

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

КРАВЧЕНКО Анастасия Витальевна

**Новые подходы к электрофоретическому определению лекарственных
препаратов в объектах со сложной матрицей с применением
полифункциональных покрытий кварцевого капилляра на основе ионных
жидкостей**

Научная специальность 1.4.2. Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук, проф.

Карцова Людмила Алексеевна

Санкт-Петербург

2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
I.1 Применение метода капиллярного электрофореза в области медицинской химии и в фармацевтике	11
<i>I.1.1 Скрининг биологически активных соединений: лекарственных препаратов и их метаболитов</i>	12
<i>Модификация стенок кварцевого капилляра</i>	17
<i>Введение модификаторов в состав фонового электролита</i>	19
<i>I.1.2 Другие приложения метода капиллярного электрофореза при модификации электрофоретической системы</i>	20
I.2 Хиральное разделение методом капиллярного электрофореза с использованием циклодекстринов	22
<i>I.2.1 Замещение гидроксильных групп в молекулах циклодекстринов</i>	26
<i>I.2.2 Система двух модификаторов в составе фонового электролита для энантиоразделения</i>	29
I.3 Онлайн концентрирование биологически активных соединений в капиллярном электрофорезе	41
<i>I.3.1 Механизмы онлайн концентрирования</i>	41
<i>I.3.2 Сочетание различных методов онлайн концентрирования (гибридные методы)</i>	46
<i>I.3.3 Концентрирование энантиомеров</i>	50
<i>I.3.4 Использование модификаторов при онлайн концентрировании</i>	52
Глава II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	54
II.1 Оборудование	54
II.2 Реактивы	55
II.3 Синтез модификаторов	56
<i>II.3.1 Синтез 6А-О-р-толуолсульфонил-β-циклодекстрина</i>	56
<i>II.3.2 Синтез тозилатов 3-алкил-1-β-циклодекстринимидазола</i>	56
<i>3-метил-1-β-циклодекстринимидазолий тозилат</i>	57

<i>3-бутил-1-β-циклодекстринимидазолий тозилат</i>	57
II.4 Приготовление рабочих растворов	58
<i>II.4.1 Приготовление стандартных растворов определяемых соединений</i>	58
<i>II.4.2 Приготовление буферных растворов</i>	58
II.5 Ковалентные покрытия на основе имидазолиевого катиона	59
<i>II.5.1 Синтез ковалентных покрытий</i>	59
<i>II.5.2 Характеристика покрытий физико-химическими методами анализа</i>	60
<i>Подтверждение наличия и структуры покрытия</i>	60
<i>Оценка стабильности ковалентных покрытий</i>	60
<i>II.5.3 Анализ основных аналитов – биогенных аминов</i>	60
<i>II.5.4 Анализ кислотных аналитов – фенил- и индолкарбоновых кислот</i>	61
<i>II.5.5 Анализ гидрофобных аналитов – кортикостероидных гормонов</i>	61
II.6 Введение модификатора на основе имидазолиевого катиона в состав фонового электролита	61
<i>II.6.1 Подготовка растворов модификаторов</i>	61
<i>Приготовление раствора 3-бутил- 1-β-циклодекстринимидазолий тозилата</i>	61
<i>Приготовление раствора 3-метил-1-β-циклодекстринимидазолий тозилата</i>	61
<i>II.6.2 Влияние концентрации модификатора на скорость электроосмотического потока (динамическая модификация стенок кварцевого капилляра)</i>	61
<i>II.6.3 Анализ стероидных гормонов</i>	62
<i>II.6.4 Энантиоразделение лекарственных препаратов</i>	62
<i>II.6.5 Расчет констант комплексообразования производного β-циклодекстрина с индивидуальными энантиомерами</i>	62
II.7 Двойные хиральные системы	62
<i>II.7.1 Изучение аналитических возможностей 1-Ви-3-β-CDImOTs в качестве хирального селектора в двойных хиральных системах</i>	62
II.8 Онлайн концентрирование	63
<i>II.8.1 Применение ковалентных покрытий на основе имидазолиевого катиона</i>	63
<i>Стэкинг с усилением поля для биогенных аминов</i>	63

<i>Стэкинг с большим объемом вводимой пробы для кортикостероидных гормонов</i>	63
<i>Электростэкинг-свилинг биогенных аминов</i>	63
<i>Использование пробки модификатора для концентрирования стероидных гормонов</i>	63
<i>II.8.2 Концентрирование стероидных гормонов в режиме электрокинетической хроматографии</i>	64
<i>II.8.3 Концентрирование индивидуальных энантиомеров в режиме электрокинетической хроматографии</i>	64
II.9 Анализ реальных объектов	65
<i>II.9.1 Определение биогенных аминов в образцах мочи</i>	65
<i>II.9.2 Определение стероидных гормонов в образцах плазмы крови человека</i>	66
<i>II.9.3 Определение энантиомеров кеторолака в образцах плазмы крови человека</i>	66
<i>II.9.4 Пробоподготовка таблеток с действующим веществом кеторолак</i>	67
<i>II.10 Эксперименты без модификации электрофоретической системы</i>	67
Глава III. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	68
III.1 Ковалентные покрытия на основе имидазольного катиона	70
<i>III.1.1 Формирование ковалентных покрытий</i>	70
<i>Предварительная подготовка капилляров с формированием линкера</i>	70
<i>Постфункционализация ковалентных покрытий</i>	72
<i>III.1.2 Характеристика синтезированных ковалентных покрытий</i>	73
<i>III.1.3 Анализ биогенных аминов на ковалентно модифицированных капиллярах</i>	76
<i>III.1.4 Концентрирование биогенных аминов на ковалентно модифицированных капиллярах</i>	79
<i>III.1.5 Электрофоретический анализ стероидных гормонов</i>	82
<i>III.1.6 Концентрирование стероидных гормонов</i>	84
<i>III.1.7 Хиральное разделение кетопрофена на ковалентных покрытиях</i>	86
III.2 Модификаторы на основе имидазола и β-циклодекстрина в качестве псевдостационарных фаз при разделении гидрофобных аналитов	87
<i>III.2.1 Разделение стероидных гормонов в режиме электрокинетической хроматографии</i>	89

<i>III.2.2 Концентрирование стероидных гормонов</i>	94
III.3 Разделение энантиомеров нестероидных противовоспалительных средств в режиме электрокинетической хроматографии	96
<i>III.3.1 Электрофоретическое разделение энантиомеров кетопрофена и кеторолака</i>	96
<i>III.3.2 Определение констант комплексообразования энантиомеров с синтезированным производным циклодекстрина</i>	100
<i>III.3.3 Двойные хиральные системы</i>	103
<i>III.3.4 Разделение и концентрирование индивидуальных энантиомеров кетопрофена и кеторолака</i>	111
III.4 Апробация разработанных подходов при анализе реальных объектов	116
<i>III.4.1 Определение биогенных аминов в образцах мочи с использованием ковалентных покрытий</i>	116
<i>III.4.2 Определение стероидных гормонов в плазме крови человека</i>	117
<i>III.4.3 Определение энантиомеров кеторолака в плазме крови человека</i>	118
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	123
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	125
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	133

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Применение модификаторов в методе капиллярного электрофореза (КЭ) является одним из перспективных направлений и позволяет значительно расширить возможности данного метода. Различные соединения могут быть как иммобилизованы на внутренней стенке кварцевого капилляра, так и введены в состав фонового электролита (ФЭ) в качестве псевдостационарной фазы, что приводит к росту эффективности и селективности разделения. Наряду с достоинствами данного метода (экспрессность, малый расход образца и растворителей, легкость реализации, возможность внутрикапиллярного концентрирования), это делает КЭ востребованным в области фармацевтики и медицинской химии при разделении биологически активных соединений близких по структуре, в том числе энантиомеров.

Несмотря на разнообразие соединений, которые используют для этой цели в КЭ, модификаторы на основе имидазолиевого катиона являются одними из универсальных и подходят для разделения большого количества биологически активных соединений, поскольку имеют в структуре положительный заряд, ароматическую систему, характеризуются легкостью введения различных заместителей в имидазолиевый фрагмент, а также могут участвовать в процессах внутрикапиллярного концентрирования. Введение в структуру имидазолиевого катиона β -циклодекстрина (ЦД) – часто используемого хирального селектора – могло бы обеспечить как наличие собственной электрофоретической подвижности макроцикла, так и дополнительных взаимодействий с аналитами (энантиомерами, гидрофобными стероидными гормонами), позволяющих регулировать селективность их разделения. Кроме того, установлен факт синергетического эффекта при одновременном введении в состав фонового электролита ионных жидкостей (ИЖ) и циклодекстринов при разделении энантиомеров, что также указывает на перспективность введения в имидазолиевый фрагмент ЦД в качестве заместителя. Изучению аналитических возможностей модификаторов на основе имидазолиевого катиона в качестве стационарных и псевдостационарных фаз при электрофоретическом определении биологически активных соединений посвящена данная работа.

Степень разработанности темы

Алкилимидазолиевые ионные жидкости уже зарекомендовали себя в различных областях КЭ в качестве модификаторов при формировании динамических и ковалентных покрытий стенок кварцевого капилляра, а также компонентов псевдостационарных фаз (мицеллярной или микроэмульсионной), в том числе при хиральном разделении [1]. Однако введение заместителей, обеспечивающих дополнительные взаимодействия с аналитами, могло бы расширить область

применения таких модификаторов. В настоящее время большой интерес у исследователей вызывает сочетание ЦД и имидазолиевой ИЖ [2, 3]. Их совместное использование способно улучшить параметры разделения аналитов, что было показано в условиях высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В области капиллярного электрофореза имеется много работ, посвященных применению как циклодекстринов, так и имидазолиевых ионных жидкостей. Однако потенциал последних, где одним из заместителей является циклодекстрин (т.е. имидазолиевый катион ковалентно связан с ЦД), не раскрыт. Имеется лишь незначительное количество работ, в которых обсуждается разделение тетрациклинов [4] и энантиомеров дансильных производных аминокислот [5, 6] при введении таких соединений в состав ФЭ.

Цели и задачи

Цель диссертационного исследования – разработка подходов к модификации электрофоретической системы с использованием соединений на основе циклодекстрина и имидазолиевой ионной жидкости с применением методов внутрикапиллярного концентрирования для последующего определения биологически активных веществ различной природы (гидрофобные и гидрофильные), включая хиральные, в биологических жидкостях.

Для достижения цели решались следующие **задачи**:

1. Разработка синтеза ковалентного покрытия кварцевого капилляра на основе имидазолиевого катиона с возможностью варьирования заместителей и выявление аналитических возможностей таких покрытий при определении аналитов различной природы (гидрофобных, гидрофильных и энантиомеров).
2. Характеристика полученных ковалентно связанных покрытий и установление факторов, влияющих на электрофоретическое разделение (рН, состав и ионная сила фонового электролита).
3. Синтез модификатора на основе имидазолиевого катиона и β -ЦД с последующим выявлением его возможностей в качестве псевдостационарной фазы при разделении гидрофобных аналитов (кортикостероидных гормонов) и энантиомеров лекарственных препаратов.
4. Получение оценочных характеристик по пределам обнаружения, эффективности и селективности разделения предложенных подходов.
5. Поиск различных вариантов внутрикапиллярного концентрирования с целью снижения пределов обнаружения аналитов и разработка гибридных методов онлайн концентрирования энантиомеров.

6. Апробация закономерностей, установленных на модельных системах, при анализе биологических жидкостей.

Научная новизна

В ходе диссертационного исследования предложен вариант формирования ковалентных покрытий стенок кварцевого капилляра с возможностью варьирования заместителя в имидазолиевом катионе, влияя на функциональность покрытия. Введение β -ЦД в качестве такого заместителя обеспечило возможность совместного определения гидрофобных и гидрофильных аналитов (*стероидных гормонов, биогенных аминов, аминокислот*).

Введение модификатора на основе имидазола и β -ЦД в качестве псевдостационарной фазы обеспечило разделение важнейших кортикостероидных гормонов с высокой эффективностью (70-90 тыс. теоретических тарелок). С участием данного модификатора предложен новый способ внутрикапиллярного концентрирования незаряженных аналитов: электрокинетический ввод их комплексов с положительно заряженным производным ЦД.

Введение имидазолиевого фрагмента в β -ЦД позволило использовать макроцикл в качестве хирального селектора и впервые выполнить электрофоретическое разделение энантиомеров кеторолака в режиме электрокинетической хроматографии (фактор разрешения 1.4).

Предложен гибридный вариант внутрикапиллярного концентрирования (*сочетание свипинга и градиента pH*) индивидуальных энантиомеров кетопрофена и кеторолака. Достигнутые значения факторов концентрирования составили 290-390.

Выявлен факт изменения порядка миграции энантиомеров кетопрофена в двойных хиральных системах, где наряду с изучаемым хиральным селектором роль второго селектора выполнил ванкомицин.

