияние отношения объема необходимой для экстракции В/М микроэмульсии к массе навески майонеза на степень извлечения консервантов. В образец майонеза, в котором отсутствуют определяемые вещества (“Скит провансаль”), вносили точные навески сорбиновой и бензойной кислот ($c_{\text{добавки}} = 1000$ мг/кг майонеза), затем проводили растворение образца в микроэмульсии и определяли найденное количество консервантов. Полученные результаты представлены на рис. 49. Видно, что уже при десятикратном избытке микроэмульсии по отношению к образцу майонеза (навеску 0.1 г растворяли в 1 мл обратной микроэмульсии) удалось достичь практически количественного извлечения консервантов, при этом навеска майонеза полностью растворилась. Это позволяет уменьшить расход микроэмульсии и снизить пределы обнаружения аналитов в реальных объектах.

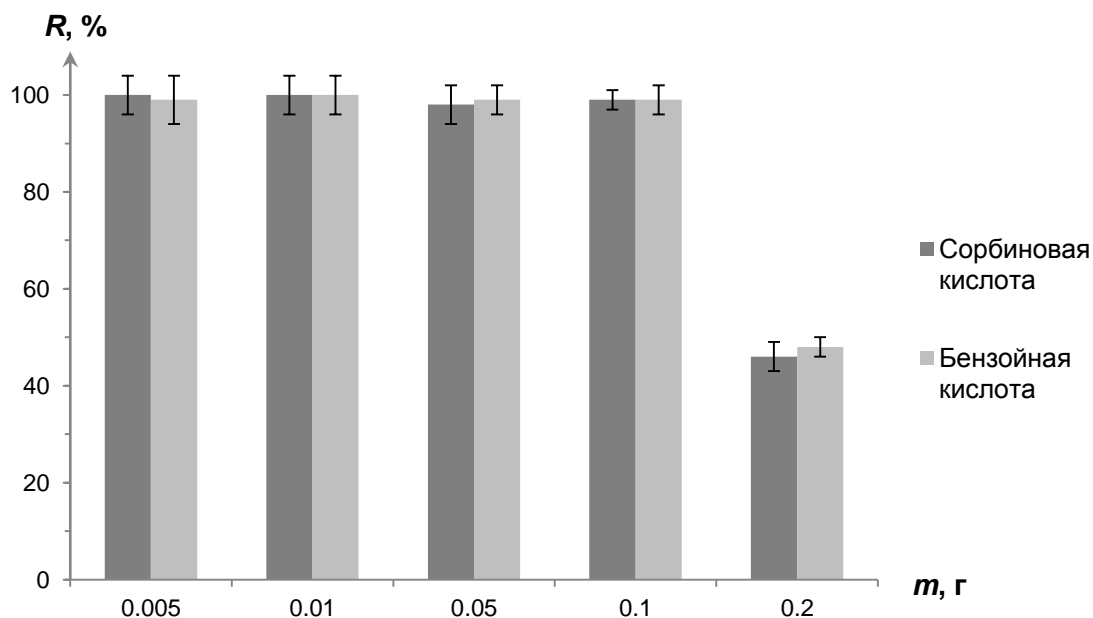


Рис. 49. Зависимость степени извлечения консервантов (введено 1000 мг/кг) от массы навески майонеза, растворенной в 1 мл микроэмульсии В/М.

Для оценки метрологических характеристик проводили анализ модельных образцов майонеза с различным содержанием сорбиновой и бензойной кислот. Предел обнаружения ($C_{\text{мин}}$) составил 3 мг/кг для обоих консервантов. Градуировочные графики линейны в диапазоне от 10 – 4000 мг/кг (коэффициент корреляции 99.9%), описываются уравнениями $A = (16.7 \pm 0.2) \cdot 10^{-2} \cdot c$ для сорбиновой кислоты и $A = (24.6 \pm 0.3) \cdot 10^{-2} \cdot c$ для бензойной кислоты, где A – площадь пика при 254 нм (сорбиновая кислота) или 200 нм (бензойная кислота), c – концентрация консерванта в образце, мг/кг.

В табл. 13 представлены данные по сходимости и внутрिलाбораторной прецизионности на разных уровнях содержания консервантов в модельном образце майонеза. Сходимость рассчитывали по пяти результатам определения содержания сорбиновой и бензойной кислот, полученным в течение одного дня; внутрिलाбораторную прецизионность – по результатам, полученным в течение 5 дней. Правильность определения консервантов оценивали методом “введено-найдено” (табл. 13).

Таблица 13. Правильность и воспроизводимость результатов определения консервантов в модельных образцах майонеза методом введено-найдено ($P=0.95$).

Консервант	Введено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Сходимость (n = 5)	Внутрилабораторная прецизионность (n = 5)
Сорбиновая кислота 	0	< 3	–	–
	100	101 ± 5	5.8	7.5
	1000	990 ± 20	2.3	6.8
Бензойная кислота 	0	< 3	–	–
	100	100 ± 6	3.5	5.7
	1000	990 ± 30	4.2	6.0

Из представленных результатов видно, что предложенный способ определения сорбиновой и бензойной кислот в майонезе характеризуется приемлемой правильностью и точностью.

5.2. Определение Д-пантенола в образце мази

Оценку степени извлечения веществ обратными микроэмульсиями в сравнении с другими экстрагентами проводили на примере определения лекарственного препарата Д-пантенола в мази для наружного применения (5%). Сложность данного реального объекта заключается в том, что основной компонент является гидрофильным в отличие от водонерастворимой матрицы объекта на основе ланолина и парафина. Процедура пробоподготовки мазевого препарата подробно описана в п. 2.5.2. На рис. 50 представлена электрофореграмма лекарственного препарата Д-пантенола в варианте В/М МЭЭКХ.

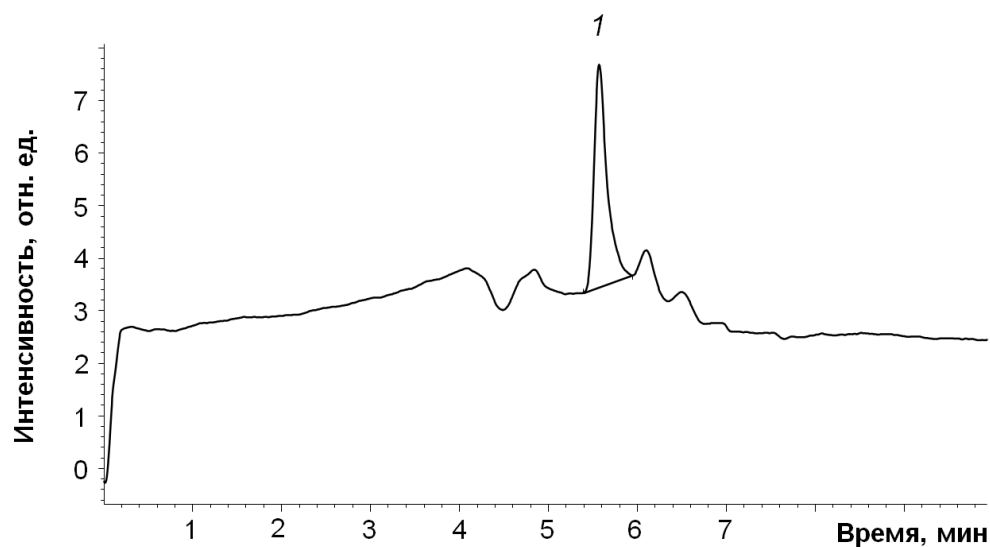
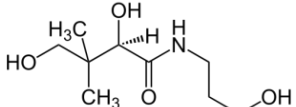


Рис. 50. Электрофореграмма 0.02 г лекарственного препарата Д-пантенола в мазевой форме (5%), растворенного в 1 мл микроэмульсии В/М. 1 – Д-пантенол. Детектирование при 220 нм. Остальные условия указаны в подписи к рис. 31.

Степень извлечения Д-пантенола из образца мази рассчитывали в соответствии с аттестованным значением (5 мас.%), полученные результаты представлены в табл. 14.

Таблица 14. Зависимость степени извлечения Д-пантенола из образца мази для наружного применения (5%) от типа экстрагента. Масса навески мази 0.02 г, объем экстрагента 1 мл ($n = 3$, $P = 0.95$).

Тип экстрагента	Степень извлечения Д-пантенола, % 
Вода	32 ± 3
Метанол	29 ± 2
Бутанол-1	74 ± 3
М/В микроэмульсия	16 ± 1
В/М микроэмульсия	100 ± 2

Навеска мази на липофильной основе полностью растворилась только в случае использования в качестве экстрагентов бутанола-1 и В/М микроэмульсии, однако количественного извлечения основного компонента удалось достичь только в варианте с обратной микроэмульсией, имеющей уникальное дифильное строение. Органическая фаза бутанола способствовала растворению гидрофобной матрицы образца, в то время как водная фаза способствовала извлечению гидрофильного Д-пантенола.

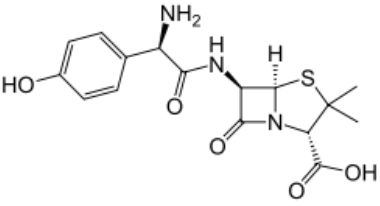
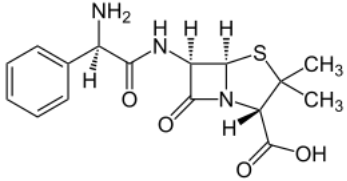
Таким образом, продемонстрированы преимущества использования В/М микроэмульсий в качестве экстрагентов в пробоподготовке. Дифильное строение такого рода микроэмульсий, обуславливающее их уникальную солюбилизующую способность, делает их пригодными для количественного извлечения веществ различной природы из объектов со сложной матрицей, что позволяет в значительной степени упростить процедуру пробоподготовки.

Глава 6. Использование В/М и М/В микроэмульсий в роли реакционных сред

6.1. Концентрирование с последующей дериватизацией в капилляре при определении антибиотиков методом М/В МЭЭКХ

Ампициллин (АМП) и амоксициллин (АМО) представляют собой два полусинтетических антибиотика пенициллинового ряда, широко используемых в медицине в связи с их низкой стоимостью [157]. Лекарственные препараты на их основе применяют для лечения различных инфекционных заболеваний дыхательных, мочевыводящих путей, печени и желудочно-кишечного тракта. В табл. 15 представлены структурные формулы антибиотиков, их константы кислотности (pK_a) и параметры гидрофобности ($\log P$). Амоксициллин представляет собой *p*-гидрокси аналог ампициллина. Эти вещества имеют pK_a в диапазоне 2.6 – 7.4, поэтому они полностью ионизированы при pH больше 9.3.

Таблица 15. Структурная формула, константы кислотности pK_a и показатель гидрофобности $\log P$ ¹ изучаемых антибиотиков.

Антибиотик	Структурная формула	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	$\log P$
Амоксициллин		2.6	7.2	9.6	0.88
Ампициллин		2.6	7.4	-	1.48

¹ рассчитано с использованием программного обеспечения Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software Solaris V8.14 (© 1994-2005 ACD/Labs)

Традиционно антибиотики пенициллинового ряда определяют с использованием различных биологических методов. Несмотря на высокую чувствительность они являются не специфичными и не количественными, кроме того, зачастую оказывается сложно различить ампициллин и амоксициллин. Большинство аналитических методик по определению этих антибиотиков основано на использовании ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием [158]. Несколько работ также описывают применение капиллярного электрофореза, в частности вариант мицеллярной электрокинетической хроматографии [159], в связи с высокой селективностью и широкой применимостью этого метода.

Низкая концентрационная чувствительность капиллярного электрофореза может ограничивать использование этого метода в случаях, когда необходимо определять вещества на очень низких уровнях концентраций. В некоторых случаях даже использование различных вариантов улучшения чувствительности не позволяет достичь низких пределов обнаружения, в этом случае целесообразным может оказаться их комбинирование. В нашей работе рассмотрена возможность сочетания предварительного он-лайн концентрирования с последующей дериватизацией в капилляре при определении амоксициллина и ампициллина методом микроэмульсионной электрокинетической хроматографии с использованием микроэмульсий типа «масло в воде» (М/В МЭЭКХ).

6.1.1. Офф-лайн дериватизация антибиотиков

В связи с собственным низким коэффициентом молярного поглощения зачастую проводят дериватизацию антибиотиков для увеличения чувствительности их последующего определения. Согласно литературным данным, эта реакция протекает в щелочном буферном растворе в присутствии нуклеофила и при высокой температуре. В этих условиях реакция протекает порядка 1 часа [160].

В качестве реагента был выбран 2,3-нафталиндиальдегид (НДА), широко используемый для дериватизации веществ, содержащих первичную аминогруппу. Исследовано влияние реакционной среды на степень протекания реакции на примере ампициллина. Дериватизацию проводили с использованием четырехкратного избытка

НДА в среде вода-ацетонитрил (75:25, об.%) и микроэмульсионной среде. Под водно-ацетонитрильной средой предполагается смесь 10 мМ боратного буферного раствора с рН 9.3 (75%) и ацетонитрила (25%). Микроэмульсионная среда состава 3.3 мас.% ДДСН, 0.8 мас.% гептана, 8.0 мас.% бутанола-1 и 87.9 мас.% 10 мМ боратного буферного раствора была выбрана как наиболее широко используемый фоновый электролит для разделения веществ в методе МЭЭКХ.

Степень протекания реакции оценивали по убыли концентрации дериватирующего агента. В случае смеси вода-ацетонитрил реакция протекла практически полностью при жестких условиях – при температуре 60 °С в течение 60 мин. При использовании М/В микроэмульсии в качестве реакционной среды время реакции составило порядка 20 мин при комнатной температуре 25 °С. В обоих случаях выход реакции составил 98%. Результаты получены с использованием двух хроматографических методов – обращенно-фазовой ВЭЖХ и микроэмульсионной жидкостной хроматографии – по убыли концентраций исходных веществ. После протекания реакции в течение фиксированного времени ее останавливали путем изменения рН реакционной среды до 3.0, затем проводили анализ полученной смеси.