Теоретическая и практическая значимость работы

Получены и систематизированы результаты, объясняющие механизмы электрофоретического разделения и внутрикапиллярного концентрирования аналитов, включая энантиомеры нестероидных лекарственных препаратов, с использованием модификаторов электрофоретических систем на основе катиона имидазолия. Найденные способы внутрикапиллярного концентрирования обеспечили значительное снижение пределов обнаружения биологически активных соединений (до 1-2 пг/мл в случае биогенных аминов, 30-50 нг/мл для кортикостероидных гормонов и 12-57 нг/мл для индивидуальных энантиомеров

кетопрофена и кеторолака), достаточных для их определения в биологических жидкостях (моча, плазма крови человека).

Положения, выносимые на защиту:

1. Формирование ковалентных покрытий стенок кварцевого капилляра за счет варьирования заместителя при имидазолиевом катионе определяет их полифункциональность.

2. Алкилимидазолиевые покрытия капилляра обеспечивают совместное электрофоретическое определение основных и кислотных биологически активных соединений. Наличие β -ЦД в качестве заместителя при имидазолиевом кольце позволяет определять гидрофильные (биогенные амины и аминокислоты) и гидрофобные (стероидные гормоны) аналиты в одном аналитическом цикле и формировать хиральную стационарную фазу.

3. Модификаторы на основе имидазола и β -ЦД могут выполнить роль псевдостационарной фазы для разделения с высокой эффективностью (70-90 тыс. т.т.) важнейших кортикостероидных гормонов. Наличие собственной электрофоретической подвижности производного β -ЦД, обусловленное сочетанием с имидазолиевым катионом, может быть использовано при реализации новых подходов к внутрикапиллярному концентрированию нейтральных аналитов.

4. Положительный заряд имидазолиевого катиона в структуре β -ЦД за счет дополнительных электростатических взаимодействий с аналитами обеспечивает повышение факторов энантиоселективности для кислотных рацематов нестероидных противовоспалительных средств.

5. Сочетание различных вариантов внутрикапиллярного концентрирования (градиент рН и свипинг) позволяет сконцентрировать индивидуальные энантиомеры кеторолака и кетопрофена в 290-390 раз, в то время как традиционные варианты в данном случае малоэффективны.

6. Введение в состав фонового электролита макроциклического антибиотика ванкомицина в качестве второго хирального селектора влияет на механизм энантиораспознавания и может привести к изменению порядка миграции энантиомеров.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена значительным объемом экспериментальных данных, репрезентативностью выборки анализируемого материала, использованием современных методов анализа и научного оборудования для хроматографических и электрофоретических исследований. Результаты работы опубликованы в высокорейтинговых международных и российских журналах, индексируемых в базах РИНЦ, Web of Science и Scopus.и прошли широкую апробацию на научно-исследовательских

конференциях. Результаты представлены на 14 международных и 8 всероссийских конференциях, 7 докладов удостоены дипломами первой степени.

Статья «*Kravchenko A.V., Kolobova E.A., Kartsova L.A. Usage of 3-methyl-1- β -cyclodextrinimidazole tosylate for electrophoretic separation and preconcentration of corticosteroids by capillary electrophoresis*» отмечена дипломом Российской академией наук в рамках конкурса научных работ молодых ученых по хроматографии в честь 150-летия М.С. Цвета.

Соответствие научной специальности

Диссертационная работа соответствует пунктам 2 «*Методы химического анализа*», 8 «*Методы маскирования, разделения и концентрирования*», 10 «*Анализ органических веществ и материалов*» и 15 «*Анализ лекарственных препаратов*» паспорта специальности 1.4.2. Аналитическая химия (химические науки). Решаемые в диссертационной работе задачи также полностью соответствуют указанной специальности.

Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

I.1 Применение метода капиллярного электрофореза в области медицинской химии и в фармацевтике

Новые решения в области капиллярного электрофореза все больше привлекают внимание ученых к данному методу. Среди главных достоинств КЭ можно выделить легкость модификации электрофоретической системы, небольшие количества анализируемого образца, низкая стоимость (по сравнению с ВЭЖХ) и, конечно, высокая эффективность. Все это привело к распространению электрофоретического метода в различных областях исследования: биомедицина, экология, анализ пищевых продуктов, фармацевтика, судебно-медицинская экспертиза и др. [7, 8].

Высокая эффективность капиллярного электрофореза обеспечивает определение большого количества компонентов в биологических жидкостях за короткое время анализа. Так, например, в [9] анализ 46 наркотиков в крови человека выполнен за 20 мин (рисунок 1).

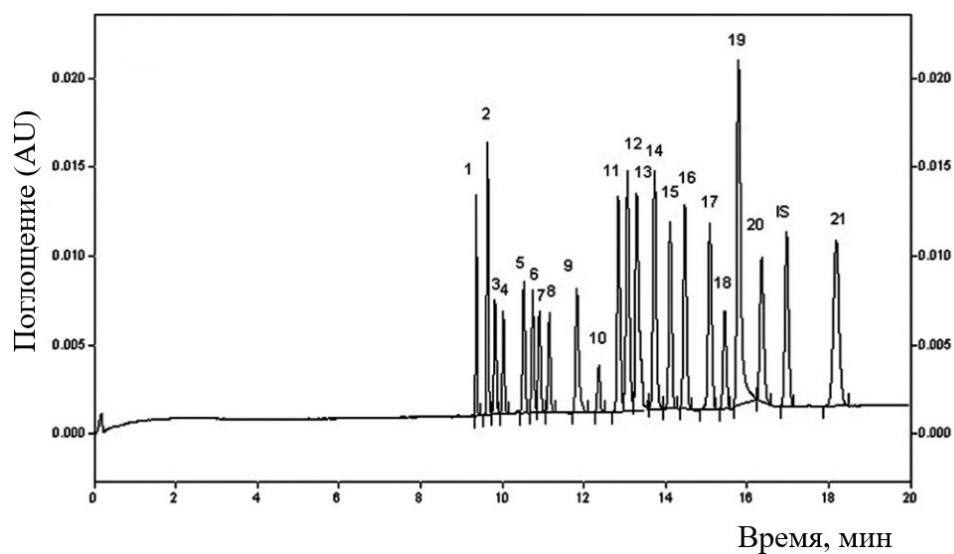


Рисунок 1 . Электрофореграммы наркотических средств и токсичных соединений.

Условия: 150 мМ фосфатный буферный электролит (рН 2.4), содержащий 20% метанола. Аналиты: 1-хлорохин, 2-фолкодин, 3-амфетамин, 4-метамфетамин, 5-3,4-метилendioксиамфетамин, 6-3,4-метилendioксиметамфетамин, 7-псевдоэфедрин, 8-эфедрин, 9-кетамин, 10-Петидин, 11-прометазин, 12-имипрамин, 13-хлорпротиксен, 14-тебаин, 15-кодеин, 16-морфин, 17-Об-моноацетилморфин, 18-героин, 19-носкапин, 20-галоперидол, 21-дифеноксилат [9].

В последние годы отмечена тенденция внедрения в биомедицину и фармацевтику электрофоретических методик определения лекарственных препаратов и их метаболитов в

биологических жидкостях, что является альтернативой традиционно используемым хроматографическим методам. Принципиальной особенностью такого подхода является возможность разделения различных групп химических соединений в одном аналитическом цикле. Значительную роль в развитии КЭ сыграла возможность модификации электрофоретической системы. Введение различных модификаторов в качестве добавок, формирование с их участием стационарных или псевдостационарных фаз оказалось мощным резервом в регулировании эффективности и селективности разделения близких по структуре соединений (метаболитов, энантиомеров), а также реализации скрининговых систем при разработке синтеза и анализа лекарственных препаратов.

1.1.1 Скрининг биологически активных соединений: лекарственных препаратов и их метаболитов

Метод КЭ востребован при скрининге как биопрепаратов (макромолекул, белковых препаратов) [10, 11], так и малых молекул. В первом случае применяют режимы капиллярного геля электрофореза (КГЭ) [12], изотахофореза [13] и капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) [14, 15] для качественного и количественного анализа самих биопрепаратов, а также для контроля в лекарственных формах их агрегатов (димеров и олигомеров), которые могут вызывать побочные эффекты у пациентов.

Крайне полезным оказался метод КЭ для анализа смесей малых молекул, поскольку наряду с определением основного компонента лекарственного средства он позволяет контролировать наличие возможных примесных соединений, органических и неорганических противоионов, выявлять энантиомерную чистоту лекарств, обнаруживать консерванты, добавляемые для предотвращения размножения грибов и бактерий [16], а также определять различные физико-химические параметры: значения pK_a [17], липофильность, способность к ассоциации с белками [18]. Нередко обнаружение основного компонента в биологических жидкостях сопровождается и определением метаболитов [19, 20]. Для этих целей используют режимы капиллярного зонного электрофореза, капиллярной электрохроматографии (КЭХ), мицеллярной электрохроматографии (МЭКХ), электрокинетической хроматографии, лигандообменного капиллярного электрофореза (ЛОКЭ) и т.п.

Тем не менее, метод КЭ рядом исследователей по-прежнему воспринимается как технически сложный и недостаточно воспроизводимый. Для опровержения этого ошибочного мнения крайне полезна публикация [21], где оцениваются воспроизводимость и надежность времен миграций, измеренных различными лабораториями в разных странах.

Одним из подходов к достижению высокой воспроизводимости времен миграции аналитов является формирование стационарных фаз на стенках кварцевого капилляра, что позволяет преодолеть сорбцию определяемых соединений на стенках кварцевого капилляра. На выбор конкретного модификатора влияет наличие и природа функциональных ионогенных групп в аналитах, гидрофобность/гидрофильность, а также размер молекул. Применение различных вариантов модификации с использованием широкого спектра соединений рассматривается в обстоятельных обзорах, например, в [22] за 2017-2019 гг. и в [23] за 2019-2022 гг., а целенаправленное их использование для определения биологически активных соединений в работе [24]. В обзорах [25, 26] обобщен материал по наночастицам (НЧ) как модификаторам электрофоретических систем, а в [1, 27] – по ионным жидкостям. Отмечен значительный рост публикаций по применению пористых материалов, таких как металлоорганические каркасы (МОК), которые могут быть адсорбированы на поверхность капилляров в виде уже готовых структур [28, 29] или синтезированы *in situ* внутри кварцевого капилляра. В таблице 1 приведены примеры работ за последние 5 лет о применении различных модификаторов для электрофоретического определения низкомолекулярных биологически активных соединений и лекарственных препаратов.

Таблица 1. Примеры использования различных соединений для формирования покрытий на стенках кварцевого капилляра.

	Модификатор	Тип покрытия	Определяемые аналиты	ссылка
Полимеры	Сополимер акриламида и 3-акриламидопропилтриметиламмония	Ковалентно связанное	Изоксуприн, миконазол, бупропион, циталопрам, верапамил, кетамин	[30]
	Сополимер акриламида и 2-акриламидо-2-метилпропансульфоната	Ковалентно связанное	низкомолекулярные органические кислоты: ацетоацетат, лактат, пироглутамат, 3-гидроксибутират, аспартат.	[31]
	Сополимер акриламида и 2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоната	Ковалентно связанное	фосфорилированные моносахариды: рибозо-5-фосфат; глюкозо-1-фосфат; фруктозо-6-фосфат; глюкозо-6-фосфат	[32]
Антибиотик	Ванкомицин	Ковалентно связанное	Энантиомеры прометазина	[33]
ИЖ	Хлорид и тетрафторборат 1-гексил-3-метилимидазолия	Монослой	метанефрин, норметанефрин, ванилинминдальная кислота и гомованилиновая кислота	[34]
Наночастицы	НЧ золота, L-цистеин, ионная жидкость лактобионат тетраметиламмония	Монослой	энантиомеры β -адреноблокаторов пропранолол, эсмолол, бисопролол и соталол	[35]
	НЧ золота, тиол- β -циклодекстрин	Золь-гель с последующей ковалентной модификацией	энантиомеры незаменимых аминокислот	[36]

Продолжение таблицы 1

МОК	$(HQA)(ZnCl_2)(2.5H_2O)_n$ HQA=6-метоксил-(8S,9R)-цинхонан-9-ол-3-карбоновая кислота	Монослой	Энантиомеры аминокислот (АК)	[37]
	<i>L-Cys-PCN-224</i> PCN: $Zr_6(\mu_3-O)_8(OH)_8(TCPP)_2$, TCPP = мезо-тетракис(4-карбоксифенил)порфирин	Ковалентно связанное	Энантиомеры АК: гистидин, метионин, валин, лейцин, фенилаланин, пролин, глутамин, триптофан, аспарагиновая кислота.	[38]
	<i>Bio-MOF-1</i> $(Zn_8(ad)_4(BPDC)_6O \cdot 2Me_2NH_2, 8DMF, 11H_2O,$ (ad=аденината, BPDC=бифенилдикарбоксилата)	Монослой	Нестероидные противовоспалительные средства (НПВС): кетопрофен, флурбипрофен, ибупрофен Сульфаниламидные препараты: сульфаметазин, сульфадиазин, сульфаметоксазол	[39]
	<i>HKUST-1 типа $Cu_3(BTC)_2$</i> (димерные металлические звенья, соединенные линкерными молекулами бензол-1,3,5-трикарбоксилата (BTC))	Ковалентно связанное	энантиоразделение пропранолола, эсмолола, метопролола, амлодипина и соталола	[40]
Смешанные	<i>ZIF-8-poly(IL-co-EDMA)</i> сополимер 1-аллилметилимидазолия хлорида и этилендиметакрилата с включениями цеолитового имидазолатного каркаса-8	Монолит	флороглюцин; гидрохинон; резорцин; пирокатехин; фенол	[41]