При дериватизации ампициллина в среде вода-ацетонитрил при 25 °С за 24 часа степень протекания реакции составила менее 10%. Таким образом, при комнатной температуре реакция в микроэмульсионной среде ускоряется более чем в 3800 раз по сравнению с водно-ацетонитрильной средой при той же температуре. Этот эффект можно объяснить уникальным строением микроэмульсий, капли органической фазы которых могут выступать в роли микрореакторов. Значение гидрофобности $\log P$ для НДА составляет 1.58, что близко к $\log P$ для исследуемых антибиотиков (табл. 15). Это означает, что АМП и НДА, схожие по гидрофобности, концентрируются в микроэмульсионных каплях и быстро реагируют.

Таким образом, показано, что использование М/В микроэмульсии в качестве реакционной среды позволяет значительно ускорить дериватизацию антибиотиков с НДА при комнатной температуре, что делает возможным проведение этой реакции в капилляре в режиме он-лайн.

6.1.2. Он-лайн дериватизация антибиотиков

Внутрикапиллярная дериватизация ампициллина и амоксициллина с НДА может быть проведена путем последовательного гидродинамического ввода смеси антибиотиков и раствора НДА с последующим приложением напряжения, как показано на рис. 51.

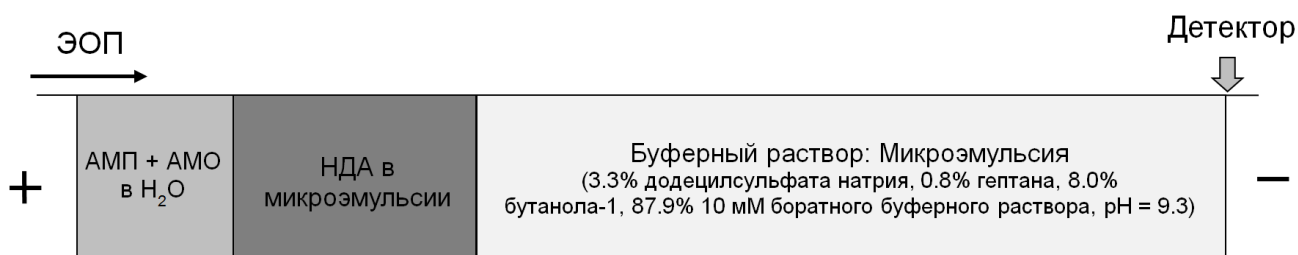


Рис. 51. Схема он-лайн дериватизации антибиотиков с НДА в капилляре.

Были исследованы следующие последовательности при вводе пробы: НДА-проба и проба-НДА. Оказалось, что НДА следует вводить в капилляр перед зоной пробы антибиотиков, в противном случае реакция не протекает. При данных условиях ввода пробы антибиотики в анионной форме практически не проникают в отрицательно заряженные капли микроэмульсии и мигрируют вместе с ЭОП быстрее, чем НДА. Таким образом, АМП и АМО проходят через зону НДА и реагируют с ним, а затем продукты реакции делятся в капилляре в соответствии с электрофоретической подвижностью.

Кроме того, изучено влияние на степень протекания дериватизации различных параметров, таких как температура, время смешения реагирующих зон и время реакции, концентрация и длина зоны НДА.

6.1.2.1. Влияние времени смешения реагирующих зон

После последовательного ввода зон НДА и антибиотиков в капилляр необходимо, чтобы АМП и АМО проникли в зону дериватирующего агента; эти зоны должны быть смешаны при приложенном напряжении перед проведением он-лайн дериватизации. При постоянном значении напряжения +20 кВ было исследовано

влияние времени смешения (3-30 сек), определяющего степень смешения реагентов, на степень протекания реакции. Как показано на рис. 52, она увеличивается при изменении времени смешения с 0 до 12 сек, а затем быстро уменьшается. Последний эффект может быть объяснен тем, что антибиотики быстро проходят через зону НДА и практически не успевают с ним прореагировать. Таким образом, максимальный выход реакции для обоих антибиотиков был достигнут при приложении напряжения +20 кВ в течение 12 сек.

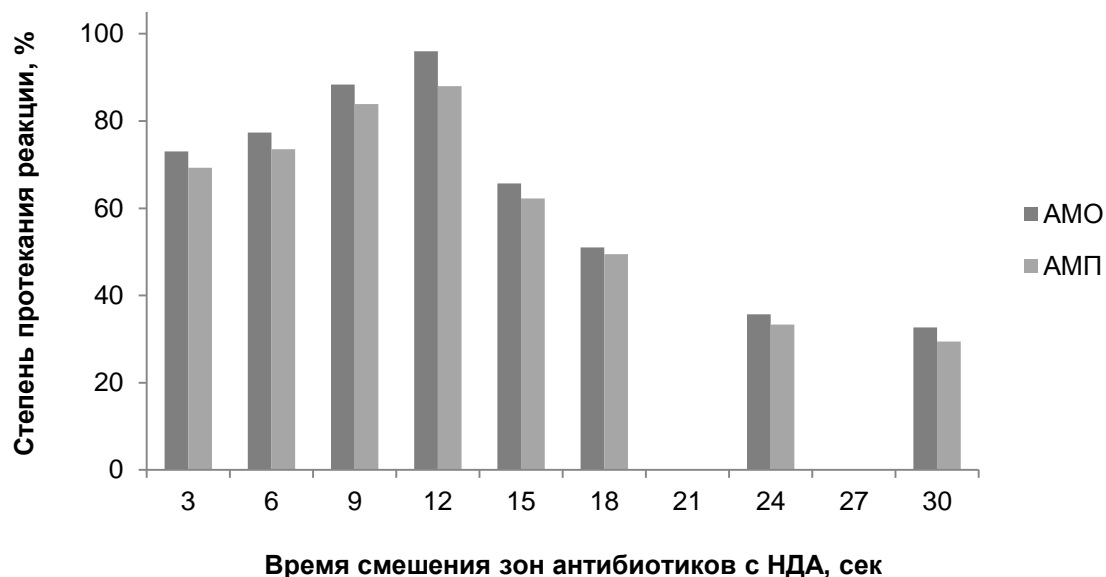


Рис. 52. Зависимость степени протекания реакции он-лайн дериватизации от времени смешения зон антибиотиков с НДА при напряжении +20 кВ.

6.1.2.2. Влияние времени протекания реакции

После стадии смешения зон антибиотиков и зоны НДА при +20 кВ реакцию проводили при значении напряжения +1 кВ (с использованием программирования напряжения во время анализа). В этих условиях компоненты пробы медленно мигрируют сквозь зону реагента, при небольшом перемешивании протекает реакция. Изучено влияние времени дериватизации (варьирование от 4 до 16 мин) на степень ее протекания. При повышении времени реакции от 4 до 8 мин выход увеличился с 57 до 93% для АМП и с 61 до 95% для АМО. Когда реакция протекала 10 мин, степень превращения составила более 98% для обоих аналитов и не менялась при дальнейшем

повышении времени протекания реакции, это значение и было выбрано для дальнейших экспериментов. После проведения он-лайн дериватизации напряжение снова увеличили до +20 кВ для разделения продуктов и избытка НДА.

6.1.2.3. Влияние концентрации и длины зоны раствора НДА

Для полного протекания дериватизации необходимо использовать избыток НДА по отношению к антибиотикам, особенно это важно при проведении реакции в капилляре в режиме он-лайн для получения воспроизводимых результатов с полным разрешением пиков. Для варьирования длины зоны дериватирующего агента использовали растворы с концентрациями 400 мг/л НДА и 100 мг/л для каждого антибиотика.

Параметры для гидродинамического ввода раствора пробы АМП и АМО оставались постоянными (25 мбар в течение 10 сек), в то время как время ввода раствора НДА варьировали в диапазоне от 10 до 30 сек (при постоянном давлении 25 мбар). Как показано на рис. 53, при времени ввода НДА 20 сек степень протекания реакции составила 98% и больше не менялась при дальнейшем увеличении времени ввода реагента.

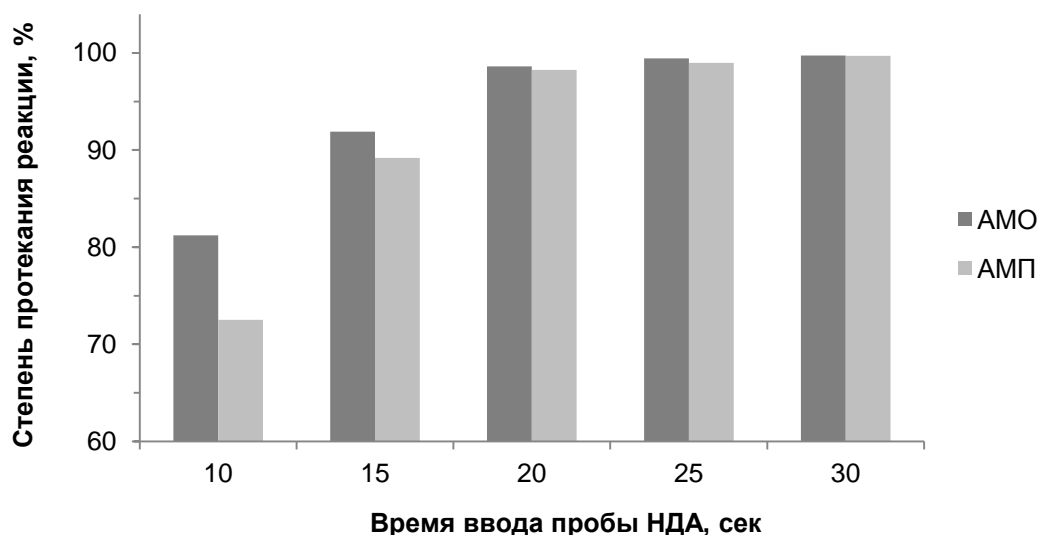


Рис. 53. Зависимость степени протекания реакции он-лайн дериватизации от времени ввода раствора НДА при давлении 25 мбар.

С повышением концентрации раствора НДА от 100 до 800 мг/л выход реакции увеличился с 43 до 100% для ампициллина и с 48 до 100% для амоксициллина. Однако 800 мг/л раствор НДА оказался слишком концентрированным, широкая зона реагента при вводе пробы часто вызывала забивание капилляра. Таким образом, оптимальной оказалась концентрация 400 мг/л НДА при гидродинамическом вводе 25 мбар в течение 20 сек.

6.1.2.4. Влияние температуры

Влияние температуры, контролируемой при он-лайн дериватизации и последующем анализе, было исследовано в диапазоне от 20 до 50 °С. Было установлено, что повышение температуры привело к увеличению степени протекания дериватизации для обоих антибиотиков, общее время анализа снизилось с 70 до 20 мин. Однако, при 50 °С наблюдалось перекрывание пиков продуктов реакции для АМП и АМО. Таким образом, в качестве оптимальной была выбрана температура 40 °С.

Таким образом, в качестве оптимальных были выбраны следующие условия он-лайн дериватизации: последовательный ввод при 25 мбар раствора НДА в течение 20 сек и раствора антибиотиков в течение 10 сек, смешивание реагирующих зон при +20 кВ в течение 12 сек, затем проведение он-лайн дериватизации при +1 кВ в течение 10 мин. В этих условиях степень протекания реакции составила 100% для обоих антибиотиков. Полученная электрофореграмма продуктов внутрикапиллярной дериватизации АМП и АМО с НДА представлена на рис. 54.

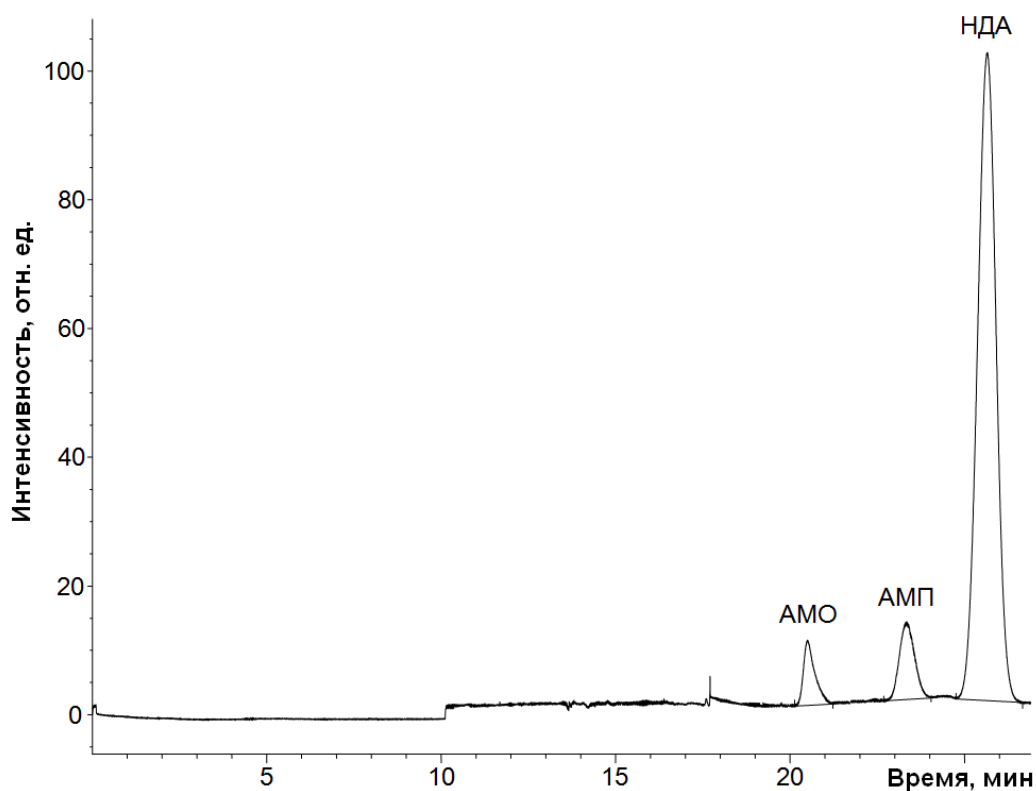


Рис. 54. Электрофореграмма продуктов дериватизации АМП и АМО ($C = 100$ мг/л) с избытком НДА. Фоновый электролит: микроэмульсия типа «масло в воде», содержащая 3.3 мас.% ДДСН, 0.8 мас.% н-гептана, 8.0 мас.% бутанола-1, 87.9 мас.% 10 мМ боратного буферного раствора (рН 9.3). Условия разделения: кварцевый капилляр общей длиной 64.5 см (эффективной длиной 56 см) и диаметром 50 мкм; температура 40 °С, детектирование при 230 нм. Условия дериватизации: гидродинамический ввод 400 мг/л раствора НДА (25 мбар/20 сек), затем ввод пробы (25 мбар/10 сек); смешивание зон при +20 кВ в течение 12 сек, реакция при +1 кВ в течение 10 мин, затем разделение аналитов при +20 кВ.