Продолжение таблицы 1

<p>МОК состоящие из октакис-[6-дезокси-6-(3-меркаптопропановой натрия)]-γ-циклодекстрина (сугаммадекс) и иона переходного металла (Cu^{2+}) с полидофамином в качестве линкера</p>	<p>Монослой</p>	<p>дансильные производные DL-АК</p>	<p>[42]</p>
<p>МОК $[\text{Mn}(\text{cam})(\text{bpy})]$, $\text{cam} = (1R,3S)\text{-}(+)\text{-камфорная кислота}$, $\text{bpy} = 4,4'\text{-дипиридил}$.</p>	<p>Ковалентно связанное</p>	<p>Сульфонамиды: сульфамеразин, сульфанитран, сульфадиазин, сульфадиметоксин, сульфонометоксин (, сульфаклорпиридазин, сульфаметоксазол, сульфаметизол, фталилсульфатиазол.</p>	<p>[28]</p>

Модификация стенок кварцевого капилляра

Выделяют три типа капилляров со стационарной фазой, используемых в КЭХ: набивные, полые и монолитные (Рисунок 2). Из-за сложности приготовления фриттов, а также возможного образования пузырьков и плохой воспроизводимости набивных колонок большинство работ посвящено модификациям полых и монолитных капилляров.

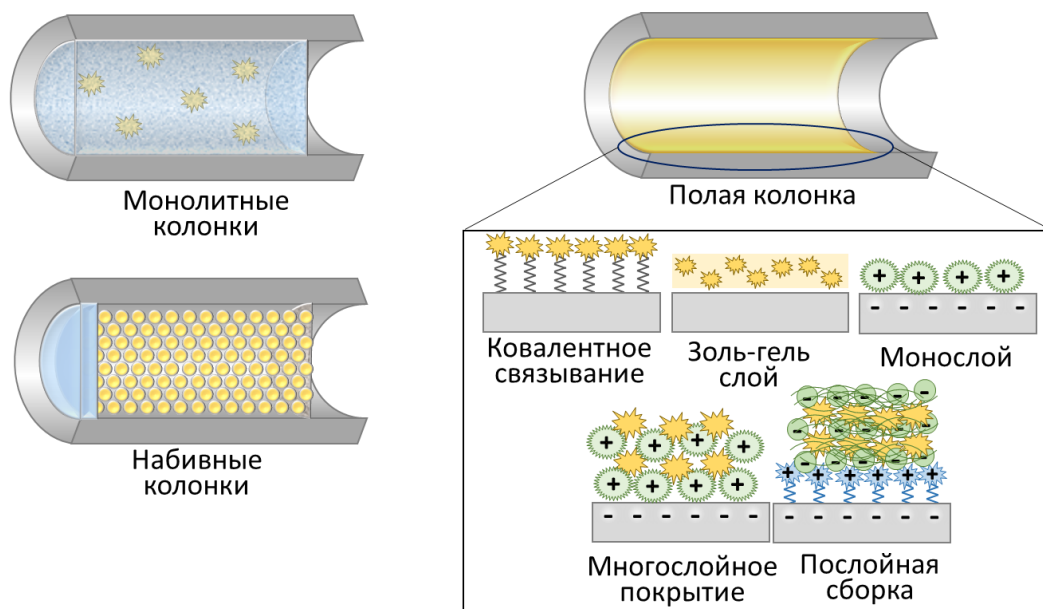


Рисунок 2. Схематическое изображение основных типов стационарных фаз, используемых в КЭХ (идея из [43]).

При изготовлении монолитных колонок макропористый материал образуется в результате процесса полимеризации *in situ*, однако данный подход требует большее количество модификатора по сравнению с полыми колонками. Для последних предложено несколько подходов к их формированию на поверхности капилляра: ковалентное связывание или сорбция (динамические, моно- и многослойные покрытия) (рисунок 2). В случае ковалентного связывания обязательным этапом является активация стенок капилляра с получением силанольных связей и последующим проведением реакций: формирование полимерного слоя (линкера) путем полимеризации или сополимеризации [44, 45], в т.ч. с использованием силилирующих агентов, получивших широкое распространение благодаря низкой токсичности и легкости образования связи Si-O [46, 47]; золь-гель технология (образование из золя – мелкодисперсной системы – геля, в котором молекулы растворителя находятся в упорядоченной 3D сетке) [48-51] и послойная самосборка (*layer by layer*) [52-55], при которой проводят последовательную промывку кварцевого капилляра растворами модификаторов и сшиванием полученных слоев между собой. В большинстве случаев имеет место последующая функционализация полученных покрытий для

целевого определения конкретных соединений за счет таких нековалентных взаимодействий как ионные, π - π -стэкинг, водородные связи.

Методы получения ковалентно связанных стационарных фаз основаны на проведении химических реакций, но их протекание сложно контролировать из-за того, что капилляр представляет собой закрытую систему. Подтверждением модификации часто служат характеристики, полученные физико-химическими методами [56]:

– *Поверхностный заряд стенок кварцевого капилляра.* Формирование покрытия часто сопровождается изменением поверхностного заряда и, следовательно, изменением величины и направления электроосмотического потока (ЭОП): если модификатор на поверхности капилляра имеет катионную функциональную группу, направление ЭОП станет анодным; на немодифицированном капилляре регистрируется катодный ЭОП. На величину ЭОПа также влияют плотность покрытия и рН фонового электролита, а воспроизводимость скорости ЭОПа от анализа к анализу является показателем стабильности покрытия.

– *Морфология поверхности и толщина покрытия* определяется сканирующей электронной микроскопией (СЭМ), которая стала незаменимым методом для визуального подтверждения наличия модификации на внутренней стенке кварцевого капилляра (рисунок 3). На фотографиях внутренней поверхности капилляров с ковалентно связанной стационарной фазой видны шероховатости, холмистые и неровные поверхности, что отсутствуют в случае немодифицированного капилляра (поверхность гладкая). Кроме того, снимками СЭМ можно оценить плотность и однородность сформированного покрытия. Интересным применением СЭМ является оценка стабильности покрытия путем получения изображений до и после проведения цикла анализов.

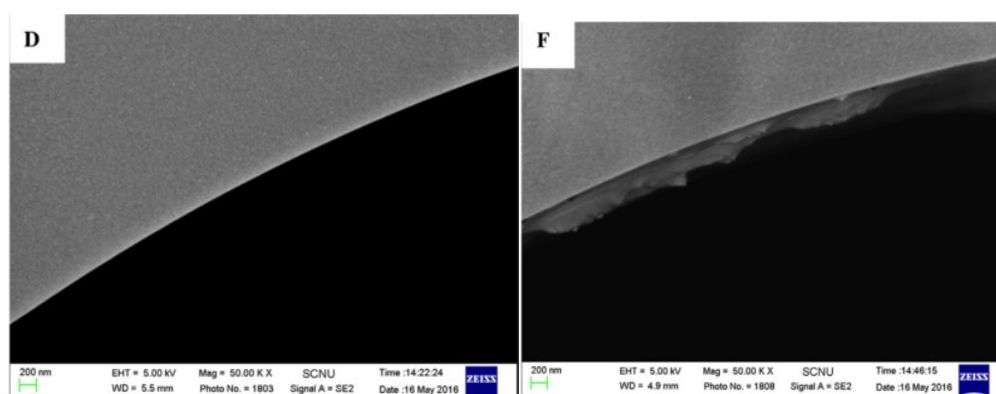


Рисунок 3. Снимки, полученные методом СЭМ, немодифицированного и модифицированного капилляров [55].

– *Элементный анализ, химическая структура* (колебательная и абсорбционная спектроскопия). Элементный анализ методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии позволяет получить информацию о материалах, состоящих из определенных элементов, таких как металлический цинк, золото или углерод в графене, металлоорганических каркасах и наночастицах [35-37, 57]. Инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием необходима для подтверждения предполагаемых ковалентных связей и, как следствие, фактического прикрепления модификатора к внутренним стенкам капилляра.

– *Кристаллическая структура* (рентгеноструктурный анализ). Не так давно стали использовать для подтверждения химических структур рентгеноструктурный анализ и рентгеновскую фотоэлектронную спектроскопию [57]. Первый метод важен для выявления и подтверждения кристаллической структуры используемых модификаторов, в то время как второй – позволяет выявить формирование образующихся ковалентных связей, в том числе при прикреплении к стенкам капилляра. Подтверждение структуры покрытия, а также его стабильности, необходимо при контроле воспроизводимости характеристик покрытий от капилляра к капилляру и особенно важно при использовании модифицированных капилляров в рутинных анализах.

Введение модификаторов в состав фонового электролита

Введенные в состав фонового электролита модификаторы не только способны формировать динамические покрытия на стенках капилляра (моно- и полислойные), но и могут выступать в качестве псевдостационарной фазы с реализацией режимов МЭКХ, микроэмульсионной электрокинетической хроматографии (МЭЭКХ) или ЭКХ в зависимости от типа используемых модификаторов и их взаимодействий с определяемыми аналитами. Одно из главных преимуществ таких вариантов – возможность варьировать концентрацию модификатора в составе ФЭ, обеспечивая большее количество сайтов взаимодействия с аналитами, в то время как с модификатором на стенках капилляра их количество может быть ограничено удельной поверхностью покрытия. Кроме того, такие методы незаменимы для разделения нейтральных липофильных соединений, например, жирорастворимых витаминов [58] и стероидных гормонов [59]. Отсутствие ограничений по структуре и количеству используемых модификаторов в ФЭ расширяет аналитические возможности поиска условий разделения соединений близких по структуре, включая энантиомеры. Важно отметить, что методом КЭ можно решать весьма сложные задачи в области хирального разделения. Так, для энантиоразделения офлоксацина и четырех родственных ему веществ разработан режим лигандообменной мицеллярной электрокинетической хроматографии с комплексами меди(II)-L-изолейцина в качестве

хирального селектора, включенного в мицеллы додецилсульфата натрия (ДДСН) (рисунок 4) [60].

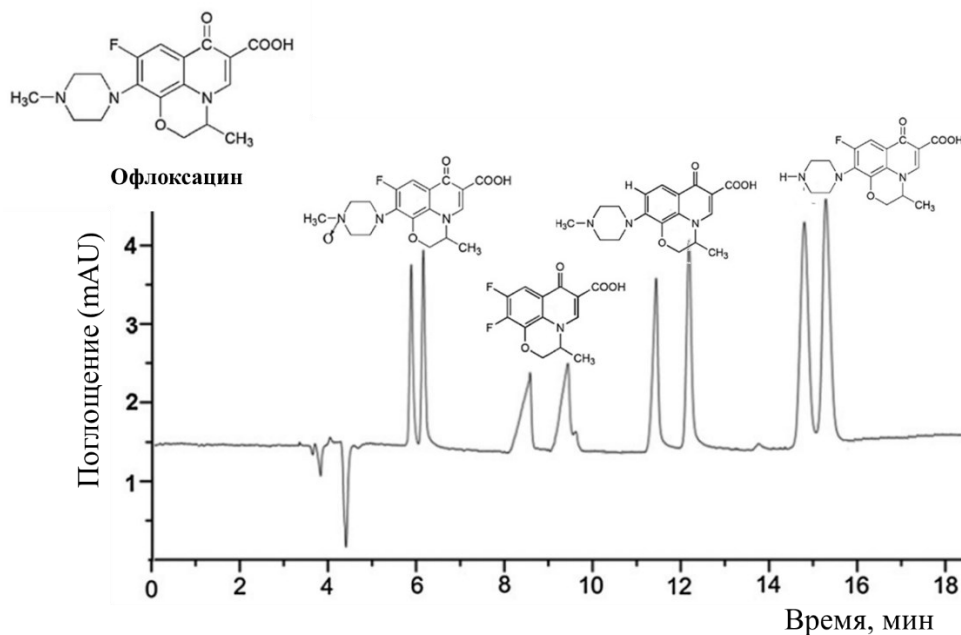


Рисунок 4. Электрофореграмма совместного энантиомерного разделения примесей офлоксацина и родственных структур [60].

При этом доминирующими модификаторами для разделения энантиомеров по-прежнему остаются циклодекстрины (см. Глава 1, раздел 2).