Было выбрано детектирование при 230 нм (максимумы спектров поглощения продуктов дериватизации АМП и АМО с НДА), при этом сам дериватизирующий агент имеет три максимума – при 225, 240 и 261 нм (рис. 55).

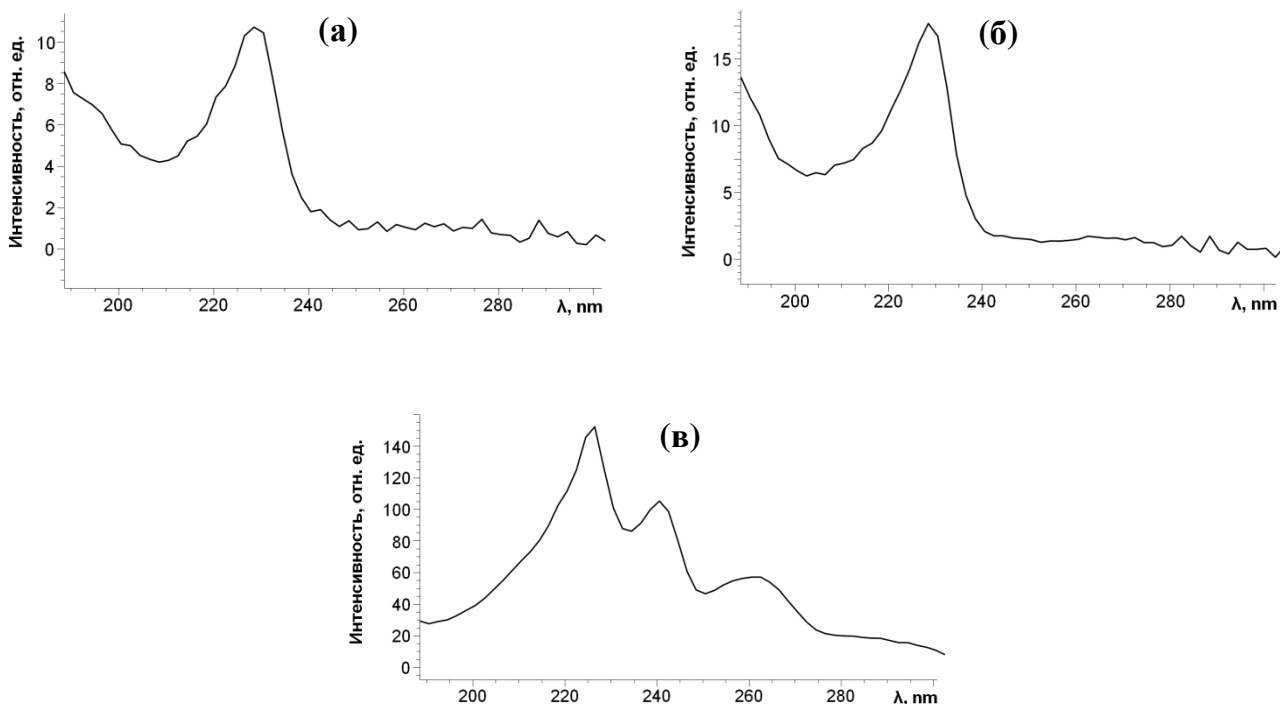


Рис. 55. Спектры поглощения продукта дериватизации АМО с НДА (а), АМП с НДА (б) и НДА (в).

6.1.3. Сочетание он-лайн концентрирования с последующей дериватизацией антибиотиков в капилляре

Для значительного улучшения чувствительности определения ампициллина и амоксициллина методом МЭЭКХ с внутрикапиллярной дериватизацией предложено сочетание этого подхода с предварительным он-лайн концентрированием аналитов. Рассмотрены несколько наиболее эффективных вариантов преконцентрирования антибиотиков.

6.1.3.1. Электростэкинг

Вариант концентрирования заряженных аналитов, в основе которого лежит электрокинетический ввод компонентов пробы, позволяет сконцентрировать вещества до 1000 раз, при этом важным условием является подавление электроосмотического потока буферного раствора. Однако при определении антибиотиков этот вариант имеет ограничения, связанные с высоким значением ЭОП фонового электролита – микроэмульсии типа «масло в воде». В процессе электрокинетического ввода пробы в

режиме отрицательной полярности микроэмульсия, заполняющая капилляр, с высокой скоростью мигрирует в направлении входного конца капилляра, препятствуя вводу пробы. Таким образом, данный вариант концентрирования аналитов оказался неприемлемым.

6.1.3.2. Стэкинг с большим объемом пробы и обращением полярности

Стэкинг с большим объемом вводимого образца и обращением полярности основан на концентрировании заряженных аналитов, сопровождающимся одновременным удалением матрицы пробы из кварцевого капилляра. Растворенные в воде ампициллин и амоксициллин (в анионной форме) гидродинамически вводили в капилляр в течение длительного времени, полностью заполнив весь объем капилляра. Далее подавали напряжение в режиме отрицательной полярности, при этом капилляр с выходного конца начинал постепенно заполняться фоновым электролитом – раствором М/В микроэмульсии. В первоначальный момент времени ток в капилляре при наложении электрического поля практически отсутствовал в связи с низкой электрической проводимостью раствора пробы; по мере заполнения капилляра микроэмульсией ток начинал возрастать. При этом отрицательно заряженные компоненты пробы концентрировались в конце зоны пробы на границе с рабочим буферным раствором. Окончание процесса удаления матрицы пробы фиксировали по изменению силы тока – при достижении порядка 95% от значения тока, соответствующего полностью заполненному буферным раствором капилляру, подачу напряжения прекращали, входной конец капилляра помещали в раствор фонового электролита и начинали анализ.

При сочетании этого варианта концентрирования с последующей он-лайн дериватизацией антибиотиков важно учитывать тот факт, что зона НДА должна быть введена перед зоной антибиотиков для последующего протекания реакции, как было установлено ранее в п. 6.1.2. Поэтому стадия преконцентрирования должна также включать введение в капилляр зоны дериватирующего агента.

Схема стэкинга с большим объемом пробы и обращением полярности представлена на рис. 56. Вначале раствор антибиотиков гидродинамически вводили

при 940 мбар (процедура промывки) (рис 56а); было установлено, что время 1 мин достаточно для полного заполнения капилляра раствором пробы. Затем небольшая зона раствора НДА в микроэмульсии была гидродинамически введена с выходного конца капилляра (-25 мбар в течение 10 сек) (рис 56б), после раствор НДА сменили на фоновый электролит (М/В микроэмульсию) и приложили напряжение -10 кВ (в режиме обращения полярности) (рис 56в). При достижении 95% тока окончания процесса подачу напряжения прекратили.

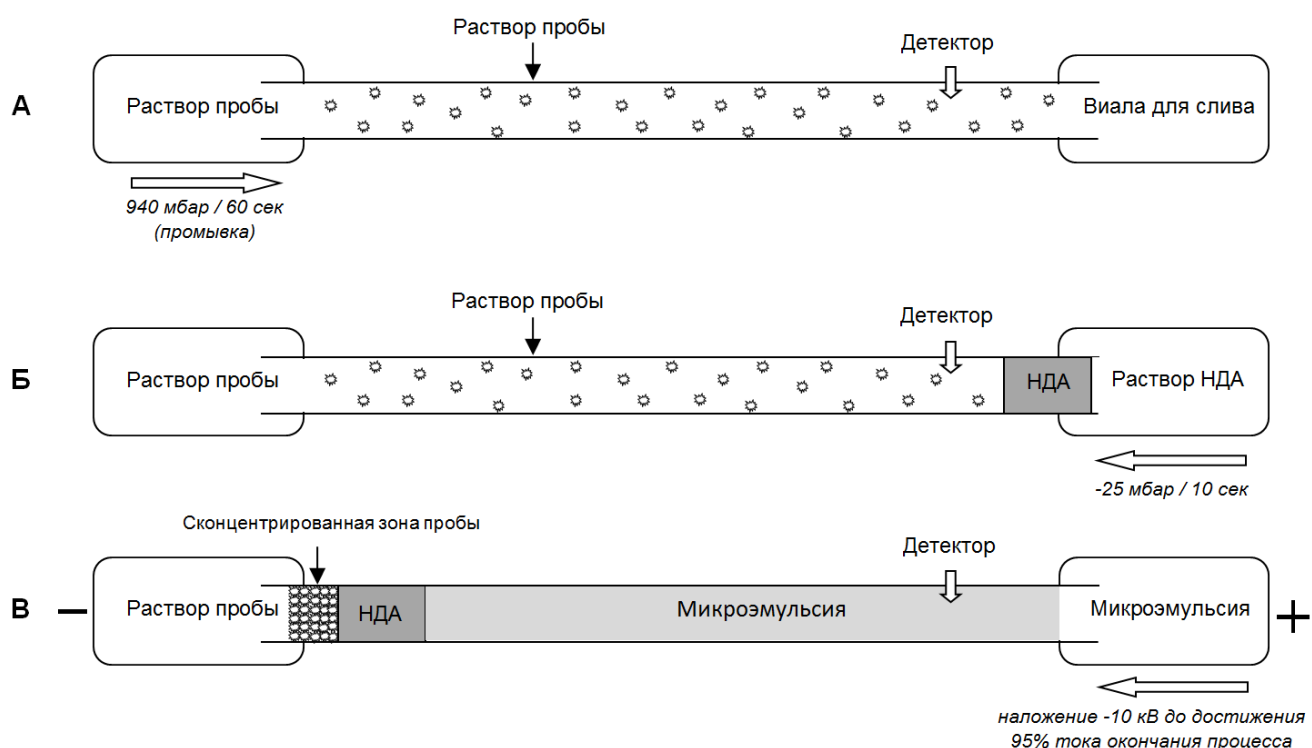


Рис. 56. Схема стэкинга с большим объемом вводимой пробы и обращением полярности при определении антибиотиков методом М/В МЭЭКХ.

Таким образом, по окончании стадии предварительного он-лайн концентрирования зона НДА находится перед сконцентрированной зоной антибиотиков. После стэкинга полярность электродов переключили на положительную для проведения стадии он-лайн дериватизации и последующего разделения продуктов реакции. Условия реакции НДА с АМП и АМО такие же, как описано в п. 6.1.2. На рис. 57 представлена электрофореграмма смеси ампициллина и амоксициллина с концентрациями 0.5 мг/л, полученная в оптимальных условиях.

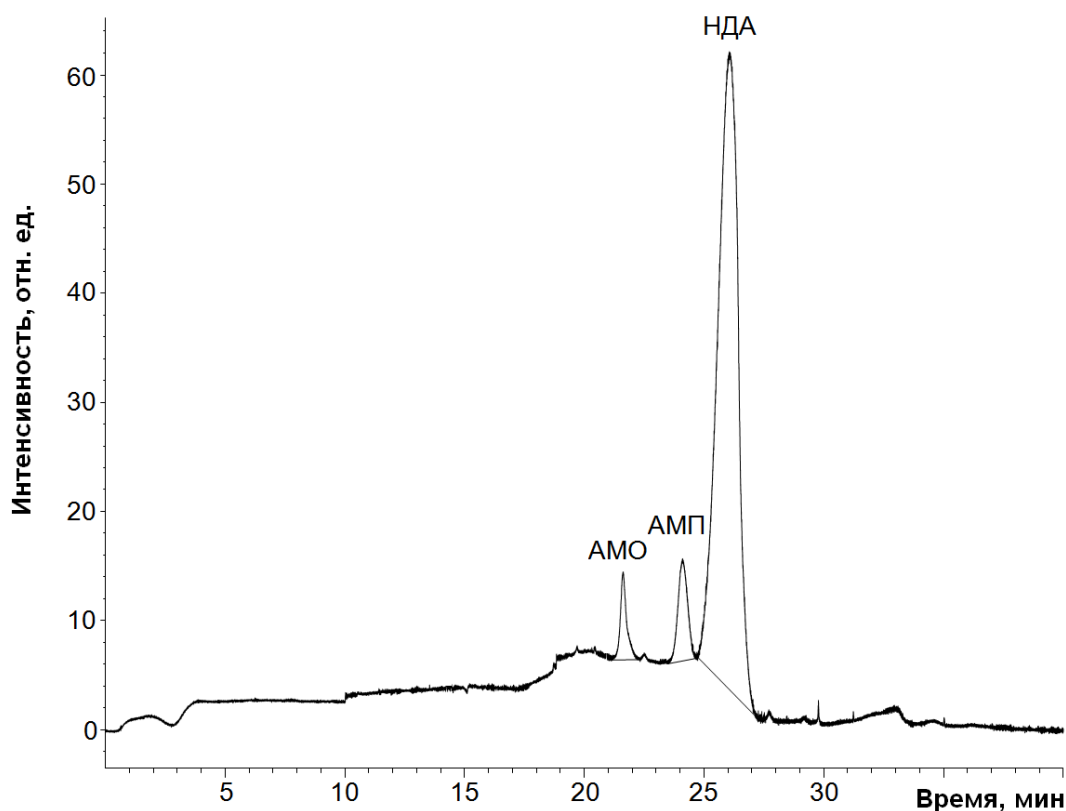


Рис. 57. Электрофореграмма продуктов дериватизации АМП и АМО ($C = 0.5$ мг/л) с избытком НДА. Ввод пробы: гидродинамический ввод раствора антибиотиков (940 мбар в течение 60 сек), ввод зоны НДА с конца капилляра (-25 мбар в течение 10 сек), затем приложение -10 кВ (в режиме обращения полярности) до достижения 95% тока окончания процесса. Остальные условия указаны в подписи к рис. 54.