1.1.2 Другие приложения метода капиллярного электрофореза при модификации электрофоретической системы

Интересным применением КЭ является возможность изучать метаболизм, в том числе ферментативные реакции, используя одну часть капилляра в качестве микрореактора, а другую – для разделения продуктов реакции [61, 62]. Первый такой эксперимент осуществлен в 1991 г. Vanke для анализа щелочной протеазы [43].

В качестве примера рассмотрим глюкуронырование ацетаминофена – анальгетика и жаропонижающего средства. Микросомы, выделенные из печени крысы, инкапсулировали в матрицы на основе тетраметоксисилана для проведения метаболизма лекарств с последующим определением метаболитов. Субстраты электрокинетически вводили в микрореактор и метаболизировали уридин-5'-дифосфоглюкуронозилтрансферазой (УДФГ). Далее метаболиты и непрореагировавшие субстраты электрофоретически разделяли и детектировали (рисунок 5). Инкапсулированная колонка с микросомами может быть использована повторно без потери

активности, по крайней мере, в течение двух дней, что позволяет осуществлять скрининг с высокой пропускной способностью [63].

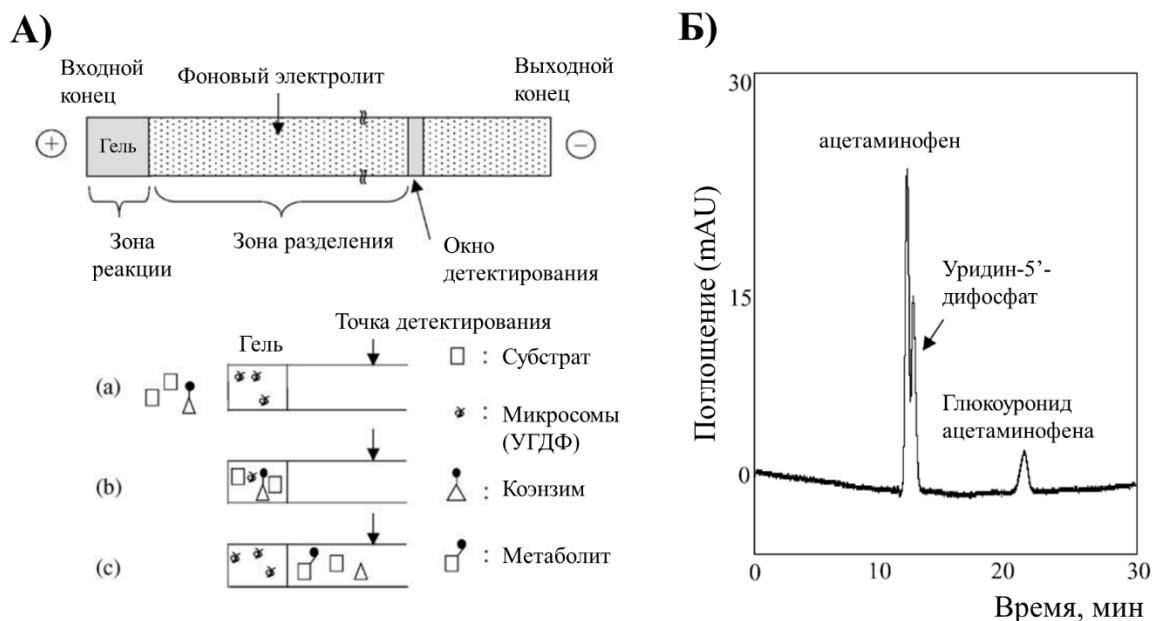


Рисунок 5. Схема аналитической системы для определения метаболитов лекарственных средств (а) и электрофореграмма при онлайн мониторинге метаболизма ацетаминофена (б).

Условия: анализируемый образец 2 мМ ацетаминофена, 20 мМ УДФГ и 10 мМ $MgCl_2$; ввод: 4 кВ, 20 с; длина геля, инкапсулированного в микросомы 2.0 см; общая длина 34 см; фоновый электролит 20 мМ фосфатный буфер (рН 7.5); приложенное напряжение 4 кВ; 254 нм. [63].

Модификация стенок кварцевого капилляра позволяет проводить скрининг эффективности производных лактозы как антагониста взаимодействия между лейкоцитами и эндотелиальными клетками. Сверхэкспрессирующие клетки НЕК 293 (*Human Embryonic Kidney 293*) – клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека) – иммобилизовали на внутренней стенке капилляров в качестве стационарной фазы, имитируя эндотелиальные клетки, выстилающие внутреннюю поверхность кровеносных сосудов; (*N*-[2-(1,3-dilactosyl)-propanyl]-2-amino-pentandiamide (Gu-4)) добавляли в фоновый электролит для имитации лекарственного средства в крови. Форму электрофоретического пика использовали для оценки взаимодействия между производными лактозы и стационарными фазами (рисунок 6) [64].

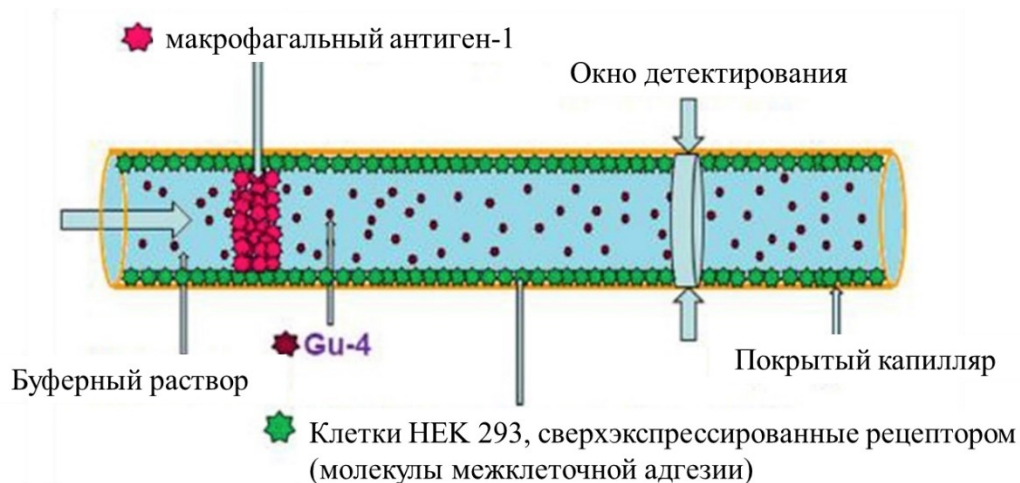


Рисунок 6. Имитация кровеносной системы [64].

1.2 Хиральное разделение методом капиллярного электрофореза с использованием циклодекстринов

Разделение энантиомеров является одной из трудоемких, непростых и в тоже время важных задач в области фармацевтической и медицинской химии. Энантиомеры лекарственного средства могут заметно различаться по активности, токсичности и иметь разное воздействие на живой организм. Один из энантиомеров обычно имеет желаемую терапевтическую активность (*эутомер*), другой (*дистомер*) — может быть неактивен или же, наоборот, его действие проявится в качестве антагониста, вызывающего нежелательные побочные эффекты и даже токсичность. Именно поэтому необходим контроль энантиомерной чистоты лекарственных препаратов методами разделения для обеспечения требуемых факторов разрешения определяемого аналита и его энантиомерной примеси, а грамотная стратегия онлайн концентрирования позволит повысить чувствительность и обнаруживать эту примесь при низких концентрациях. Кроме того, отмечается и важность последовательности миграции энантиомеров при определении энантиомерной примеси [65]: желательно, чтобы примесный компонент оказался первым мигрирующим энантиомером во избежание перекрытия с основным пиком. К наиболее часто используемым методам разделения и концентрирования при определении энантиомеров относят ВЭЖХ, КЭ, ГХ. Лидирует метод ВЭЖХ (рисунок 7), однако при этом требуются дорогостоящие колонки с хиральной стационарной фазой, в то время как капиллярный электрофорез характеризуется более высокими значениями эффективности, имеет минимальные требования к объему образца и типу растворителя.

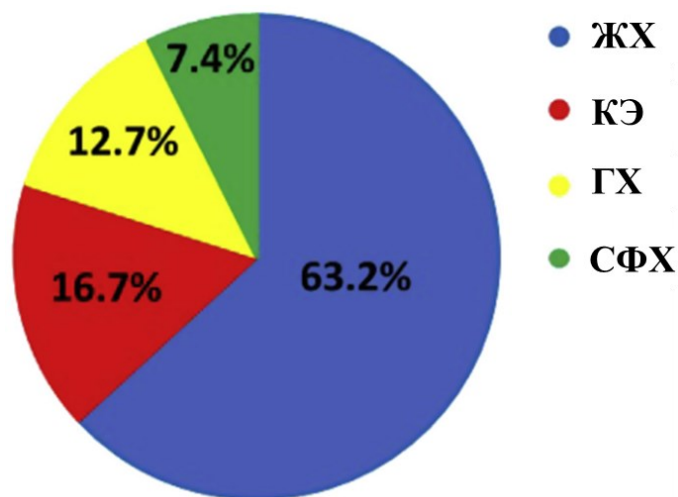


Рисунок 7. Количество статей, опубликованных в период с 2015 по 2019 гг. по хиральному разделению с использованием различных методов. Данные получены из базы данных Web of Science (Август 2019) по ключевым словам: “chiral analysis” и “Liquid chromatography”, “capillary electrophoresis”, “gas chromatography”, “supercritical fluid chromatography” [65].

Еще одним достоинством метода КЭ при разделении энантиомеров является наличие у ионогенных соединений собственной электрофоретической подвижности при наложении напряжения, что определяется особенностями самого метода. Это вносит дополнительный вклад в механизмы разделения и позволяет таким образом повышать селективность хирального распознавания по сравнению с методом ВЭЖХ, где селективность хирального разделения полностью определяется лишь различием сродства энантиомеров к хиральному селектору [66].

В качестве хиральных селекторов в КЭ успешно зарекомендовали себя циклодекстрины (ЦД) [67-72] – циклические олигосахариды, образованные 6 (α -ЦД), 7 (β -ЦД) или 8 (γ -ЦД) α -1,4-D-глюкопиранозидными звеньями в виде тороидальной структуры с гидрофобными полостями внутри и гидрофильными поверхностями с внешней стороны. Именно наличие гидрофобной полости способствует образованию комплексов включения с энантиомерами. Разное пространственное строение последних приводит к различию в их взаимодействии с полостью ЦД, а также с гидроксильными группами на поверхности ЦД. Сродство энантиомера к полости ЦД можно численно охарактеризовать константами комплексообразования, однако это не дает представления о самой структуре комплекса. Чаще всего для решения подобных задач прибегают к компьютерному моделированию и подтверждают выдвинутые гипотетические структуры методом ядерного магнитного резонанса [69, 73, 74]. Так, например, для ибупрофена и β -ЦД показано, что энантиомеры ибупрофена в полости ЦД обращены неполярной группой в сторону более широкой полости β -ЦД; R-энантиомер более свободно перемещается внутри полости

макроцикла, в то время как *S*- демонстрирует более ограниченное движение. Кроме того, *S*-энантиомер образует значительное количество водородных связей со вторичными гидроксильными группами β -ЦД, в то время как *R*-изомер такой особенностью не обладает. Все эти факторы приводят к различиям в константах комплексообразования и электрофоретических подвижностях соответствующих комплексов и, как следствие, к хиральному разделению (рисунок 8).

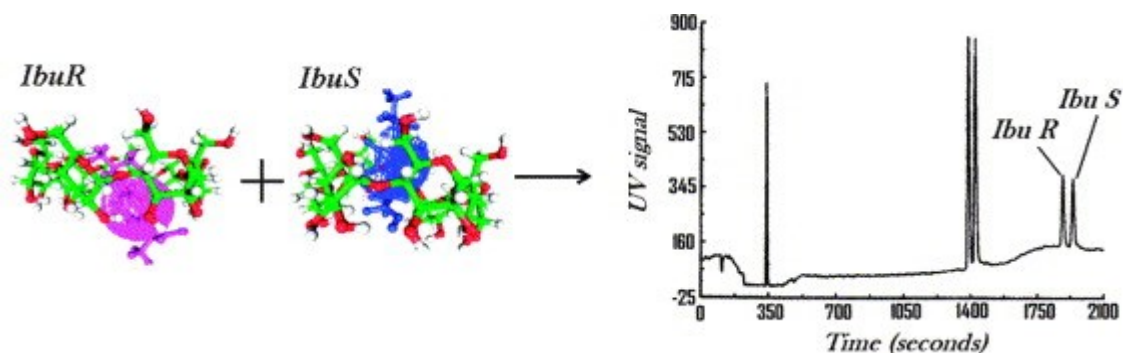


Рисунок 8. Схема формирования комплексов энантиомеров ибупрофена с ЦД [73].