Сочетание стэкинга с большим объемом пробы и обращением полярности с последующей он-лайн дериватизацией позволило добиться снижения пределов обнаружения более чем в 300 раз для обоих антибиотиков по сравнению со стандартным вариантом их определения методом капиллярного электрофореза. Метрологические характеристики разработанного подхода представлены в разделе 6.1.4.

6.1.4. Оценка метрологических характеристик

Градуировочные зависимости оказались линейными в диапазоне концентраций 50-1000 мкг/л для продуктов АМП и АМО после внутрикапиллярной дериватизации с

НДА. Для построения зависимости использовали пять уровней концентраций по три параллельных измерения в каждой точке. Уравнения градуировочных зависимостей, коэффициенты корреляции, а также пределы обнаружения ($C_{\text{мин}}$) антибиотиков представлены в табл. 16. Воспроизводимость оценивали с использованием растворов АМП и АМО с концентрациями 500 мкг/л в четырех повторностях в течение одного дня. Относительное стандартное отклонение (s_r) рассчитывали по площадям пиков продуктов дериватизации.

Таблица 16. Метрологические характеристики определения антибиотиков методом М/В МЭЭКХ в сочетании со стэкингом с большим объемом пробы и обращением полярности и он-лайн дериватизацией.

Аналит	Линейный диапазон градуировочного графика (мкг/л)	Уравнение градуировочной зависимости	R	s_r , % (n=4, P=0.95)	$C_{\text{мин}}$, мкг/л
Амоксициллин	50-1000	$y = 1.147x + 2.442$	0.99	8.4	20
Ампициллин	50-1000	$y = 1.097x + 2.258$	0.99	6.7	20

6.1.5. Определение ампициллина и амоксициллина в моче

Применимость разработанного подхода по определению антибиотиков продемонстрирована на примере определения ампициллина и амоксициллина в моче. В медицинской практике АМП и АМО используют как правило в таблетированной форме с минимальным содержанием целевых компонентов 250 мг и максимальным – 875 мг. После приема лекарственного препарата антибиотики быстро всасываются стенками кишечника, максимальная концентрация веществ в крови при этом достигается спустя 1-2 часа. Приблизительно 60% дозы выводится с мочой в исходной форме спустя 6 часов и около 20% в виде метаболитов (пенициллиновая и пенамальдовая кислоты) [161]. Учитывая необходимость разбавления образцов мочи в

процессе пробоподготовки, необходим чувствительный метод для определения антибиотиков.

Образец мочи, содержащий определяемые компоненты, анализировали методом М/В МЭЭКХ в сочетании с предварительным он-лайн концентрированием и внутрикапиллярной дериватизацией, полученная электрофореграмма представлена на рис. 58.

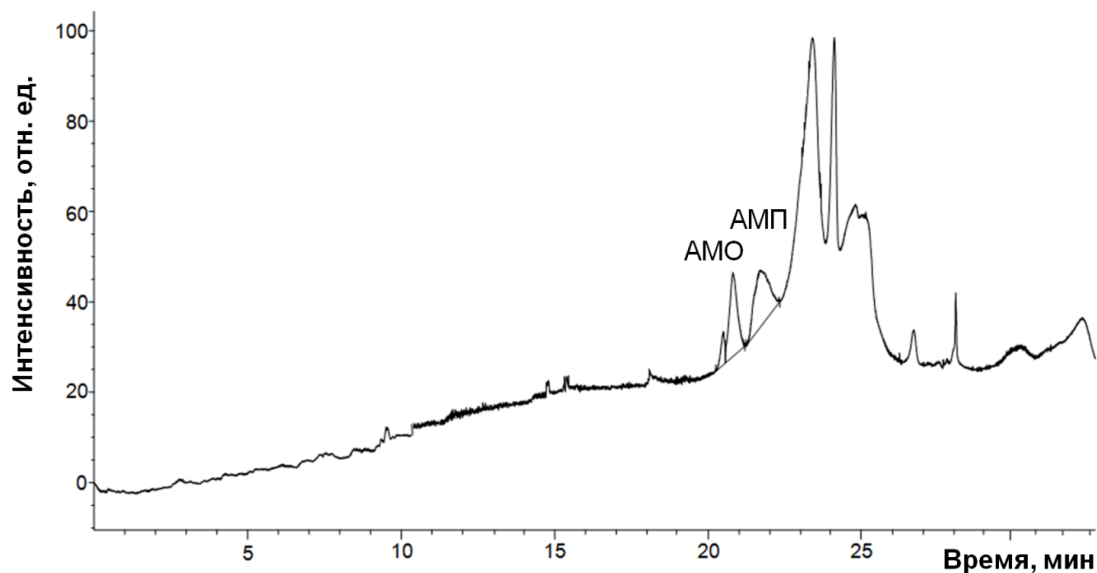


Рис. 58. Электрофореграмма образца мочи, содержащей АМП и АМО ($C = 1$ мг/л с учетом разбавления образца в процессе пробоподготовки), проанализированная методом М/В МЭЭКХ после стэкинга с большим объемом вводимой пробы и обращением полярности и он-лайн дериватизацией антибиотиков с НДА. Условия разделения указаны в подписи к рис. 57.

Образец мочи, содержащий 30 мг/л ампициллина и амоксициллина, смешали с этанолом (1:2) и затем разбавили деионизованной водой (1:10). После пробоподготовки разбавленный образец мочи содержал 1 мг/л антибиотиков. Идентификацию пиков проводили путем сравнения времен миграции аналитов для стандартной смеси и реального объекта, а также по спектрам поглощения. Точность разработанного подхода оценивали по известной концентрации добавки антибиотиков в исходный образец мочи; содержание амоксициллина составило (1.02 ± 0.05) мг/л, ампициллина – (1.04 ± 0.06) мг/л, что является близким к исходной концентрации в пробе после разбавления в процессе пробоподготовки (1 мг/л). Полученные

результаты демонстрируют применимость разработанного подхода для анализа антибиотиков в реальных объектах.

6.2. Концентрирование с последующей дериватизацией в капилляре при определении антибиотиков методом В/М МЭЭКХ

Уникальное дифильное строение как прямых, так и обратных микроэмульсий позволяет использовать эти фазы в качестве реакционных сред – капли масла или воды могут выступать в виде микрореакторов. В предыдущем разделе была изучена кинетика дериватизации антибиотиков с НДА, и было установлено, что в среде прямой микроэмульсии типа «масло в воде» наблюдалось значительное ускорение реакции (более, чем в 3800 раз) в сравнении со стандартной реакционной смесью ацетонитрил-вода (25:75, об. %).

В работе изучена возможность проведения он-лайн дериватизации ампициллина с НДА в среде обратной микроэмульсии («вода в масле») с последующим определением продуктов реакции методом В/М МЭЭКХ. В качестве реакционной среды и фонового электролита была выбрана микроэмульсия состава 5 мас.% ДДСН, 80 мас.% бутанола-1 и 15 мас.% 70 мМ фосфатного буферного раствора, рН 7.0.

Проведение дериватизации в режиме офф-лайн при использовании четырехкратного избытка НДА в среде В/М МЭ показало, что реакция полностью протекает менее чем за 1 мин уже при комнатной температуре, что делает возможным проведение этой реакции в капилляре. Порядок ввода зон раствора антибиотика и реагента при проведении он-лайн реакции оказался таким же, как и в случае М/В МЭЭКХ: зону НДА необходимо вводить перед зоной пробы, в противном случае реакция не протекает. Варьирование времени протекания внутрикапиллярной дериватизации показало, что использование градиента напряжения во время анализа не требуется, т.е. реакция полностью протекает при быстрой миграции ампициллина через зону НДА при высоком напряжении, таким образом, в среде обратной микроэмульсии реакция, вероятно, протекает за несколько секунд.

Для дополнительного улучшения чувствительности определения ампициллина методом В/М МЭЭКХ изучена возможность сочетания этого метода с одним из наиболее эффективных вариантов он-лайн концентрирования заряженных аналитов – электростэкинга. Обратные микроэмульсии типа «вода в масле» в отличие от прямых («масло в воде») обладают более низкой электрической проводимостью, что является важной характеристикой фонового электролита для осуществления этого варианта концентрирования.

Перед электрокинетическим вводом пробы важно предварительно ввести зону дериватирующего агента для последующего осуществления он-лайн реакции. Основные стадии электростэкинга представлены на рис. 59. После промывки капилляра раствором В/М микроэмульсии на первой стадии гидродинамически вводили зону НДА (20 мбар в течение 10 сек) (рис 59а), затем зону деионизованной воды (10 мбар в течение 30 сек) (рис 59б). После этого входной конец капилляра помещали в водный раствор АМП и прикладывали напряжение в режиме отрицательной полярности (-4 кВ в течение 300 сек). В этих условиях ампициллин, находящийся в анионной форме, мигрирует в направлении анода и концентрируется на границе раздела фаз зоны дериватирующего агента и раствора антибиотика (рис 59в).

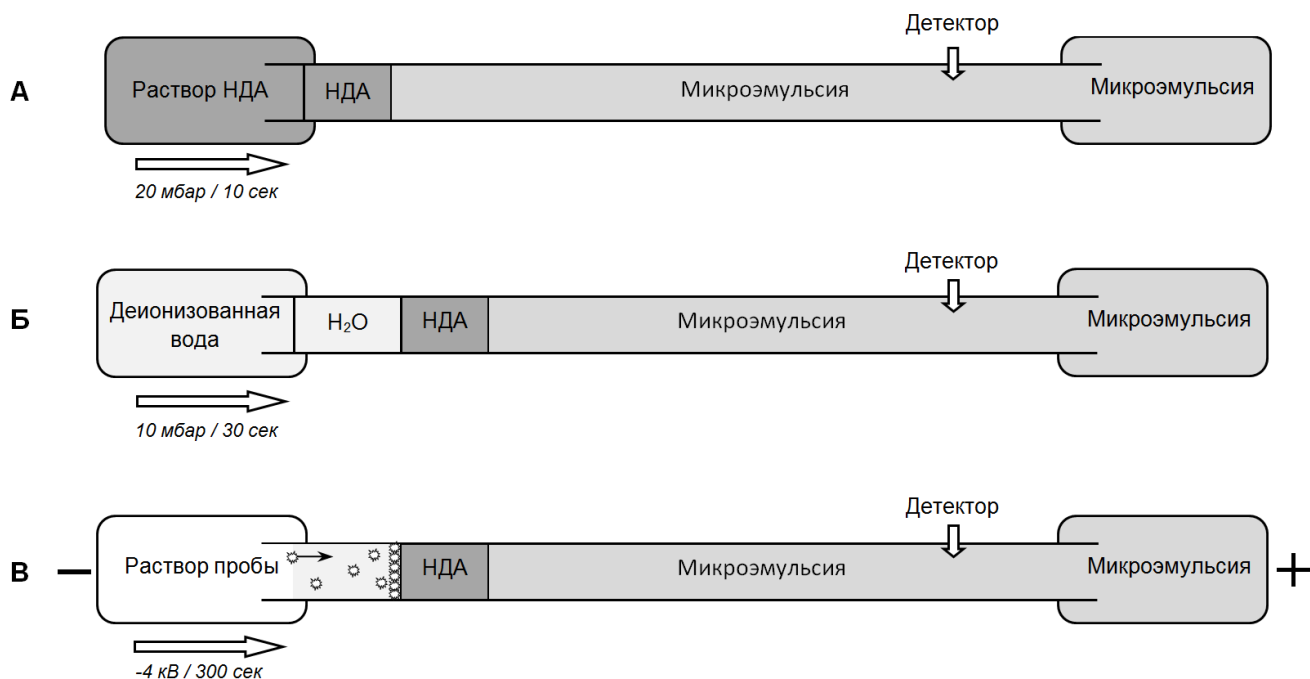


Рис. 59. Схема электростэкинга при определении АМП методом В/М МЭЭКХ с предварительной он-лайн дериватизацией с НДА.

После стадии ввода пробы входной конец капилляра помещают в раствор В/М микроэмульсии и прикладывают напряжение -30 кВ для проведения реакции с последующим разделением продуктов реакции. На рис. 60 представлена электрофореграмма АМП в варианте В/М МЭЭКХ после стадии электростэкинга и внутрикапиллярной реакции с НДА. Сочетание этих подходов позволило добиться снижения пределов обнаружения антибиотика более чем в 1500 раз, $C_{\text{мин}}$ составил 4 мкг/л.