Предпринимаются попытки изучать процессы комплексообразования и методами разделения. Авторам в [75] удалось оценить вклад образования комплексов включения в энантиоселективность при подходе аналитов с узкой или широкой стороны ЦД. Ковалентная пришивка ЦД к силикагелю позволяет зафиксировать положение олигосахарида таким образом, что для комплексообразования с энантиомером остается доступной одна из его сторон (узкая или широкая). Монозамещенные по первичной (узкая сторона) или вторичной (широкая сторона) гидроксильной группе азид-ЦД использовали для дальнейшего проведения клик-реакции с алкинил-функционализированной поверхностью силикагеля (рисунок 9). Проведение анализов с двумя такими типами стационарных фаз, где доступно взаимодействие только с одной из сторон ЦД, позволяет сделать вывод, что для дансильных производных энантиомеров лейцина больший вклад в энантиоселективность обеспечивает комплекс, когда аналит заходит с широкой стороны ЦД, способствуя и большим значениям факторов энантиоселективности, а в случае с флавоном даже изменяется порядок миграции энантиомеров в зависимости от ориентации ЦД в используемой стационарной фазе (рисунок 9).

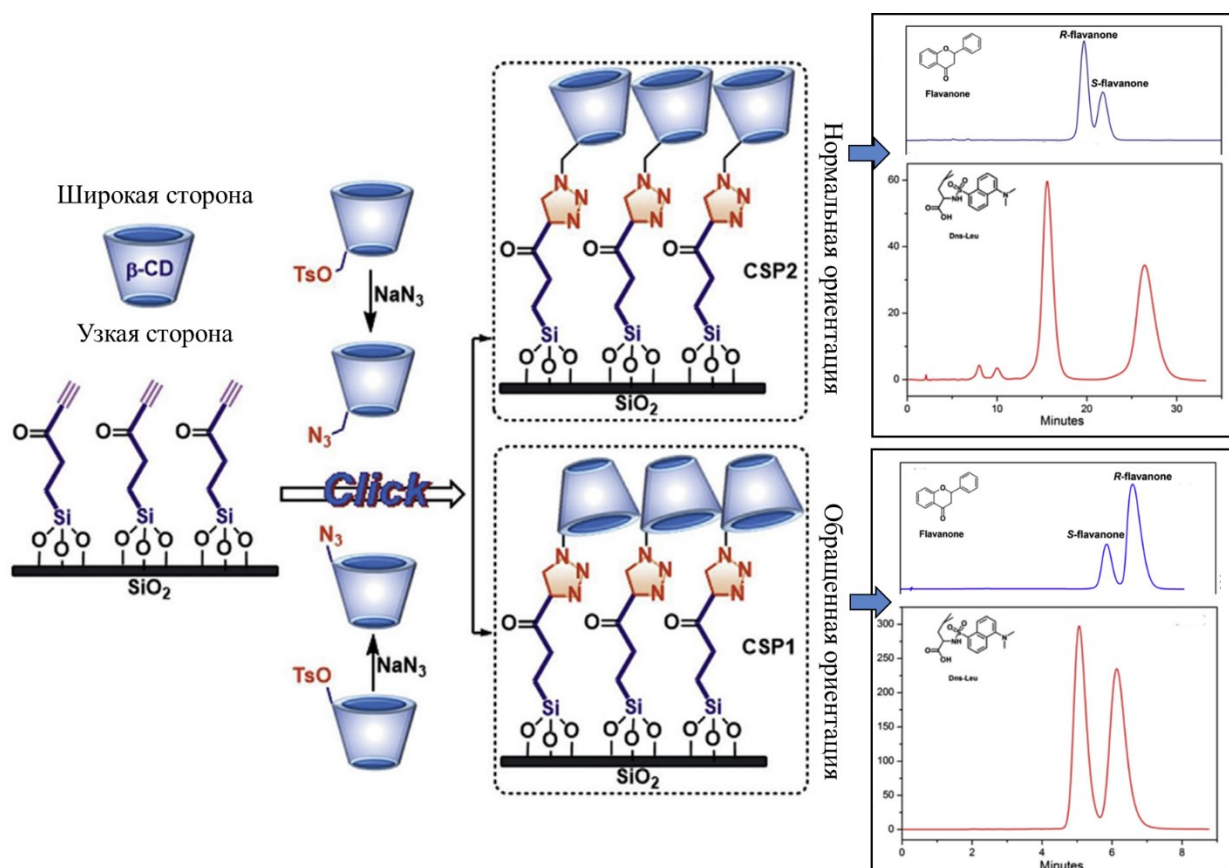


Рисунок 9. Схема синтеза стационарной фазы на основе ЦД с нормальной и обращенной ориентацией макроцикла и хроматограммы дансильных производных D,L-лейцина и R,S-флавона, полученные на двух разных стационарных фазах

Условия: 40% MeOH, 60%-ный триэтиламмонийный ацетатный буферный раствор (pH 5.01), 1 мл/мин, 30 °C [75].

Тем не менее использование классических ЦД в качестве хиральных селекторов не всегда позволяет добиться полного электрофоретического разделения требуемых энантиомеров. В некоторых случаях требуется увеличить факторы энантиоселективности с помощью добавок в состав ФЭ наряду с имеющимся хиральным селектором, что способствуют реализации дополнительного механизма взаимодействия с аналитами. Не менее перспективно направление, связанное с модификацией самих циклодекстринов: введение различных заряженных групп в состав макроцикла может не только повлиять на факторы разрешения нейтральных аналитов, но и способствовать повышению селективности противоположно заряженных относительно производного ЦД энантиомеров за счет дополнительных электростатических взаимодействий. Именно эти два направления подробнее рассмотрены ниже.

1.2.1 Замещение гидроксильных групп в молекулах циклодекстринов

Замещение гидроксильных групп в молекулах циклодекстринов различными положительно или отрицательно заряженными функциональными группами расширяет аналитические возможности этих макроциклов для разделения энантиомеров [76, 77]. Незаряженные ЦД (*нативные и дериватизированные*) могут быть использованы только для разделения заряженных аналитов, поскольку мигрируют совместно с ЭОП. Электрофоретическая подвижность такого комплекса обеспечивается лишь собственной электрофоретической подвижностью аналитов [70, 71]. В свою очередь, заряженные ЦД могут не только обеспечить хиральное разделение рацематов, но также обладают хорошей разрешающей способностью по отношению к противоположно заряженным аналитам как за счет образования комплексов включения, так и посредством электростатических взаимодействий [78-81]. Противонаправленная миграция энантиомеров и хирального селектора позволяет использовать низкие концентрации последнего, уменьшая вязкость раствора и предотвращая высокие значения тока [82]. Кроме того, введение заместителей в ЦД можно рассматривать как способ изменения размера его полости, что также отражается на эффективности образования комплексов «*гость – хозяин*» и хиральном распознавании.

Циклодекстрины имеют 18, 21 и 24 свободных гидроксильных групп в случае α -, β - и γ -CD, соответственно: по одной первичной и две вторичных в каждом звене глюкопиранозы, с участием которых возможны химические модификации (рисунок 10). Первичные гидроксильные группы (ОН-6) являются наиболее основными, нуклеофильными и стерически доступными и могут быть легко модифицированы разными электрофилами. Водородная связь между ОН-2 и ОН-3 соседних звеньев глюкопиранозы и соседняя электроноакцепторная аномерная ацетальная функция приводят к тому, что кислотность ОН-2 оказывается самой высокой. Эти гидроксильные фрагменты могут быть селективно депротонированы, например, в безводных средах в присутствии оснований. Гидроксильные группы ОН-3 менее реакционноспособны и наименее стерически доступны. Модификация в это положение требует использования защитных групп или реагентов, способных прочно связываться с полостью ЦД [69].

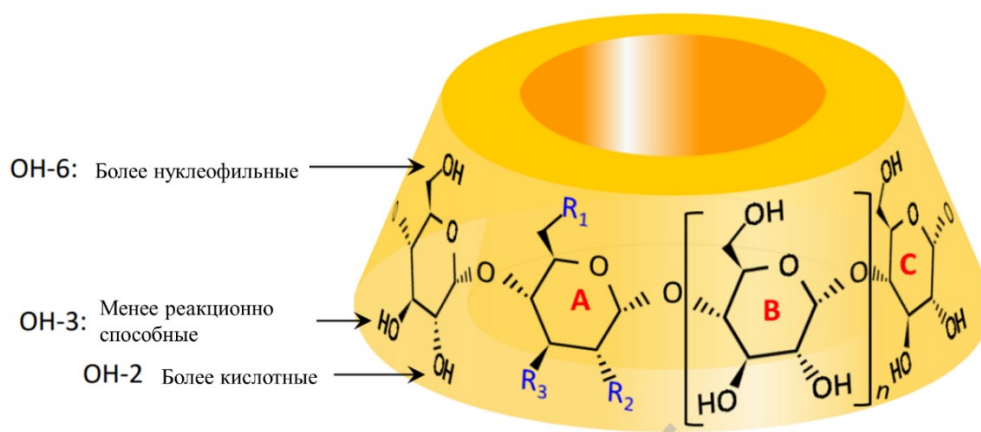


Рисунок 10. Схематическое изображение циклодекстрина с возможными сайтами модификации [69].

При проведении модификации важен контроль степени замещенности ЦД. Использование монозамещенных по сравнению с коммерчески доступными случайно замещенными ЦД наиболее предпочтительно: такие ЦД обеспечивают большую воспроизводимость и энантиоселективность. На данный момент известно значительное количество монозамещенных производных ЦД с описанием способов их получения. В этом ряду среди отрицательно заряженных можно выделить сульфатированные, карбоксиметилированные и сульфобутиловые эфиры ЦД, синтезу и применению которых посвящен обстоятельный обзор [83]. Катионные производные ЦД обычно включают пирролидин [84, 85], аминогруппы [79, 86-89] или имидазол [5, 90]. Последние имеют ряд преимуществ: ароматическая система, легкость введения заместителей в структуру имидазольного кольца, дополнительные взаимодействия с аналитами. Тем не менее их потенциал до конца до сих пор не раскрыт. Имидазольные производные ЦД могут быть эффективными хиральными селекторами для разделения отрицательно заряженных аналитов, имеющих в составе молекул ароматическую систему. К ним относятся, например, нестероидные противовоспалительные препараты из-за наличия ароматического имидазольного кольца в составе их молекул, вносящего вклад в энантиоразделение за счет π - π -взаимодействия между катионом имидазолия и лекарственным препаратом [6].

Дополнительный вклад в хиральное распознавание могут вносить и водородные связи между аналитами и заместителями в ЦД, природа которых принципиальна. Так, в [69] показано, что из двух гомологов – моно-6А-(2-метоксиэтиламино)- β -ЦД (MEtAMCD) и моно-6А-(4-метоксибутиламино)- β -ЦД (MBuAMCD) – именно MEtAMCD обеспечивает лучшую энантиоселективность в отношении дансильных производных аминокислот, а также феноксиалкановых и гидроксикислот за счет образования водородных связей, что подтверждено методом ЯМР-спектроскопии (рисунок 11).

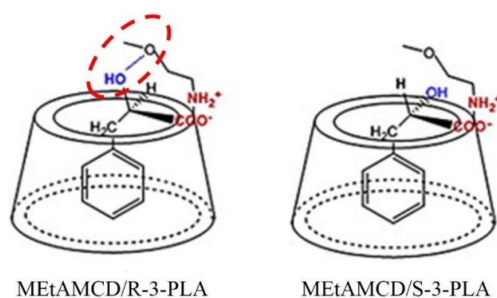


Рисунок 11. Пространственные различия в образовании комплексов MEtAMCD с 3-фенилмолочной кислотой (3-PLA). Дополнительная водородная связь, отвечающая за хиральную селективность, выделена красным пунктиром [69].

Введение заместителей в структуру циклодекстрина не только способствует усилению хирального распознавания за счет дополнительных взаимодействий, но и может полностью изменить механизм разделения энантиомеров вплоть до реализации режима лигандообменного КЭ; β -ЦД, гидроксильная группа которого замещена имидазол-связанным гистамином, был успешно использован для разделения недериватизированного рацемата триптофана в присутствии иона меди (II) по механизму лигандного обмена. При этом сам циклодекстрин выступал в качестве лиганда первой координационной сферы [91]. Предполагаемые структуры комплексов представлены на рисунке 12А. При концентрациях ЦД выше 0.6 мМ формировались стабильные комплексы, и разделения энантиомеров не наблюдалось (рисунок 12Б). Полное разделение достигалось при низких концентрациях модификатора (0.10 и 0.25 мМ), когда равновесие смещалось в сторону диссоциации комплекса. Несколько более высокая стабильность L-энантиомерного комплекса приводила к разным временам миграции двух энантиомеров и лучшему разрешению (рисунок 12Б).

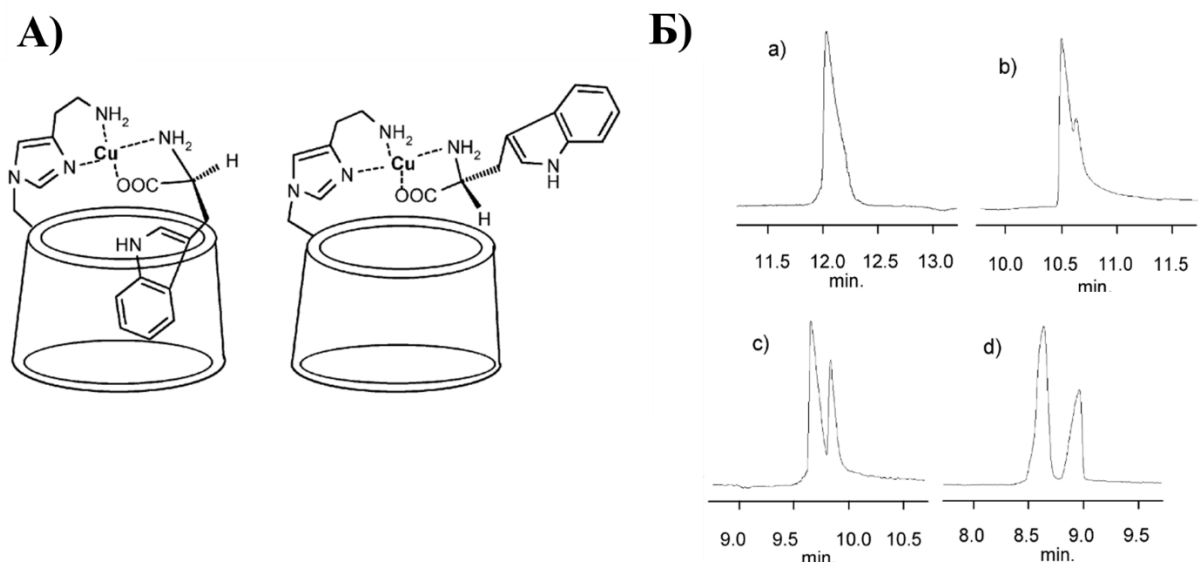


Рисунок 12. Предполагаемые структуры комплексов L- (слева) D- (справа) триптофана с β -ЦД, замещенным имидазол-связанным гистамином (А), и электрофореграмма разделения энантиомеров триптофана в режиме ЛОКЭ с введением модификатора в концентрациях 1.8 (а), 0.8 (б), 0.6 (с), 0.25 мМ (д) (Б) [91].

1.2.2 Система двух модификаторов в составе фонового электролита для энантиоразделения

В некоторых случаях энантиоселективность можно улучшить путем введения в состав ФЭ второго модификатора, если он также является хиральным селектором. Такую систему называют *двойной хиральной системой*. Одна из наиболее изученных – нейтральный ЦД (нативный, дериватизированный) в сочетании с заряженным (анионным, катионным, цвиттерионным) ЦД. В таких системах рост энантиоселективности достигается за счет различия в механизмах комплексообразования двух различных ЦД с энантиомерами [82]. Несмотря на то, что подобные комбинации остаются одним из наиболее используемых подходов в хиральном КЭ, поиск альтернативных добавок по-прежнему актуален. Появление новых функциональных материалов, таких как ионные жидкости, глубокие эвтектические растворители (ГЭР), НЧ, молекулярно-импринтированные полимеры (МИП), МОК и др. [92]) в существенной степени отразилось и на аналитических возможностях метода КЭ, где их стали активно применять в качестве добавок в фоновый электролит, в том числе и при разделении энантиомеров (рисунок 13А).

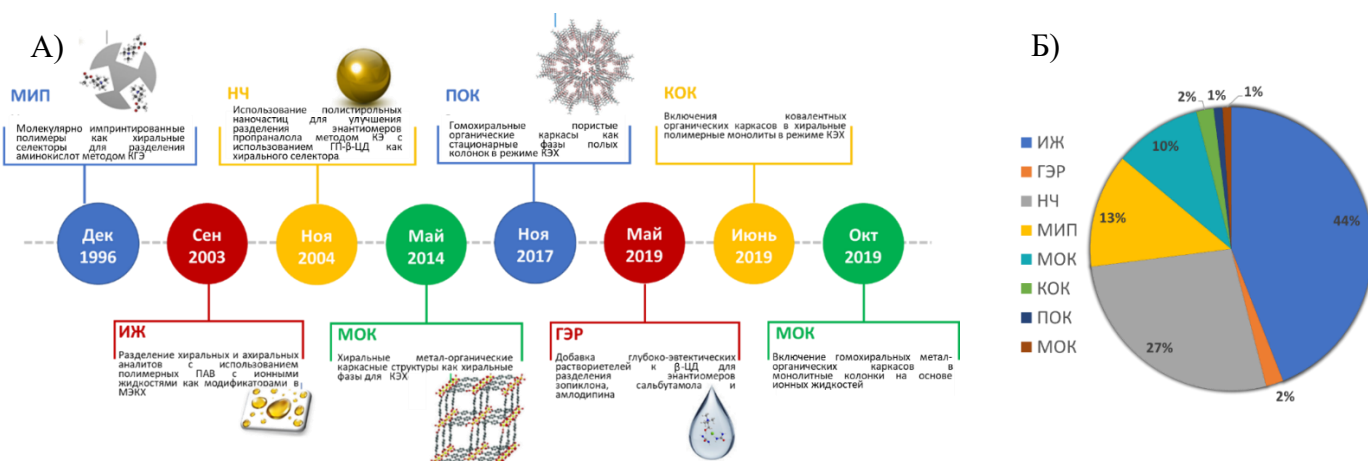


Рисунок 13. Новые функциональные материалы в качестве хирального селектора и их первое применение в КЭ (А) и количество их упоминания в области хирального КЭ (Б). (на основе [92])

Широкое применение в качестве добавок в фоновый электролит при хиральном разделении получили ионные жидкости (~ 44% среди других новых функциональных материалов, рисунок 13Б) [92]. Несмотря на большое количество публикаций [93-100], исследования в этой области продолжаются, что обусловлено не только разнообразием структур ИЖ (вариабельность катионов и анионов), но и уникальными свойствами этих соединений: растворимость в органических растворителях и воде, высокая электропроводность, электростатические взаимодействия с аналитами [101]. Ионные жидкости уже нашли активное применение в методе капиллярного электрофореза: введенные в фоновый электролит, они могут выполнить роль псевдостационарной фазы [93-95], модификатора стенок кварцевого капилляра [96,97], хирального селектора [98-100]. При этом ведутся терминологические дискуссии: остаются ли они в данном случае ионными жидкостями как таковыми или это – смесь независимых катионов и анионов [65].

Применяют как ахиральные, так и хиральные ИЖ, причем в последних – хиральным может быть катион, анион или оба иона [102]. В типичных ахиральных ИЖ, используемых для энантиоразделения в КЭ, в качестве катиона выступают тетраалкиламмоний, алкилимидазолий и алкилпиридиний, а анионной частью обычно служат неорганические анионы (например, OH^- , Cl^- , Br^- , $[\text{BF}_4]^-$, $[\text{PF}_6]^-$). Ахиральные ИЖ в составе ФЭ при наличии хирального селектора могут выполнить роль модификатора, способствуя повышению селективности разделения за счет следующих факторов:

– *изменение ионной силы фонового электролита*, что может повлиять на величину электроосмотического потока и силу тока; это, в свою очередь, приведёт к изменению миграционных характеристик аналитов и эффективности;

- адсорбция катионов ИЖ на внутренней поверхности стенок капилляра, что предотвращает сорбцию аналитов, подавляет катодный ЭОП и даже обращает его до анодного: параметры миграции энантиомеров изменяются, увеличивается эффективность;
- влияние на хиральное распознавание за счет дополнительных взаимодействий с аналитами и имеющимся хиральным селектором.

Среди первых примеров использования ахиральной ИЖ в качестве дополнительного модификатора для хирального разделения можно отметить работу [103], где хиральные нафтолы (\pm)-1,1'-би-2-нафтол (ВОН), ((\pm)-1,1'-би-2-нафтил-2,2'-диилгидрофосфат (BNP) и 1, 1'-би-2-нафтил-2,2'-диамин (BNA) (рисунок 14) разделяли в режиме МЭКХ, используя поли(олеил-L-лейцилвалин натрия) в качестве мицеллообразующего и хирального агента. Только при введении в фоновый электролит ахиральной ИЖ в качестве модификатора хиральной системы удалось разделить все три пары энантиомеров в одном цикле электрофоретического анализа. При исследовании влияния природы ИЖ, в качестве которых взяты тетрафторборат 1-бутил-3-метилимидазолия (BMImBF_4), тетрафторборат 1-этил-3-метилимидазолия (EMImBF_4), гексафторфосфат 1-этил-3-метилимидазолия (EMImPF_6), 1-этил-3-трифторметансульфонат метилимидазолия ($\text{EMImSO}_3\text{F}_3$) и хлорид 1-этил-3-этилимидазолия (EMIMCl)), на факторы разрешения энантиомеров при разделении трех рацематов одновременно, найдено, что ионная жидкость EMImPF_6 обеспечила лучшее разделение всех рацематов за исключением ВОН (рисунок 14, электрофореграмма II). Успешное решение было достигнуто при использовании ионных жидкостей BMImBF_4 и EMImPF_6 (рисунок 14, электрофореграммы III, IV).

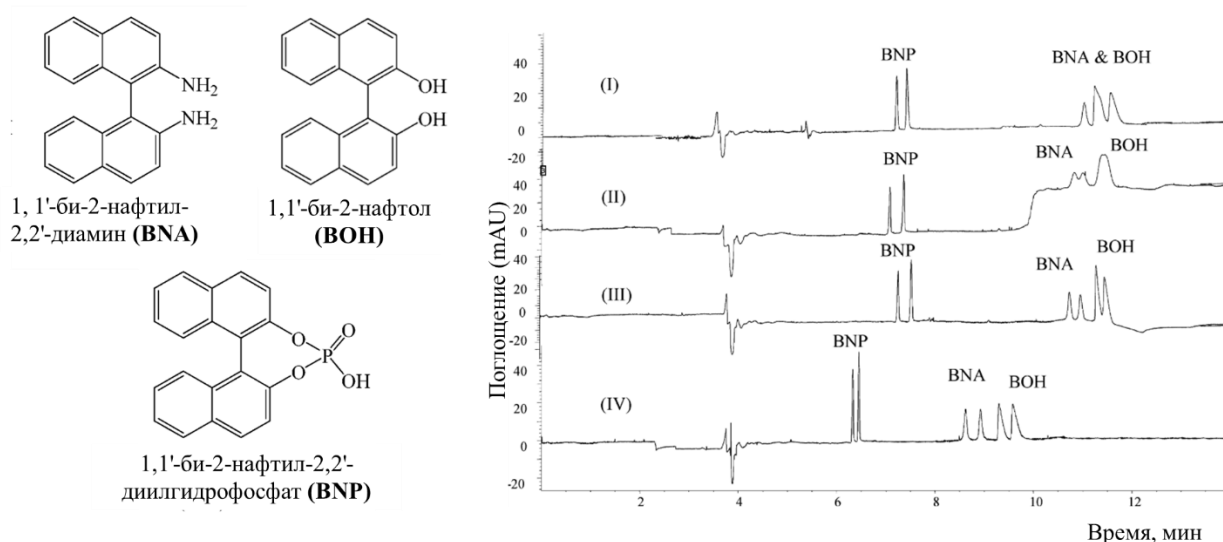


Рисунок 14. Структуры трех рацемических смесей бинафтильных производных (слева) и электрофореграммы их разделения (справа) без использования ИЖ (I); с добавлением 5 мМ EMImPF₆ (II); 1 мМ BMImBF₄ (III); 2 мМ EMImBF₄ (IV).

Условия: 0.5% поли(олеил-L-лейцилвалин натрия), 10 мМ трис(гидроксиметил)аминометана, 10 мМ боратный буфер (pH 10.0). ввод пробы 3 с 30 мбар, 15 °С, 30 кВ, 245 нм [103].

Несмотря на то, что применение ахиральных ИЖ позволяет улучшить разделение энантиомеров, хиральное распознавание обеспечивается именно взаимодействием между энантиомерами и хиральным селектором, т.е. такой добавкой можно лишь незначительно увеличить разрешение (R_s). Использование хиральных ИЖ более перспективно, так как в отличие от ахиральных, они могут внести дополнительный вклад в энантиораспознавание, сохраняя при этом способность к модификации электрофоретической системы. Для двойных хиральных систем, когда в составе ФЭ присутствуют хиральный селектор и хиральная ИЖ, в процессе разделения энантиомеров наблюдается синергетический эффект. Важной задачей стало его подтверждение, а также доказательство того, что хиральные ИЖ не просто модифицируют электрофоретическую систему, но и участвуют в процессе энантиораспознавания.