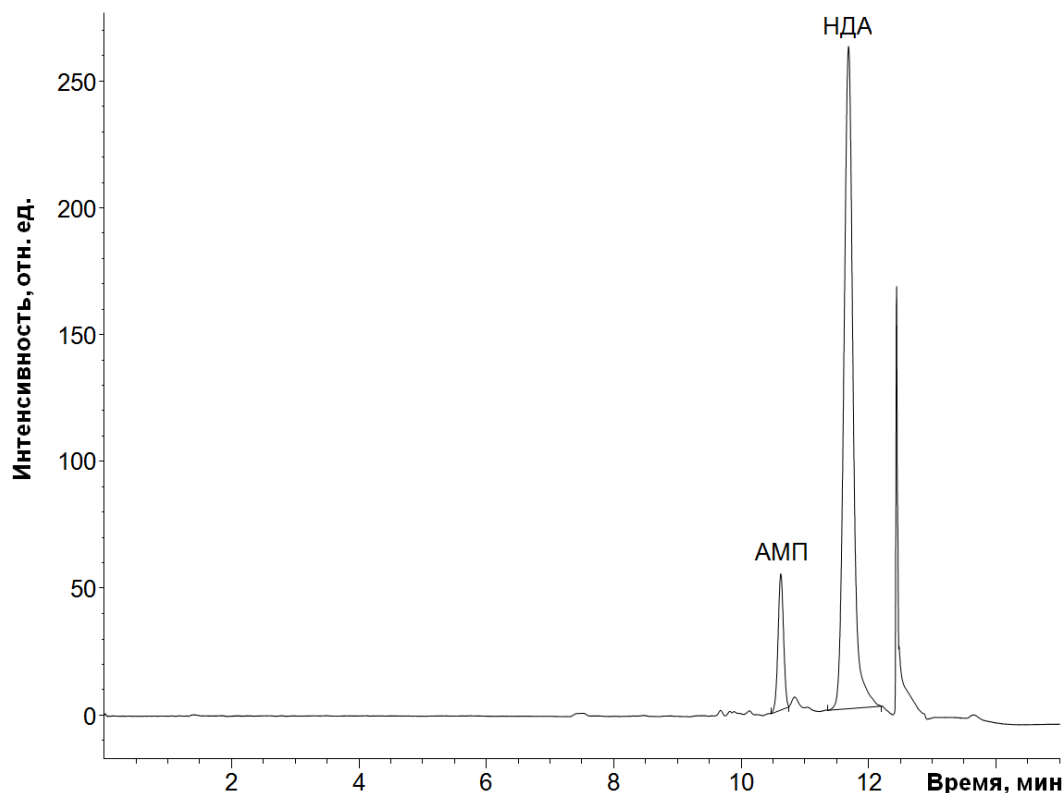


Рис. 60. Электрофореграмма продукта дериватизации АМП ($C = 1$ мг/л в воде) с избытком НДА ($C = 3000$ мг/л в В/М микроэмульсии). Ввод пробы: гидродинамический ввод зоны НДА (20 мбар/ 10 сек), ввод зоны воды (10 мбар/ 30 сек), затем электрокинетический ввод раствора АМП (-4 кВ/ 300 сек). Фоновый электролит: В/М микроэмульсия (5 мас.% ДДСН, 80 мас.% бутанола-1, 15 мас.% 70 мМ фосфатного буферного раствора, рН 7.0). Условия разделения: кварцевый капилляр общей длиной 48.5 см (эффективной длиной 40 см) и диаметром 50 мкм, температура 40 °С, напряжение -30 кВ, детектирование при 230 нм.

Сочетание нескольких вариантов увеличения чувствительности в капиллярном электрофорезе позволяет значительно снизить пределы обнаружения аналитов, до уровня концентраций мкг/л и ниже. Помимо электростэкинга и он-лайн дериватизации ампициллина с НДА предложено также использование капилляра с увеличенной длиной оптического пути – «Z-ячейкой»; электрофореграмма АМП для этого случая представлена на рис. 61.

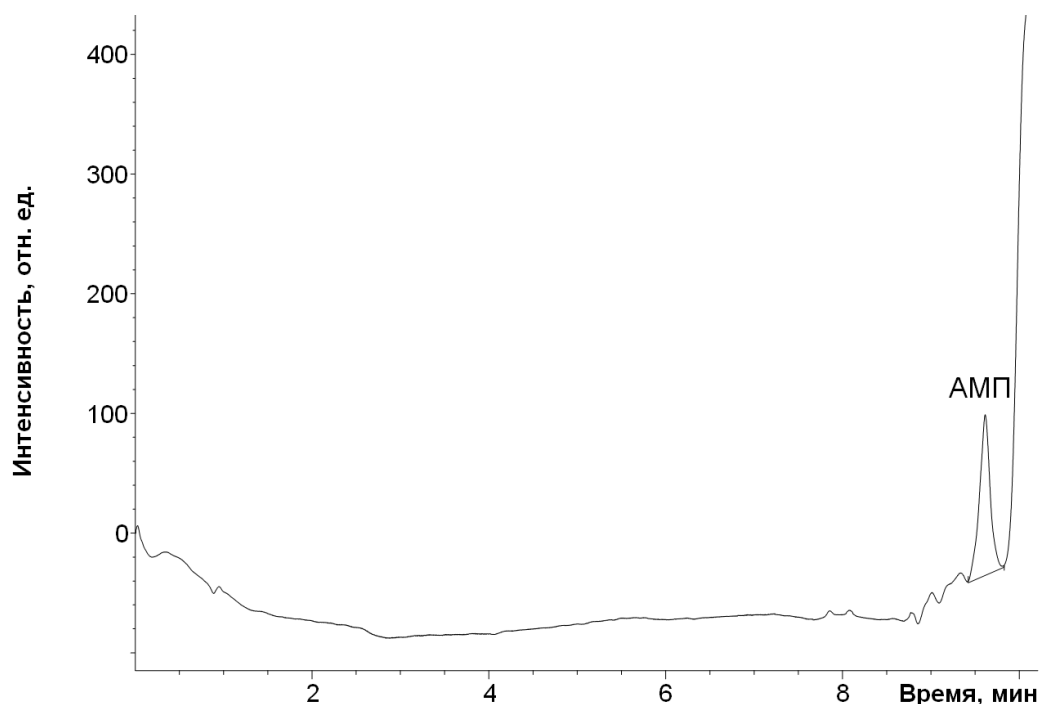


Рис. 61. Электрофореграмма продукта дериватизации АМП ($C = 100$ мкг/л в воде) с избытком НДА ($C = 3000$ мг/л в В/М микроэмульсии). Ввод пробы: гидродинамический ввод зоны НДА (10 мбар/ 5 сек), ввод зоны воды (10 мбар/ 10 сек), затем электрокинетический ввод раствора АМП (-4 кВ/ 300 сек). Условия разделения: кварцевый капилляр общей длиной 48.5 см (эффективной длиной 40 см), диаметром 75 мкм и увеличенной длиной оптического пути (Z-ячейка). Остальные условия указаны в подписи под рис. 60.

Сочетание всех рассмотренных вариантов улучшения чувствительности позволяет снизить предел обнаружения ампициллина в 10^4 раз, $C_{\text{мин}} = 0.6$ мкг/л. Установлено, что использование в капиллярном электрофорезе микроэмульсий типа «вода в масле» возможно в сочетании с капилляром типа «Z-ячейка»; при работе с этими фоновыми электролитами не происходит забивания капилляра.

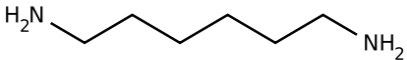
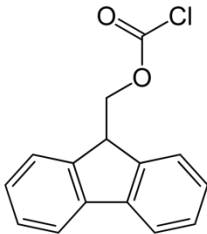
Таким образом, предложенный подход характеризуется высокой чувствительностью, простотой, возможностью автоматизации, экспрессностью (время анализа составляет менее 10 мин). Установлено, что дериватизация антибиотиков с НДА значительно ускоряется в среде прямой микроэмульсии («масло в воде»), при этом не требуется дополнительного нагревания. Протекание же этой реакции в среде обратной микроэмульсии («вода в масле») показало еще большее ускорение реакции

(время реакции при комнатной температуре составляет порядка нескольких секунд), что связано с уникальным строением данного рода растворителей. Проведение реакции дериватизации в капилляре в режиме он-лайн позволяет значительно сократить время пробоподготовки, снизить расход дорогостоящих реагентов – для одного анализа требуется порядка нескольких нл раствора дериватирующего агента.

6.3. Он-лайн дериватизация гексаметилендиамина в среде В/М микроэмульсий

Применение микроэмульсий типа «вода в масле» в качестве уникальных реакционных сред продемонстрировано на примере реакции дериватизации гексаметилендиамина (ГМДА) с флуоренилметилоксикарбонил хлоридом (ФМОК). Формулы реагирующих веществ представлены в табл. 17.

Таблица 17. Структурная формула, молярная масса и показатель гидрофобности $\log P$ ¹ определяемого вещества и дериватирующего агента.

Вещество	Сокращение	Структурная формула	М, г/моль	logP
Гексаметилендиамин	ГМДА		116	0.04
Флуоренилметилокси-карбонил хлорид	ФМОК		259	4.58

¹ рассчитано с использованием программного обеспечения Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software Solaris V8.14 (© 1994-2005 ACD/Labs)

Определение ГМДА является важной аналитической задачей, это вещество образуется при гидролизе полигексаметиленгуанидина гидрохлорида (ПГМГ) – полимерного биоцидного препарата широкого спектра действия, который используется в качестве действующего вещества в составе многих современных дезинфицирующих средств, токсичных для человека. Предельно-допустимая концентрация ПГМГ составляет порядка 100 мкг/л, поэтому методика определения полимера или продуктов его гидролиза должна обладать высокой чувствительностью.

ГМДА обладает низким поглощением в УФ области спектра, что затрудняет его спектрофотометрическое детектирование. Согласно литературным данным, его определение обычно проводят методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием с предварительной дериватизацией с ФМОК. Реакция протекает в щелочной среде в течение 10 мин при высокой температуре [162].

Нами предложен альтернативный способ определения ГМДА методом капиллярного электрофореза в варианте МЭЭКХ с предварительной дериватизацией анализа. Установлено, что проведение реакции в среде микроэмульсии типа «масло в воде» с последующим определением продуктов реакции методом М/В МЭЭКХ сопровождается побочным процессом – гидролизом ФМОК.

При растворении ФМОК в микроэмульсии типа «вода в масле» его гидролиз не происходит, раствор стабилен в течение нескольких часов. Проведение реакции в микроэмульсии состава 5% ДДСН, 80% бутанола-1, 15% 66.7 мМ фосфатного буферного раствора (рН 7.0) показало, что реакция полностью протекает за 2 мин, при этом не требуется дополнительного нагревания.

Проведение он-лайн реакции осуществляли путем последовательного гидродинамического ввода зоны ФМОК, растворенного в В/М микроэмульсии, и ГМДА. При изменении порядка ввода зон реагирующих веществ на электрофореграмме наблюдался лишь пик дериватирующего агента, что может свидетельствовать об отсутствии протекания реакции в этом случае. Дериватизацию проводили с использованием градиента напряжения: -2 кВ в течение 3 мин, затем -30 кВ для разделения продуктов реакции (в режиме обращения полярности). В этих

условиях достигался количественный выход продукта реакции, типичная электрофореграмма представлена на рис. 62.

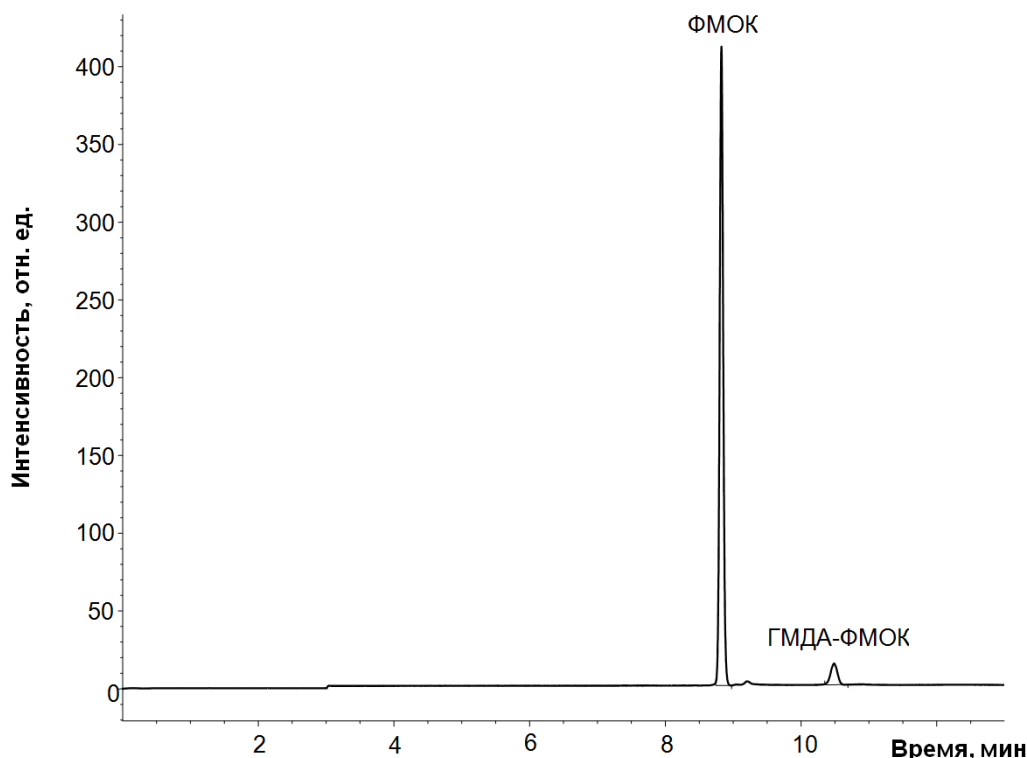


Рис. 62. Электрофореграмма продукта дериватизации ГМДА ($C = 200$ мкг/л в воде) с избытком ФМОК ($C = 2000$ мг/л в В/М микроэмульсии). Условия дериватизации: гидродинамический ввод зоны ФМОК (10 мбар/ 10 сек), затем ГМДА (25 мбар/ 10 сек); проведение реакции при -3 кВ в течение 3 мин, затем разделение веществ при -30 кВ. Условия разделения: кварцевый капилляр общей длиной 33.5 см (эффективной длиной 25 см) и диаметром 50 мкм, температура 30 °С, детектирование при 210 нм. Остальные условия указаны в подписи к рис. 60.

Градуировочная зависимость из расчета продукта дериватизации линейна в диапазоне концентраций ГМДА 10-200 мг/л, уравнение градуировочного графика имеет вид $y = 0.384x - 0.88$ с коэффициентом корреляции, равным 99.9%. Дериватизация с ФМОК позволяет определять ГМДА на уровне концентраций $C_{\text{мин}} = 3$ мг/л. Еще большего увеличения чувствительности можно добиться за счет дополнительного он-лайн концентрирования аналита или использования капилляра с другой геометрией зоны детектирования.

Таким образом, показано, что В/М микроэмульсии могут быть использованы в качестве реакционных сред для проведения дериватизации органических веществ. Уникальное дифильное строение способствует значительному ускорению такого рода реакций по сравнению со стандартными условиями их проведения, что делает возможным проведения дериватизации в капилляре в режиме он-лайн.

Выводы

1. Показано, что в отличие от варианта М/В МЭЭКХ метод В/М МЭЭКХ непригоден для разделения нейтральных гидрофобных веществ одного гомологического ряда, однако он может быть применим для определения полярных веществ. Продемонстрирована возможность разделения неорганических анионов методом В/М МЭЭКХ. Изучено влияние состава В/М микроэмульсий, используемых в качестве фоновых электролитов, на селективность и эффективность разделения анионов.
2. Сравнены электрофоретические подвижности анионов в различных вариантах капиллярного электрофореза. Показано, что порядок миграции аналитов значительно различается для методов МЭЭКХ с использованием микроэмульсий типа «вода в масле» и «масло в воде». Установлено, что скорость миграции неорганических анионов в В/М МЭЭКХ на порядок меньше по сравнению с методами КЗЭ и М/В МЭЭКХ.
3. Продемонстрирована возможность сочетания различных вариантов он-лайн концентрирования с В/М МЭЭКХ. Стэкинг с усилением поля позволяет снизить пределы обнаружения анионов в 10-15 раз, электростэкинг – до 10^3 раз. Предложен новый вариант концентрирования полярных веществ неионогенной природы – свипинг в методе В/М МЭЭКХ.
4. Отмечено значительное ускорение реакций в микроэмульсионной среде на примере дериватизации антибиотиков пенициллинового ряда. Показана возможность проведения реакции ампициллина и амоксициллина с НДА в режиме он-лайн в среде М/В и В/М микроэмульсий, подобраны условия, позволяющие достичь количественного выхода продуктов реакции. Продемонстрирована возможность сочетания концентрирования определяемых компонентов (стэкинг с большим объемом пробы и переключением полярности или электростэкинг) с их последующей дериватизацией в капилляре. Рассчитаны метрологические характеристики предложенного способа определения ампициллина и

амоксициллина. Сочетание рассмотренных подходов позволяет снизить пределы обнаружения антибиотиков в 10^4 раз и достичь пределов обнаружения порядка 0.6 мкг/л.

5. На примере анализа майонеза продемонстрировано значительное упрощение процедуры экстракции сорбиновой и бензойной кислот из объектов с высоким содержанием жира при использовании В/М микроэмульсий в качестве экстрагентов. Время пробоподготовки удалось уменьшить с 2 часов до 2 минут при количественном извлечении веществ.
6. Практическое применение электростэкинга в сочетании с В/М МЭЭКХ показано на примере определения йодид-иона в продуктах питания (куриных яйцах, морской капусте). Пределы обнаружения йодида составили 7 мкг/кг куриного яйца и 9 мкг/кг свежей морской капусты, соответственно.

Список литературы

1. *Jancic B., Ivanovic D., Medenica M., Malenovic A., Dimkovic N.* Development of liquid chromatographic method for fosinoprilat determination in human plasma using microemulsion as eluent. // *J. Chromatogr. A.* 2005. V. 1088. № 1/2. P. 187-192.
2. *Berry N., Yada R., Rousseau D.* Food-grade microemulsions as nano-scale controlled delivery vehicles. / *Food and Industrial Bioproducts and Bioprocessing.* (Ed. Dunford N.T.), NY.: J. Wiley & Sons, Inc. 2012. P. 145-166.
3. *Yuan Y., Li S.-M., Mo F.-K., Zhong D.-F.* Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam. // *Int. J. Pharm.* 2006. V. 321. № 1/2. P. 117-123.
4. *Marsh A., Clark B.J., Altria K.D.* A review of the background, operating parameters and applications of microemulsion liquid chromatography (MELC). // *J. Sep. Sci.* 2005. V. 28. № 15. P. 2023-2032.
5. *Абрамзон А.А.* Поверхностно-активные вещества. Свойства и применение. Л.: Химия. 1981. 304 с.
6. *Пирогов А.В., Пашкова Е.Б., Федорова И.А., Шпигун О.А.* Сравнение метиленовой селективности для обращенно-фазовой и микроэмульсионной жидкостной хроматографии. // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2011. Т. 11. № 2. С. 228-235.
7. *McEvoy E.* The Development and application of oil-in-water microemulsion liquid and electrokinetic chromatography for pharmaceutical analysis. PhD thesis. Waterford: Waterford Institute of Technology. 2008. 296 p.
8. *Шукин Е.Д., Перцев А.В., Амелина Е.А.* Коллоидная химия. М.: Высш. школа. 2007. С. 111-120.
9. *Sathishkumar M., Jeong E.S., Yun S.E., Mun S.P., Rusling J.F.* Bicontinuous microemulsion as reaction medium for the β -glucosidase-catalyzed synthesis of n-hexyl- β -D-glucopyranoside. // *Enzyme Microb. Technol.* 2008. V. 42. № 3. P. 252-258.
10. *Sathishkumar M., Jayabalan R., Mun S.P., Yun S.E.* Role of bicontinuous microemulsion in the rapid enzymatic hydrolysis of (R,S)-ketoprofen ethyl ester in a micro-reactor. // *Bioresour. Technol.* 2010. V. 101. № 20. P. 7834-7840.
11. *Schramm L.* Emulsions, foams and suspensions: fundamentals and applications. Wiley, 2005. 448 p.

12. *Вережников В.Н.* Избранные главы коллоидной химии. В.: ВГУ, 2011. С. 185-189.
13. *Ланге К.Р., Зайченко Л.П.* Поверхностно-активные вещества: синтез, свойства, анализ, применение. Спб.: Профессия, 2005. С. 137-141.
14. *Barel A.O., Paye M., Maibach H.I.* Handbook of cosmetic science and technology. Third edition. NY.: Informa Healthcare USA, Inc. 2009. P. 368-369.
15. *Pocurull E., Marce R.M.* Surfactants. / Handbook of Water Analysis. Third edition. (Ed. Nollet L.M.L., De Gelder L.S.P.), Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC. 2014. P. 825-843.
16. *Jin X., Streett D.A., Dunlap C.A., Lyn M.E.* Application of hydrophilic-lipophilic balance (HLB) number to optimize a compatible non-ionic surfactant for dried aerial conidia of *Beauveria bassiana*. // *Biol. Control*. 2008. V. 46. № 2. P. 226-227.
17. *Cross J.* Anionic surfactants – an introduction. // *Surfactant Sci. Ser.* 1998. V. 73. P. 1-33.
18. *Guetchin D., Oldenhove L.* Surfactants: classification. // *Surfactant Sci. Ser.* 1999. V. 82. P. 7-46.
19. *Souza F.D., Souza B.S., Tondo D.W., Leopoldino E.C., Fiedler H.D., Nome F.* Imidazolium-based zwitterionic surfactants: characterization of normal and reverse micelles and stabilization of nanoparticles. // *Langmuir*. 2015. V. 31. № 12. P. 3587-3595.
20. *Sharma R.K.* Surfactants: basics and versatility in food industries. // *Pharm. Mag.* 2014. V. 2. № 3. P. 17-29.
21. *Kumar G.P., Rajeshwarrao P.* Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery. // *Acta Pharm. Sin. B*. 2011. V. 1. № 4. P. 208-219.
22. *Ontiveros J.F., Pierlot C., Catte M., Molinier V., Salager J.-L., Aubry J.-M.* A simple method to assess the hydrophilic lipophilic balance of food and cosmetic surfactants using the phase inversion temperature of C10E4/n-octane/water emulsions. // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*. 2014. V. 458. P. 32-39.
23. *Шерман Ф.* Эмульсии. / Пер. с англ., под ред. Абрамзона А.А., Л.: Химия, 1972. 448 с.
24. *Hassas B.V., Karakas F., Celik M.S.* Ultrafine coal dewatering: relationship between hydrophilic lipophilic balance (HLB) of surfactants and coal rank. // *Int. J. Miner. Process.* 2014. V. 133. № 10. P. 97-104.

25. Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A. Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. // *Anal. Chem.* 1984. V. 56. № 1. P. 111-113.
26. Карцова Л.А. Капиллярный электрофорез. Том 18. М.: Наука, 2014. С. 131.
27. Terabe S., Otsuka K., Ando T. Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary. // *Anal. Chem.* 1985. V. 57. № 4. P. 834-841.
28. Wuethrich A., Haddad P.R., Quirino J.P. Electrophoretic concentration and sweeping-micellar electrokinetic chromatography analysis of cationic drugs in water samples. // *J. Chromatogr. A.* 2015. V. 1401. P. 84-88.
29. Hu S.-Q., Wang G.-X., Guo W.-B., Guo X.-M., Zhao M. Effect of low concentration sodium dodecyl sulfate on the electromigration of palonosetron hydrochloride stereoisomers in micellar electrokinetic chromatography. // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1342. P. 86-91.
30. Huang J.-Q., Hu C.-C., Chiu T.-C. Determination of seven preservatives in cosmetic products by micellar electrokinetic chromatography. // *Int. J. Cosmetic Sci.* 2013. V. 35. № 4. P. 346-353.
31. Schnee V.P., Palmer C.P. Cationic surfactants for micellar electrokinetic chromatography: 2. Representative applications to acidic, basic, and hydrophobic analytes. // *Electrophoresis.* 2008. V. 29. № 4. P. 777-782.
32. Tejada-Casado C., Moreno-Gonzalez D., Garcia-Campana A.M., Olmo-Iruela M. Use of an ionic liquid-based surfactant as pseudostationary phase in the analysis of carbamates by micellar electrokinetic chromatography. // *Electrophoresis.* 2015. V. 36. № 6. P. 955-961.
33. El-Hady D.A., Albishri H.M. Alkyl imidazolium ionic liquid based sweeping-micellar electrokinetic chromatography for simultaneous determination of seven tea catechins in human plasma. // *J. Chromatogr. B.* 2014. V. 969. P. 224-229.
34. He J., Shamsi S.A. Application of polymeric surfactants in chiral micellar electrokinetic chromatography (CMEKC) and CMEKC coupled to mass spectrometry. // *Methods Mol. Biol.* 2013. V. 970. P. 319-348.
35. Akbay C., Hoyos Y., Hooper E., Arslan H., Rizvi S.A.A. Cationic gemini surfactants as pseudostationary phases in micellar electrokinetic chromatography. Part I: Effect of head group. // *J. Chromatogr. A.* 2010. V. 1217. № 32. P. 5279-5287.

36. *Yan J., Cai Y., Wang Y., Lin X., Li H.* Simultaneous determination of amino acids in tea leaves by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. // *Food Chem.* 2014. V. 143. P. 82-89.
37. *Lamalle C., Servais A.-C., Radermecker R.P., Crommen J., Fillet M.* Simultaneous determination of insulin and its analogues in pharmaceutical formulations by micellar electrokinetic chromatography. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015. V. 111. P. 344-350.
38. *Watarai H.* Microemulsion capillary electrophoresis. // *Chem. Lett.* 1991. № 3. P. 391-394.
39. *Atria K.D., Mahuzier P.-E., Clark B.J.* Background and operating parameters in microemulsion electrokinetic chromatography. // *Electrophoresis.* 2003. V. 24. № 3. P. 315-324.
40. *Sanchez J.M., Salvado V.* Comparison of micellar and microemulsion electrokinetic chromatography for the analysis of water- and fat-soluble vitamins. // *J. Chromatogr. A.* 2002. V. 950. № 1/2. P. 241-247.
41. *Yu L., Chu K., Ye H., Liu X., Yu L., Xu X., Chen G.* Recent advances in microemulsion electrokinetic chromatography. // *Trends Anal. Chem.* 2012. V. 34. P. 140-151.
42. *Schöftner R., Buchberger W.* Systematic investigations of different capillary electrophoretic techniques for separation of methylquinolines. // *J. Sep. Sci.* V. 26. № 14. P. 1247-1252.
43. *Oledzka I., Kowalski P., Baluch A., Baczek T., Paradziej-Lukowicz J., Taciak M., Pastuszewska B.* Quantification of the level of fat-soluble vitamins in feed based on the novel microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) method. // *J. Sci. Food Agric.* 2014. V. 94. № 3. P. 544-551.
44. *Altria K.D., Clark B.J., Mahuzier P.E.* The effect of operating variables in microemulsion electrokinetic capillary chromatography. // *Chromatographia.* 2000. V. 52. № 11/12. P. 758-768.
45. *Harang V., Eriksson J., Saenger-van de Griend C.E., Jacobsson S.P., Westerlund D.* Microemulsion electrokinetic chromatography of drugs varying in charge and hydrophobicity: I. Impact of parameters on separation performance evaluated by multiple linear regression models. // *Electrophoresis.* 2004. V. 25. № 1. P. 80-93.
46. *Pascoe R., Foley J.P.* Rapid separation of pharmaceutical enantiomers using electrokinetic chromatography with a novel chiral microemulsion. // *Analyst.* 2002. V. 127. № 6. P. 710-714.

47. *Cherkaoui S., Veuthey J.-L.* Micellar and microemulsion electrokinetic chromatography of selected anesthetic drugs. // *J. Sep. Sci.* 2002. V. 25. № 15/17. P. 1073-1078.
48. *Fogarty B., Dempsey E., Regan F.* Potential of microemulsion electrokinetic chromatography for the separation of priority endocrine disrupting compounds. // *J. Chromatogr. A.* 2003. V. 1014. № 1/2. P. 129-139.
49. *Yang H., Ding Y., Cao J., Li P.* Twenty-one years of microemulsion electrokinetic chromatography (1991-2012): A powerful analytical tool. // *Electrophoresis.* 2013. V. 34. № 9/10. P. 1273-1294.
50. *Threeprom J.* (S)-(+)-2-octanol as a chiral oil core for the microemulsion electrokinetic chromatographic separation of chiral basic drugs. // *Anal. Sci.* 2007. V. 23. № 9. P. 1071-1075.
51. *Cao J., Chen J., Yi L., Li P., Qi L.-W.* Comparison of oil-in-water and water-in-oil microemulsion electrokinetic chromatography as methods for the analysis of eight phenolic acids and five diterpenoids. // *Electrophoresis.* 2008. V. 29. № 11. P. 2310-2320.
52. *Cao W., Hu S.-S., Li X.-Y., Pang X.-Q., Cao J., Ye L.-H., Dai H.-B., Liu X.-J., Da J.-H., Chu C.* Highly sensitive analysis of flavonoids by zwitterionic microemulsion electrokinetic chromatography coupled with light-emitting diode-induced fluorescence detection. // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1358. P. 277-284.
53. *Siren H., Karttunen A.* Microemulsion electrokinetic chromatographic analysis of some polar compounds. // *J. Chromatogr. B.* 2003. V. 783. № 1. P. 113-124.
54. *Melin V., Perrett D.* A comparative study of microemulsion electrokinetic capillary chromatography and micellar electrokinetic capillary chromatography for the analysis of UV-absorbing compounds in human urine. // *Electrophoresis.* V. 25. № 10/11. P. 1503-1510.
55. *Xie J., Chen X., Zhang J., Liu J., Tian J., Chen X., Hu Z.* A novel double coating for microemulsion electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection: as tested with amino acid derivatives. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004. V. 36. № 1. P. 1-8.
56. *Mahuzier P.-E., Clark B.J., Bryant S.M., Altria K.D.* High-speed microemulsion electrokinetic chromatography. // *Electrophoresis.* 2001. V. 22. № 17. P. 3819-3823.