Синергетический эффект совместного применения хиральной ИЖ и ЦД для энантиоразделения ряда аналитов впервые был показан в [104, 105]. Авторы подробно изучили возможность существования данного явления, рассмотрев в качестве модельной систему, состоящую из трех объектов: аналит, хиральная ИЖ и производное ЦД (рисунок 15).

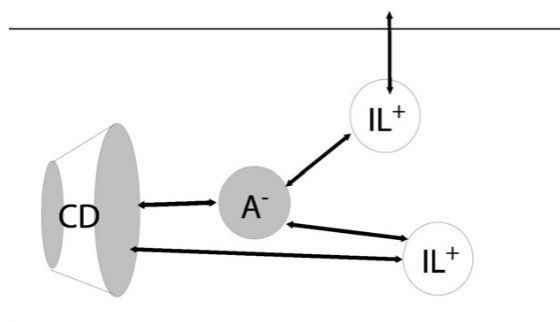


Рисунок 15. Схематическое изображение возможных взаимодействий в системе: аналит, хиральная ИЖ (хиральный катион в составе ФЭ или адсорбированный на стенках капилляра) и производное ЦД [105].

В качестве хирального катиона ИЖ использовали этил- и фенилхолин бис(трифторметилсульфонил)имида. Для выявления специфического эффекта хирального катиона параллельно проводили эксперимент, где вместо хиральной ИЖ в состав ФЭ вводили LiNTf₂ в тех же условиях. Для оценки влияния адсорбированной на стенках капилляра ИЖ выполнены дополнительные эксперименты на капилляре, покрытом полибреном [105]. Модельная смесь включала арилпропионовые кислоты (*напроксен, ибупрофен, кетопрофен, супрофен, карпрофен, индопрофен*). Удалось установить, что природа ЦД влияет на конкуренцию между аналитом и катионом ИЖ благодаря комплексообразованию с полостью ЦД; введение ИЖ увеличивает факторы разрешения энантиомеров за счет солевого эффекта (ИЖ выступает в качестве модификатора электрофоретической системы); рост факторов разрешения за счет селективности разделения подтверждает существование синергетического эффекта совместного присутствия двух селекторов, а в случае хиральных ИЖ при энантиораспознавании могут быть задействованы специфические ион-парные взаимодействия.

Имеются сообщения об использовании хиральных ИЖ в качестве одиночных хиральных селекторов [99, 100], однако работ, где их используют в сочетании с традиционными хиральными селекторами (чаще всего ЦД), намного больше. К сожалению, в хиральном разделении поиск закономерностей чрезвычайно сложен. Примеры энантиоразделения в двойных системах ИЖ – *циклодекстрин* приведены в таблице 2 с некоторыми комментариями, что может быть учтено при работе в данном направлении.

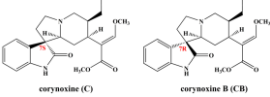
Таблица 2. Разделение энантиомеров при использовании двойных хиральных селекторов в составе фонового электролита (хиральные ИЖ и ЦД).

Природа ЦД	Используемые хиральные ИЖ	Определяемые энантиомеры	Комментарий	ссылка
α-ЦД	Тетраметиламмоний-L-аргинин ([TMA][L-Arg]), тетраэтиламмоний-L-аргинин ([TEA][L-Arg]), тетрабутиламмоний-L-аргинин ([TBA][L-Arg]), Тетраметиламмоний-L-пролин ([TMA][L-Pro]), Тетраметиламмоний -L-глутаминовая кислота ([TMA][L-Glu], Тетраметиламмоний гидроксид ([TMA][OH])	амлодипин, циталопрам, нефопам; сулконазол	В оптимизированных условиях провели энантиоразделение пяти модельных препаратов с разным структурным типом.	[106]
β-ЦД	[TMA][L-Arg], [TEA][L-Arg] и [TBA][L-Arg]	Дансильные производные аминокислот	Обнаружен синергетический эффект хиральной ИЖ и ЦД в режиме неводного капиллярного электрофореза. Участие ИЖ в энантиораспознавании подтверждено экспериментами, где ИЖ использовали в качестве единственного хирального селектора.	[107]

Продолжение таблицы 2

гидроксипропил-β-ЦД (ГП-β-ЦД)	[ТМА][L-Arg], тетраметиламмоний-L-гидроксипролин ([ТМА][L-Hyp]) и тетраметиламмоний-L-изолейцин ([ТМА][L-Ile])	Амлодипин, нефопам, дулоксетин, пропранолол,	Исследовано влияние конфигурации стереоцентра ИЖ на энантиоразделение на примере двух двойных систем ТМА-L-Arg/ГП-ЦД и ТМА-D-Arg/ГП-ЦД. Значения скорости ЭОП были одинаковы в обеих системах, но тип конфигурации стереоцентра в катионе влиял на результаты: заметного увеличения Rs энантиомеров лекарственного средства в системе ГП-ЦД/ТМА-D-Arg не наблюдалось, в то время как в системе ГП-ЦД/ТМА-L-Arg для всех лекарственных препаратов наблюдался положительный синергетический эффект.	[108]
	тетраметиламмоний- L-лизин ([ТМА][L-Lys]), тетраметиламмоний- L-лизин ([ТВА][L-Lys]) и L-глутаминовая кислота тетрабутиламмония ([ТВА][L-Glu]), [ТМА][L-Glu]	дулоксетин, верапамил, тербуталин, эконазол, сулконазол, метопролол, надолол	Синергетический эффект наблюдался в двойной хиральной системе ИЖ/ГП-β-ЦД только для пяти соединений (дулоксетин, верапамил, тербуталин, эконазол, сулконазол), для которых ранее удалось получить неполное разделение энантиомеров в системе с одним ЦД.	[104]
	[ТВА][L-Lys], [ТВА][L-Glu]	Эконазол и сулконазол	Первая аналитическая методика для определения энантиомеров сулконазола в фармацевтических препаратах (противогрибковая мазь). Для разделения энантиомеров использовалась двойная система [ТВА][L-Lys]/ГП-β-ЦД (Rs 3.4 и 2.4 для эконазола и сулконазола, соответственно), оценены аналитические характеристики разработанных методик, проведен анализ реальных объектов.	[109]

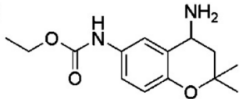
Продолжение таблицы 2

	1-этил-3-метилимидазолий-L-лактат	Офлоксацин, пропранолол, диоксопрометазин, изопреналин, хлорфенирамин, лиарозол, тропикамид, амлодипин, бромфенирамин, гоматропин	Подтвержден синергетический эффект между ЦД и ИЖ. Увеличение факторов разрешения в двойной хиральной системе для всех 10-ти аналитов ($R_s=1.43-5.45$).	[85]
	[ТВА][L-Glu]	Кориноксин и кориноксин В 	Разделение двух энантиомеров: кориноксина и кориноксина В в двойной хиральной системе ЦД/ИЖ. Дополнительно реализовано концентрирование (стэкинг с усилением поля и с водной пробкой) с факторами концентрирования 700-900.	[110]
	N,N,N-триметил-1-валинол-бис(трифторметансульфон)имид; N,N-диметил-1-пролинол-бис(трифторметансульфон)имид; N,N,N-триметил-1-фенилаланинол-бис(трифторметансульфон)имид	Нефопам, эконазол, сулконазол, кетоконазол и амлодипин	Показано влияние структуры ИЖ на эффективность энантиоразделения. Из трех изученных ИЖ наиболее выраженный синергетический эффект наблюдался в двойной системе ЦД с ИЖ на основе L-валина, предположительно, из-за меньшей конкуренции энантиомеров лекарственного средства за гидрофобную полость ЦД по сравнению с пятичленным кольцом ИЖ на основе пролина и бензольного кольца ИЖ на основе фенилаланина.	[111]

Продолжение таблицы 2

	<p>1-бутил-3-метилимидазолий(Т-4)-бис[(2<i>S</i>)-2-(гидрокси-кО)-3-метилбутаноато-кО]борат и 1-бутил-3-метилимидазолия (Т-4)-бис[(α<i>S</i>)-α-(гидрокси-кО)-4-метилбензоацетато-кО]борат</p>	<p>Пропранолол, амлодипин, нефопам, тропикамид и дулоксетин</p>	<p>Первое применение спироциклических хиральных ионных жидкостей в качестве второго хирального селектора для разделения энантиомеров. Синергетический эффект в системе ЦД/ИЖ позволил значительно улучшить энантиоразделение аналитов по сравнению с обычными системами разделения только с ЦД.</p>	<p>[112]</p>
<p>γ-циклодекстрин</p>	<p>(<i>R</i>)-<i>N,N,N</i>-триметил-2-аминобутанол-бис(трифторметансульфон)имидат (EtCholNTf₂)</p>	<p>Гомоцистеин</p>	<p>Подтвержден синергетический эффект в двойной хиральной системе ИЖ/ЦД путем замены ИЖ на LiNTf₂, где наблюдались более низкие значения факторов разрешения по сравнению с EtCholNTf₂.</p> <p>Зафиксировано изменение порядка миграции энантиомеров: при использовании EtCholNTf₂ или γ-ЦД в качестве единственного хирального селектора, <i>D</i>-энантиомер мигрировал первым, а в двойной системе из этих двух хиральных селекторов наблюдалась инверсия порядка миграции.</p> <p>Эксперименты ЯМР показали наличие межмолекулярных взаимодействий между внутренними атомами водорода γ-ЦД и ароматической группой гомоцистеина, подтверждая образование комплекса включения с ЦД. Наблюдались и взаимодействия γ-ЦД с ИЖ, что указывает на комплексы включения EtCholNTf₂ с полостью ЦД.</p>	<p>[113, 114]</p>

Продолжение таблицы 2

	<p>бис(трифторметан)сульфонимид метилового эфира L-карнитина; L-(+) лактат метилового эфира карнитина</p>	<p>Цистеин и гомоцистеин, дериватизированные 9-флуоренилметоксикарбониллом</p>	<p>Изучены две новые хиральные ионные жидкости на основе небелковой аминокислоты карнитина в качестве катиона, проведена оценка их специфичности по отношению к цистеину и гомоцистеину при использовании одного хирального селектора и в составе двойных хиральных систем с ЦД.</p>	<p>[115-117]</p>
<p>Монозамещенные сульфатированные ЦД</p>	<p>(R)-N,N,N-триметил-2-аминобутанол-бис(трифторметансульфон)имидат (EtChoINTf₂)</p>	<p> R/S-4-амино-2,2-диметил-6-этоксикарбониламино-3,4-дигидро-2H-1-бензопиран</p>	<p>Значительный рост факторов разрешения при определении энантиомерной чистоты производных бензопирана, что оказалось принципиальным при определении энантиомерной примеси. В присутствии очень высокой концентрации R-энантиомера (1 мг/мл) стало возможным количественное определение очень низких концентраций S-энантиомера с введением хиральной ИЖ в фоновый электролит; фактор разрешения 22.6.</p>	<p>[118]</p>

Продолжение таблицы 2

<p>глюкозил-β-ЦД (Glu-β-ЦД)</p>	<p>трифторацетат-L-гидроксипролин, нитрат-L-гидроксипролин, трифторацетат-L-треонин</p>	<p>Амлодипин, нефопам, эконазол</p>	<p>Показано неоднозначное влияние органического растворителя в составе фонового электролита (метанол, этанол и изопропиловый спирт) на разрешение энантимеров.</p> <p>В системе L-HPro⁺TFA⁻/Glu-β-ЦД значение фактора разрешения энантимеров неофопама и эконазола увеличивалось при введении органических растворителях (до 30 % объемн.) за счет изменения вязкости раствора и далее снижалось при более высоком содержании (40 % объемн.), что вызвано уширением пика из-за продолжительного времени анализа.</p> <p>Для амллодипина наблюдалось значительное снижение фактора разрешения энантимеров при добавлении в ФЭ органических растворителей. Данный факт авторы объясняют менее эффективным процессом комплексообразования из-за различия физико-химических свойств ЦД и амлодипина: последний – гидрофобный, в то время как Glu-β-ЦД лучше растворим в воде.</p>	<p>[119]</p>
<p>сульфатированный-ЦД</p>	<p>[TBA][L-Asp], [TMA][L-Asp], [TBA][L-Arg]), [TMA][L-Arg], тетрабутиламмоний-L-изолейцин ([TBA][L-Ile]), ([TMA][L-Ile])</p>	<p>ивабрадин</p>	<p>Увеличение концентрации ИЖ в ФЭ приводит к значительному росту факторов энантиоселективности, но при этом время анализа также увеличивалось.</p>	<p>[120]</p>

Синергетический эффект выявлен и в двойной хиральной системе *хиральная ИЖ/антибиотик*. Последний, наряду с ЦД, часто вводят в состав фонового электролита в качестве хирального селектора из-за большого количества в его молекуле стереоцентров [121]. Так, авторы [122] показали, что в таких двойных системах наблюдалось улучшенное разделение энантиомеров нефопама по сравнению с использованием только одного хирального селектора (кларитромицина или производного ЦД), где разделения энантиомеров не наблюдалось (рисунок 16).