57. *Lucangioli S., Flor S., Contin M., Tripodi V.* A capillary electrophoretic system based on a novel microemulsion for the analysis of coenzyme Q10 in human plasma by electrokinetic chromatography. // *Electrophoresis*. 2009. V. 30. № 11. P. 1899-1905.
58. *Gong S., Bo T., Huang L., Li K.A., Liu H.* Separation and determination of biphenyl nitrile compounds by microemulsion electrokinetic chromatography with mixed surfactants. // *Electrophoresis*. 2004. V. 25. № 7/8. P. 1058-1064.
59. *Borst C., Holzgrabe U.* Cyclodextrin-mediated enantioseparation in microemulsion electrokinetic chromatography. // *Methods Mol. Biol.* 2013. V. 970. P. 363-375.
60. *Abromeit H., Werz O., Scriba G.K.E.* Separation of 5-lipoxygenase metabolites using cyclodextrin-modified microemulsion electrokinetic chromatography and head column field-amplified sample stacking. // *Chromatographia*. 2013. V. 76. № 17/18. P. 1187-1192.
61. *Lin Z., Zhang J., Cui H., Zhang L., Chen G.* Determination of aromatic amines in environmental water sample by hollow fiber-liquid phase microextraction and microemulsion electrokinetic chromatography. // *J. Chromatogr. A*. 2010. V. 1217. № 26. P. 4507-4510.
62. *Huang H.-Y., Lin Y.-R., Hsieh S.-H.* Sample stacking for determination of aromatic acid impurities by microemulsion electrokinetic chromatography. // *Anal. Chim. Acta*. 2009. V. 632. № 1. P. 148-155.
63. *Tripodi V., Flor S., Carlucci A., Lucangioli S.* Simultaneous determination of natural and synthetic estrogens by EKC using a novel microemulsion. // *Electrophoresis*. 2006. V. 27. № 22. P. 4431-4438.
64. *Huang H.-Y., Lai Y.-C., Chiu C.-W., Yeh J.-M.* Comparing micellar electrokinetic chromatography and microemulsion electrokinetic chromatography for the analysis of preservatives in pharmaceutical and cosmetic products. // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 993. № 1/2. P. 153-164.
65. *Klampfl C.W.* Solvent effects in microemulsion electrokinetic chromatography. // *Electrophoresis*. 2003. V. 24. № 10. P. 1537-1543.
66. *Zhai Z.-D., Luo X.-P., Shi Y.-P.* Separation and determination of aristolochic acids in herbal medicines by microemulsion electrokinetic chromatography. // *Anal. Chim. Acta*. 2006. V. 561. № 1/2. P. 119-125.
67. *Lin X., Wang Y., Sun J., Xiao D., Luo W., Li H.* Determination of uric acid in human plasma and urine by microemulsion electrokinetic chromatography. // *Anal. Methods*. 2013. V. 5. № 19. P. 5201-5207.

68. *Maher H.D., Alzoman N.Z., Alshehri M.M., Aljohar H.I., Sultan M.A.* Microemulsion electrokinetic chromatography with polarity switching stacking mode for the determination of dexamethasone sodium phosphate: application to pharmacokinetic studies in rabbit plasma. // *Anal. Methods*. 2015. V. 7. № 7. P. 3260-3267.
69. *Ryan R., Altria K., McEvoy E., Donegan S., Power J.* A review of developments in the methodology and application of microemulsion electrokinetic chromatography. // *Electrophoresis*. 2013. V. 34. № 1. P. 159-177.
70. *Hu S.-Q., Lue W.-J., Ma Y.-H., Hu Q., Dong L.-J., Chen X.-G.* Chiral separation of β -blockers by MEEKC using neutral microemulsion: Analysis of separation mechanism and further elucidation of resolution equation. // *Electrophoresis*. 2013. V. 34. № 2. P. 260-268.
71. *Schappler J., Guillarme D., Rudaz S., Veuthey J.-L.* Microemulsion electrokinetic chromatography hyphenated to atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. // *Electrophoresis*. 2008. V. 29. № 1. P. 11-19.
72. *Ortner K., Buchberger W., Himmelsbach M.* Capillary electrokinetic chromatography of insulin and related synthetic analogues. // *J. Chromatogr. A*. 2009. V. 1216. № 14. P. 2953-2957.
73. *Himmelsbach M., Haunschmidt M., Buchberger W., Klampfl C.W.* Microemulsion electrokinetic chromatography with on-line atmospheric pressure photoionization-mass spectrometric detection of medium polarity compounds. // *J. Chromatogr. A*. 2007. V. 1159. № 1-2. P. 58-62.
74. *Bytzek A.K., Reithofer M.R., Galanski M., Groessl M., Keppler B.K., Hartinger C.G.* The first example of MEEKC-ICP-MS coupling and its application for the analysis of anticancer platinum complexes. // *Electrophoresis*. 2010. V. 31. № 7. P. 1144-1150.
75. *Klotz W.L., Schure M.R., Foley J.P.* Determination of octanol-water partition coefficients of pesticides by microemulsion electrokinetic chromatography. // *J. Chromatogr. A*. 2001. V. 930. № 1/2. P. 145-154.
76. *Xia Z., Yang J., Li L., Yang F., Jiang X.* Determination of octanol-water partition coefficients by MEEKC based on peak-shift assay. // *Chromatographia*. 2010. V. 72. № 5/6. P. 495-501.
77. *Yu L., Ye H., Zheng L., Chen L., Chu X., Xu X., Chen G.* Determination of the epimerization rate constant of amygdalin by microemulsion electrokinetic chromatography. // *Electrophoresis*. 2011. V. 32. № 2. P. 218-222.

78. *Lin W.-C., Liu W.-L., Tang W.-Y., Huang C.-P., Huang H.-Y., Chin T.-Y.* Determination of amino acids by microemulsion electrokinetic chromatography laser induced fluorescence method. // *Electrophoresis*. 2014. V. 35. № 11. P. 1751-1755.
79. *Hsieh S.-Y., Wang C.-C., Wu S.-M.* Microemulsion electrokinetic chromatography for analysis of phthalates in soft drinks. // *Food Chem*. 2013. V. 141. № 4. P. 3486-3491.
80. *Liotta E., Gottardo R., Seri C., Rimondo C., Miksik I., Serpelloni G., Tagliaro F.* Rapid analysis of caffeine in "smart drugs" and "energy drinks" by microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC). // *Forensic Sci. Int.* 2012. V. 220. № 1/3. P. 279-283.
81. *Nussbaumer S., Fleury-Souverain S., Schappler J., Rudaz S., Veuthey J.-L., Bonnabry P.* Quality control of pharmaceutical formulations containing cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin by micellar and microemulsion electrokinetic chromatography (MEKC, MEEKC). // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011. V. 55. № 2. P. 253-258.
82. *Карцова Л.А., Ганжа О.В.* Новые возможности мицеллярной и микроэмульсионной электрокинетической хроматографии при определении катехинов и катехоламинов в природных объектах. // *Журн. аналит. химии*. 2010. Т. 65. № 3. С. 285-291.
83. *Huang H.-Y., Chiu C.-W., Chen Y.-C., Yeh J.-M.* Comparison of microemulsion electrokinetic chromatography and micellar electrokinetic chromatography as methods for the analysis of ten benzophenones. // *Electrophoresis*. 2005. V. 26. № 4/5. P. 895-902.
84. *Fung-Kee-Fung C.A., Post S.* Comparison of AOT decane water-in-oil and oil-in-water microemulsions as media for capillary electrophoresis. // *J. Liq. Chromat. Rel. Technol.* 2001. V. 24. № 8. P. 1133-1151.
85. *Mendonca C.R.B, Bica C.I.D., Piatnicki C.M.S., Simo-Alfonso E.F., Ramis-Ramos G.* Electrokinetic capillary chromatography in a polar continuous-phase water-in-oil microemulsion constituted by water, sodium dodecyl sulfate, and pentanol. // *Electrophoresis*. 2005. V. 26. № 4/5. P. 858-866.
86. *Nyunt K.T.N., Pruthiwanasan B., Suntornsuk L.* Microemulsion electrokinetic chromatography of β -carotene and astaxanthin. // *J. Liq. Chromat. Rel. Technol.* 2013. V. 36. № 6. P. 671-686.
87. *Altria K.D., Broderick M.F., Donegan S., Power J.* The use of novel water-in-oil microemulsion electrokinetic chromatography. // *Electrophoresis*. 2004. V. 25. № 4/5. P. 645-652.

88. *Huang H.-Y., Liu W.-L., Singco B., Hsieh S.-H., Shih Y.-H.* On-line concentration sample stacking coupled with water-in-oil microemulsion electrokinetic chromatography. // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. № 42. P. 7663-7669.
89. *Broderick M., Donegan S., Power J., Altria K.* Optimisation and use of water-in-oil MEEKC in pharmaceutical analysis. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005. V. 37. № 5. P. 877-884.
90. *Paul B.K., Moulik S.P.* Uses and application of microemulsions. // *Curr. Sci.* 2001. V. 80. № 8. P. 990-1001.
91. *Wu H., Zhou A., Lu C., Wang L.* Examination of lymphatic transport of puerarin in unconscious lymph duct-cannulated rats after administration in microemulsion drug delivery systems. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2011. V. 42. № 4. P. 348-353.
92. *Mehta S.K., Kaur G.* Microemulsions as carriers for therapeutic molecules. // *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* 2010. V. 4. № 1. P. 35-48.
93. *Sinha V.R., Singh A., Kumar R.V., Singh S., Kumria R., Bhinge J.R.* Oral colon-specific drug delivery of protein and peptide drugs. // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2007. V. 24. № 1. P. 63-92.
94. *Lopez-Quintela M.A., Tojo C., Blanco M.C., Garcia R.L., Leis J.R.* Microemulsion dynamics and reactions in microemulsions. // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2004. V. 9. № 3/4. P. 264-278.
95. *El-Hefnawy M.E., Sakran M.* Characteristics of lipase in dormant seeds catalyzed hydrolysis of olive oil in SDS-olive oil reversed microemulsions. // *Can. J. Chem. Eng.* 2014. V. 92. № 8. P. 1335-1339.
96. *Shrikhande J.J., Hassan P.A., Jayaram R.V.* Condensation reaction of benzaldehyde and acetone in o/w microemulsions: Effect of microemulsion compositions. // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2010. V. 370. № 1/3. P. 64-71.
97. *Sathishkumar M., Jeong E.S., Yun S.E., Mun S.P., Rusling J.F.* Bicontinuous microemulsion as reaction medium for the β -glucosidase-catalyzed synthesis of n-hexyl- β -D-glucopyranoside. // *Enzyme Microb. Technol.* 2008. V. 42. № 3. P. 252-258.
98. *Garcia-Rio L., Leis J.R., Mejuto J.C., Perez-Lorenzo M.* Microemulsions as microreactors in physical organic chemistry. // *Pure Appl. Chem.* 2007. V. 79. № 6. P. 1111-1123.

99. *Santanna V.C., Silva A.C.M., Lopes H.M., Sampaio Neto F.A.* Microemulsion flow in porous medium for enhanced oil recovery. // *J. Pet. Sci. Eng.* 2013. V. 105. P. 116-120.
100. *Dantas T.N.C., Dantas Neto A.A., Rossi C.G.F.T., Gomes D.A.A., Gurgel A.* Use of microemulsion systems in the solubilization of petroleum heavy fractions for the prevention of oil sludge waste formation. // *Energy Fuels.* 2010. V. 24. № 4. P. 2312-2319.
101. *Hernandez-Torres M.A., Landy J.S., Dorsey J.G.* Reversed micellar mobile phases for normal-phase chromatography. // *Anal. Chem.* 1986. V. 58. № 4. P. 744-747.
102. *Berthod A., Nicolas O., Porthault M.* Water in oil microemulsions as mobile phase in liquid chromatography. // *Anal. Chem.* 1990. V. 62. № 14. P. 1402-1407.
103. *Berthod A., Laserna J.J., Carretero I.* Oil-in-water microemulsions as mobile phases for rapid screening of illegal drugs in sports. // *J. Liq. Chromat. Rel. Technol.* 1992. V. 15. № 17. P. 3115-3127.
104. *Janci B., Medenica M., Ivanovic D., Malenovic A., Markovic S.* Microemulsion liquid chromatographic method for characterisation of fosinopril sodium and fosinoprilat separation with chemometrical support. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. V. 383. № 4. P. 687-694.
105. *Spernath A., Aserin A.* Microemulsions as carriers for drugs and nutraceuticals. // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2006. V. 128/130. P. 47-64.
106. *Altria K., Broderick M., Donegan S., Power J.* Preliminary study on the use of water-in-oil microemulsion eluents in HPLC. // *Chromatographia.* 2005. V. 62. № 7/8. P. 341-348.
107. *Abou-Taleb N.H., El-Wasseef D.R., El-Sherbiny D.T., El-Ashry S.M.* Multiobjective optimization strategy based on desirability functions used for the microemulsion liquid chromatographic separation and quantification of norfloxacin and tinidazole in plasma and formulations. // *J. Sep. Sci.* 2015. V. 38. № 6. P. 901-908.
108. *Malenovic A., Jancic-Stojanovic B., Ivanovic D., Medenica M.* Forced degradation studies of simvastatin using microemulsion liquid chromatography. // *J. Liq. Chromat. Rel. Technol.* 2010. V. 33. № 4. P. 536-547.
109. *Malenovic A., Jancic-Stojanovic B., v M., Ivanovic D.* Microemulsion liquid chromatographic screening of simvastatin and its active metabolite in human plasma. // *Acta Chromatogr.* 2008. V. 20. № 4. P. 595-607.

110. *Momenbeik F., Roosta M., Nikoukar A.A.* Simultaneous microemulsion liquid chromatographic analysis of fat-soluble vitamins in pharmaceutical formulations: Optimization using genetic algorithm. // *J. Chromatogr. A.* 2010. V. 1217. № 24. P. 3770-3773.
111. *McEvoy E., Donegan S., Power J., Altria K.* Optimisation and validation of a rapid and efficient microemulsion liquid chromatographic (MELC) method for the determination of paracetamol (acetaminophen) content in a suppository formulation. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007. V. 44. № 1. P. 137-143.
112. *Altria K.D., Marsh A., Clark B.J.* High performance liquid chromatographic analysis of pharmaceuticals using oil-in-water microemulsion eluent and monolithic column. // *Chromatographia.* 2006. V. 63. № 7/8. P. 309-314.
113. *Xu L., Li L., Huang J., Yu S., Wang J., Li N.* Determination of the lipophilicity (log $P_{o/w}$) of organic compounds by microemulsion liquid chromatography. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015. V. 102. P. 409-416.
114. *Соколова Л.С., Плетнев Ф.И., Костромских А.А., Пашкова Е.Б., Пирогов А.В., Попик М.В., Шнигун О.А.* Определение консервантов в спредах методом микроэмульсионной жидкостной хроматографии. // *Масложировая промышленность.* 2013. Т. 6. С. 18-21.
115. *Song R.J., Zhou J.* Microemulsion liquid chromatographic method for simultaneous separation and determination of six flavonoids of *Apocynum venetum* leaf extract. // *J. Chromatogr. B.* 2015. V. 995-996. P. 8-14.
116. *Hammouda M.E.A., Abu El-Enin M.A., El-Sherbiny D.T., El-Wasseef D.R., El-Ashry S.M.* Simultaneous determination of enalapril and hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparations using microemulsion liquid chromatography. // *J. Chromatogr. Sci.* 2015. V. 53. № 1. P. 90-96.
117. *El-Sherbiny D.T., EL-Enany N., Belal F.F., Hansen S.H.* Simultaneous determination of loratadine and desloratadine in pharmaceutical preparations using liquid chromatography with a microemulsion as eluent. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007. V. 43. № 4. P. 1236-1242.
118. *Mohammad A., Laeeq S.* Application of water-in-oil microemulsion for chromatographic study of different groups of organic compounds. // *Pharma Chem.* 2010. V. 2. № 1. P. 281-286.
119. *Bhawani S.A., Albishiri H.M., Rengarajan R.* Microemulsion thin-layer chromatographic separation of caffeine and paracetamol and their determination in

- formulated tablet and in spiked urine sample by HPLC. // *Anal. Chem. Lett.* 2014. V. 4. № 3. P. 207-212.
120. Cui S., Fu B., Lee F.S.-C., Wang X. Application of microemulsion thin layer chromatography for the fingerprinting of licorice (*Glycyrrhiza* spp.). // *J. Chromatogr. B.* 2005. V. 828. № 1/2. P. 33-40.
 121. Leite C.C., Zmozinski A.V., Vale M.G.R., Silva M.M. Determination of Fe, Cr and Cu in used lubricating oils by ET AAS using a microemulsion process for sample preparation. // *Anal. Methods.* 2015. V. 7. № 8. P. 3363-3371.
 122. Wu D., Li R., Fan D., Zhang Y. Wei Q. Sensitive determination of protein using terbium-metalloporphyrin as a fluorescence probe in AOT microemulsion. // *J. Mol. Liq.* 2014. V. 199. P. 67-70.
 123. Osbourn D.M., Weiss D.J., Lunte C.E. On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis. // *Electrophoresis.* 2000. V. 21. № 14. P. 2768-2779.
 124. Petru K., Siroka J., Bydzovska L., Krcmova L., Polasek M. Assay of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by capillary electrophoresis with spectrophotometric detection using a high-sensitivity detection cell and solid-phase extraction. // *Electrophoresis.* 2014. V. 35. № 17. P. 2546-2549.
 125. Zhou C., Sun C., Ruan J., Zou H., Li Y. Sensitive determination of rose bengal in brown sugar by molecularly imprinted solid-phase extraction monolithic capillary column coupled with capillary electrophoresis. // *Anal. Lett.* 2015. V. 48. № 13. P. 1988-2001.
 126. Richter E.M., Fracassi da Silva J.A., Guts I.G.R., do Lago C.L., Angnes L. Disposable twin gold electrodes for amperometric detection in capillary electrophoresis. // *Electrophoresis.* 2004. V. 25. № 17. P. 2965-2969.
 127. Zhou L., Yan N., Zhang H., Zhou X., Pu Q., Hu Z. Microwave-accelerated derivatization for capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: A case study for determination of histidine, 1- and 3-methylhistidine in human urine. // *Talanta.* 2010. V. 82. № 1. P. 72-77.
 128. Quesada-Molina C., del Olmo-Iruela M., Garcia-Campana A.M. Analysis of cephalosporin residues in environmental waters by capillary zone electrophoresis with off-line and on-line preconcentration. // *Anal. Methods.* 2012. V. 4. № 8. P. 2341-2347.

129. *Simpson Jr.S.L., Quirino J.P., Terabe S.* On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis. Fundamentals and applications. // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1184. № 1/2. P. 504-541.
130. *Jaafar J., Konishi K., Terabe S., Ikegami T., Tanaka N.* Field enhanced sample injection for the CE determination of arsenic compounds using successive multiple ionic polymer layer coated capillaries. // *Chromatographia.* 2009. V. 69. № 11/12. P. 1437-1441.
131. *Hernandez-Borges J., Garcia-Montelongo F.J., Cifuentes A., Rodriguez-Delgado M.A.* Determination of herbicides in mineral and stagnant waters at ng/L levels using capillary electrophoresis and UV detection combined with solid-phase extraction and sample stacking. // *J. Chromatogr. A.* 2005. V. 1070. № 1/2. P. 171-177.
132. *Yang Y., Boysen R.I., Hearn M.T.W.* Optimization of field-amplified sample injection for analysis of peptides by capillary electrophoresis-mass spectrometry. // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. № 14. P. 4752-4758.
133. *Knobel G., Calimag-Williams K., Campiglia A.D.* Solid-phase extraction, sample stacking and capillary zone electrophoresis for the analysis of urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites. // *Analyst.* 2012. V. 137. № 23. P. 5639-5647.
134. *Lee S.-Y., Maeller C.E.* Large-volume sample stacking with polarity switching for monitoring of nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (NPP1) reactions by capillary electrophoresis. // *Electrophoresis.* 2014. V. 35. № 6. P. 855-863.
135. *Liu B.-F., Zhong X.-H., Lu Y.-T.* Analysis of plant hormones in tobacco flowers by micellar electrokinetic capillary chromatography coupled with on-line large volume sample stacking. // *J. Chromatogr. A.* 2002. V. 945. № 1/2. P. 257-265.
136. *See H.H., Hauser P.C., Ibrahim W.A.W., Sanagi M.M.* Rapid and direct determination of glyphosate, glufosinate, and aminophosphonic acid by online preconcentration CE with contactless conductivity detection. // *Electrophoresis.* 2010. V. 31. № 3. P. 575-582.
137. *Kawai T., Ito J., Sueyoshi K., Kitagawa F., Otsuka K.* Electrophoretic analysis of cations using large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump using capillaries coated with neutral and cationic polymers. // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1267. P. 65-73.
138. *Tuma P.* Large volume sample stacking for rapid and sensitive determination of antidiabetic drug metformin in human urine and serum by capillary electrophoresis

- with contactless conductivity detection. // *J. Chromatogr. A*. 2014. V. 1345. P. 207-211.
139. *Chen Z., Lin Z., Zhang L., Cai Y., Zhang L.* Analysis of plant hormones by microemulsion electrokinetic capillary chromatography coupled with on-line large volume sample stacking. // *Analyst*. 2012. V. 137. № 7. P. 1723-1729.
 140. *Chen C., Meng L., Li M., Zhu Z.* Simultaneous separation and sensitive detection of four β 2-agonists in biological specimens by CE-UV using a field-enhanced sample injection method. // *Anal. Methods*. 2015. V. 7. № 1. P. 175-180.
 141. *Hai X., Nauwelaers T., Busson R., Adams E., Hoogmartens J., Van Schepdael A.* A rapid and sensitive CE method with field-enhanced sample injection and in-capillary derivatization for selenomethionine metabolism catalyzed by flavin-containing monooxygenases. // *Electrophoresis*. 2010. V. 31. № 19. P. 3352-3361.
 142. *Zhu L., Tham S.Y., Yap A.U.J., Lee H.K.* Field-amplified stacking injection-capillary electrophoresis for quantitative analysis of fluoride released from dental composite. // *J. Sep. Sci.* 2002. V. 25. № 5/6. P. 328-332.
 143. *Morton M.R.N., Terabe S.* Field-enhanced sample injection for high-sensitivity analysis of peptides and proteins in capillary electrophoresis-mass spectrometry. // *J. Chromatogr. A*. 2004. V. 1032. № 1/2. P. 203-211.
 144. *Mala Z., Gebauer P., Bocek P.* Recent progress in analytical capillary isotachopheresis. // *Electrophoresis*. 2015. V. 36. № 1. P. 2-14.
 145. *Abdul Keyon A.S., Guijt R.M., Bolch C.J.S., Breadmore M.C.* Transient isotachopheresis-capillary zone electrophoresis with contactless conductivity and ultraviolet detection for the analysis of paralytic shellfish toxins in mussel samples. // *J. Chromatogr. A*. 2014. V. 1364. P. 295-302.
 146. *Liu S., Zhang D., Wang H.* Transient isotachopheresis focusing of DNA and DNA-protein complexes is essentially enhanced by spontaneously dissolved aerial carbon dioxide in electrolytes. // *Anal. Chem.* 2015. V. 87. № 1. P. 554-560.
 147. *Hsieh B.-C., Chen R.L.C., Tsai T.* Quantification of 5-aminolevulinic acid by CE using dynamic pH junction technique. // *J. Sep. Sci.* 2013. V. 136. № 4. P. 803-808.
 148. *Tak Y.H., Somsen G.W., de Jong G.J.* Optimization of dynamic pH junction for the sensitive determination of amino acids in urine by capillary electrophoresis. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 401. № 10. P. 3275-3281.

149. Zhang X., Xu S., Sun Y., Wang Y., Wang C. Simultaneous determination of benzoic acid and sorbic acid in food products by CE after on-line preconcentration by dynamic pH junction. // *Chromatographia*. 2011. V. 73. № 11/12. P. 1217-1221.
150. Tsai I-C., Su C.-Y., Hu C.-C., Chiu T.-C. Simultaneous determination of whitening agents and parabens in cosmetic products by capillary electrophoresis with on-line sweeping enhancement. // *Anal. Methods*. 2014. V. 6. № 19. P. 7615-7620.
151. Znaleźiona J., Maier V., Petr J., Chrastina J., Sevcik J. MEKC determination of nilutamide in human serum using sweeping in high salt sample matrix. // *Chromatographia*. 2011. V. 74. № 1/2. P. 151-155.
152. Tseng H.-M., Barrett D.A. Micellar electrokinetic biofluid analysis of biogenic amines using on-line sample concentration and UV laser-induced native fluorescence detection. // *J. Chromatogr. A*. 2009. V. 1216. № 15. P. 3387-3391.
153. Sun J., He H., Liu S. Determination of phthalic acid esters in Chinese white spirit using dispersive liquid-liquid microextraction coupled with sweeping β -cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. // *J. Sep. Sci.* 2014. V. 37. № 13. P. 1679-1686.
154. МУК 4.1.1106-02. Определение массовой доли йода в пищевых продуктах и сырье титриметрическим методом.
155. Julshamn K., Dahl L., Eckhoff K. Determination of iodine in seafood by inductivity coupled plasma/mass spectrometry. // *J. AOAC Int.* 2001. V. 84. № 6. P. 1976-1983.
156. ГОСТ 31762-2012. Майонезы и соусы майонезные. Правила приемки и методы испытаний.
157. Belal F., El-Kerdawy M.M., El-Ashry S.M., El-Wesseef D.R. Kinetic spectrophotometric determination of ampicillin and amoxicillin in dosage forms. // *Il Farmaco*. 2000. V. 55. № 11/12. P. 680-686.
158. Gamba V., Dusi G. Liquid chromatography with fluorescence detection of amoxicillin and ampicillin in feeds using pre-column derivatization. // *Anal. Chim. Acta*. 2003. V. 483. № 1/2. P. 69-72.
159. Injac R., Kocevar N., Kreft S. Precision of micellar electrokinetic capillary chromatography in the determination of seven antibiotics in pharmaceuticals and feedstuffs. // *Anal. Chim. Acta*. 2007. V. 594. № 1. P. 119-127.
160. Xie K., Jia L., Xu D., Guo H., Xie X., Huang Y., Chen X., Bao W., Dai G., Wang J. Simultaneous determination of amoxicillin and ampicillin in eggs by reversed-phase

high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using pre-column derivatization. // *J. Chromatogr. Sci.* 2012. V. 50. № 7. P. 620-624.

161. *Alegre M.R., Broch S.C., Romero J.E.* Development and validation of a method to determine amoxicillin in physiological fluids using micellar liquid chromatography. // *J. Sep. Sci.* 2008. V. 31. № 15. P. 2813-2819.
162. МВИ РОО-ИЭТП-04-2005. Методика выполнения измерений массовой доли гексаметилендиамина в образцах полигексаметиленгуанидина гидрохлорида методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.