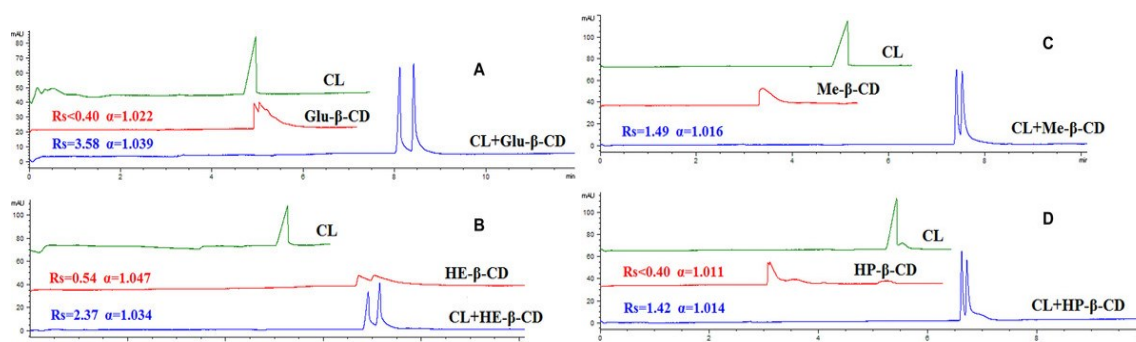


Рисунок 16. Электрофореграммы нефопама в четырех двойных хиральных системах и одиночных системах с использованием производных ЦД [122].

Условия: (А) 50 мМ кларитромицина, 40 мМ Glu- β -ЦД, 25 мМ боратный буферный раствор (ББР) доведенный до pH 5.5 (В) 50 мМ кларитромицина, 20 мМ гидроксиэтил - β -ЦД, 25 мМ ББР доведенный до pH 4.5 (С) 40 мМ кларитромицина, 20 мМ Me- β -ЦД, ББР доведенный до pH 6.5 (D) 50 мМ кларитромицина, 15 мМ ГП- β -ЦД, 25 мМ ББР доведенный pH 7.0; капилляр 33 см (эффективная длина 24,5 см) \times внутр. диаметр 50 мкм; ФЭ:12.5 мМ боратный буферный раствор с метанолом (50% объемн./объемн.); 20 кВ; 25 °С.

Известно, что классические системы на основе ЦД не всегда позволяют решать задачи в области хирального анализа. Требуется поиск новых подходов. Показано, что модификация структуры ЦД, а также введение в состав ФЭ различных модификаторов другой природы (ГЭР, НЧ, МИП и т.д.) может влиять на процессы энантиораспознавания и значительно расширить возможности хирального разделения методом КЭ. Одно из интересных сочетаний – *ЦД и имидазолиевая ИЖ*. Обнаружен синергетический эффект совместного введения этих модификаторов в состав фонового электролита при хиральном разделении. Следующим этапом после оптимизации условий разделения является поиск подходов к онлайн концентрированию, что способствует снижению пределов обнаружения до достаточных для определения аналитов в биологических жидкостях.

1.3 Онлайн концентрирование биологически активных соединений в капиллярном электрофорезе

Одним из достоинств метода КЭ является возможность реализации *внутрикапиллярного*, или *онлайн* концентрирования, не останавливая самого процесса электрофоретического анализа. В основе онлайн концентрирования – ввод большого объема пробы с последующим фокусированием аналита в более узкую зону за счет различия электрофоретических подвижностей исследуемых соединений в зоне пробы и фонового электролита, что, в свою очередь, может определяться различием в проводимости их растворов [7].

Количественной характеристикой является фактор концентрирования (SEF_h – *Sensitivity Enhancement Factor*), который определяется как:

$$SEF_h = \frac{h_1}{h_2} \cdot r, \quad (1)$$

где h_1 – высота пика соответствующего аналита при концентрировании;

h_2 – высота пика при стандартных условиях (ввод 2с 30 мбар или 2 с 10 кВ);

r – коэффициент разбавления.

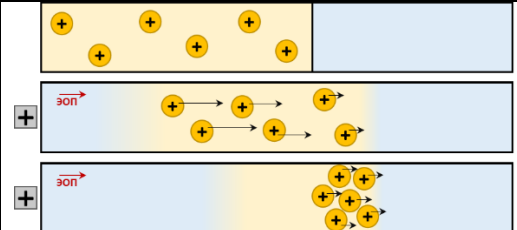
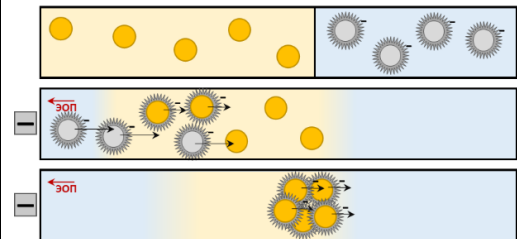
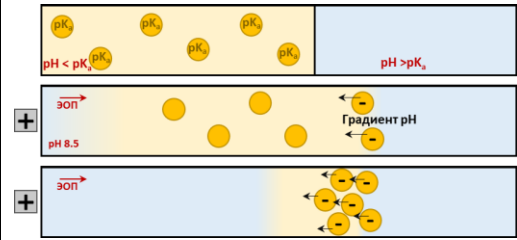
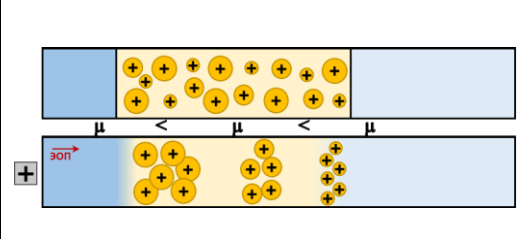
Разработка различных вариантов онлайн концентрирования стала решением одного из главных ограничений метода КЭ – низкой концентрационной УФ-чувствительности. В настоящее время имеется большое разнообразие подходов, начиная от простейших методов, где концентрирование происходит за счет разной проводимости матрицы пробы и ФЭ (*стэкинг с усилением поля*), до гибридных методов с совместным применением двух и более вариантов. Движущей силой развития онлайн концентрирования в КЭ явилось не только требование высокой чувствительности для практического применения, но и сложность состава матрицы образца.

В начале данного раздела будут кратко рассмотрены варианты онлайн концентрирования, которые условно можно отнести к базовым. Их сочетания (*гибридные методы концентрирования*) обсуждаются во втором разделе. Отдельно рассмотрено концентрирование энантиомеров и использование для этой цели новых подходов, поскольку данные вопросы в литературе представлены недостаточно.

1.3.1 Механизмы онлайн концентрирования

Среди часто используемых вариантов онлайн концентрирования, которые можно назвать фундаментальными, – *стэкинг с усилением поля*, *электростэкинг*, *сви́пинг*, *изотахофорез*. Этим методам посвящено немало публикаций, в которых описаны принципы и механизмы подробно [123]. Их обобщение представлено в таблице 3 с краткими поясняющими схемами и ключевыми особенностями.





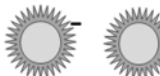


Таблица 3. Схемы онлайн концентрирования.

Название	Схема	Условия	Ключевые особенности концентрирования
Стэкинг с усилением поля (<i>Field amplified sample stacking, FASS</i>)		Проводимость матрицы пробы меньше, чем фонового электролита	Определяемые ионы в матрице пробы при наложении электрического поля будут иметь большую электрофоретическую подвижность; замедляясь на границе с фоновым электролитом, аналиты концентрируются.
Сви́пинг (<i>sweeping</i>)		Проводимость матрицы пробы и ФЭ сопоставима; в составе ФЭ - мицеллы, образованные поверхностно-активными веществами (ПАВ)	Проникая в матрицу пробы, заряженные мицеллы взаимодействуют с незаряженными аналитами, образуя ассоциаты, миграция которых медленнее, чем самих аналитов, что способствует концентрированию.
Динамический рН-скачок (<i>dynamic pH-junction</i>)		Изменение электрофоретической подвижности аналита при различных рН, определяемых значениями pK_a функциональных групп. «Скачок» рН формируется при введении образца в матрицу с другим по отношению к ФЭ значением рН.	Для слабых кислот, оснований и амфолитов. Основан на изменении ионной формы аналита в зоне градиента рН на границе раздела ФЭ-проба при наложении напряжения к концам капилляра. Незаряженный ионогенный аналит, мигрирующий вместе с ЭОП, попадает в зону градиента, меняет аналитическую форму на ионную и движется в противоположную ЭОП сторону, что способствует концентрированию. Подвижность ЭОП больше, и аналиты мигрируют к детектору.
Изо́тахофорез (<i>isotahopheresis</i>)		Проба вводится между ведущим и терминальным электролитами; компоненты пробы имеют большую подвижность, чем ионы терминального электролита, но меньшую, чем ведущего.	При наложении напряжения определяемые аналиты разделяются на отдельные зоны в порядке уменьшения их электрофоретических подвижностей; при достижении равновесного состояния все ионы мигрируют с постоянной скоростью, что обеспечивает не только концентрирование, но и разделение аналитов.

Продолжение таблицы 3

<p>Свипинг незаряженных аналитов с разрушением мицелл (<i>Analyte focusing by micelle collapse</i> (AFMC))</p>		<p>В раствор пробы с высокой проводимостью вводят мицеллы. В качестве ФЭ используется буферный раствор с низкой проводимостью и не содержащий мицелл.</p>	<p>При наложении напряжения мицеллы переносят нейтральные аналиты в направлении детектора. На границе с ФЭ концентрация ПАВ становится ниже значения критической концентрации мицеллообразования (ККМ). В результате мицеллы разрушаются и аналиты, высвобождаясь, концентрируются.</p>
<p>Свипинг заряженных аналитов с разрушением мицелл (<i>Micelle to solvent stacking</i> (MSS))</p>		<p>Мицеллы в растворе анализируемой пробы должны иметь противоположный заряд относительно определяемых аналитов. Органический растворитель вводят в ФЭ или в виде пробки между образцом и ФЭ.</p>	<p>Ионогенные заряженные аналиты переносятся мицеллами к зоне с органическим растворителем; на границе раздела происходит разрушение или уменьшение концентрации мицелл в растворе. Свободные аналиты электрофоретически мигрируют обратно в зону мицелл, вновь взаимодействуя с ними. Процесс повторяется до тех пор, пока все мицеллы в пробе не разрушатся. Это, в свою очередь, приводит к концентрированию</p>

Обозначения:

-  Проба
-  Фоновый электролит
-  Органический растворитель (MeOH/EtOH/ACN и т.д.)
-  Заряженные и незаряженные аналиты
-  Отрицательно и положительно заряженные мицеллы
-  Отдельные молекулы ПАВ
-  Направление миграции

Один из наиболее часто используемых методов внутрикапиллярного концентрирования в КЭ – свипинг, где мицеллы играют роль псевдостационарной фазы и участвуют не только в концентрировании, но и вносят вклад в увеличение селективности разделения. Наряду с классическим свипингом, где матрица образца имеет такую же проводимость как и ФЭ, описаны варианты, в которых матрица имеет проводимость больше или меньше по сравнению с фоновым электролитом [124], что в некоторых случаях приводит и к более высокой эффективности концентрирования. Стоит отметить, что концентрация мицелл в зоне пробы во время детектирования может влиять на сигнал, снижая чувствительность.

Одним из решений такой ситуации является разрушение мицелл прежде, чем проба достигнет окна детектирования. Такие подходы, которые в настоящее время успешно применяются для онлайн концентрирования, имеют более сложный механизм и называются *Analyte focusing by micelle collapse (AFMC)* и *Micelle to solvent stacking (MSS)* (таблица 3). Оба метода включают использование мицелл, однако в отличие от процедуры классического свипинга мицеллы вводятся только в раствор пробы с последующим разрушением. При этом проводимость ФЭ должна быть меньше, чем у матрицы пробы. Главное отличие этих двух методов в природе концентрируемых аналитов и причине разрушения мицелл. AFMC разработан для нейтральных аналитов, переносимых мицеллами к границе с ФЭ, где происходит разрушение мицелл и высвобождение аналитов за счет снижения концентрации ПАВ до значений ниже ККМ [125, 126]. В свою очередь, вариант MSS применяется для заряженных аналитов, при этом заряд мицелл должен быть противоположен заряду аналитов. В этом случае разрушение мицелл происходит из-за наличия органического растворителя в составе ФЭ или в виде пробки, вводимой между анализируемым образцом и ФЭ; по мере разрушения мицелл эффективная электрофоретическая подвижность заряженных аналитов сначала уменьшается, а затем меняется в обратном направлении [127]. В качестве псевдостационарной фазы широко используют циклодекстрины, и причиной разрушения мицелл может стать взаимодействие с ЦД (т.н. *micelle to cyclodextrin stacking (MCDS)*) [128, 129]. Последовательно в капилляр вводятся проба, содержащая мицеллы, а затем пробка фонового электролита с незаряженным ЦД. Под действием напряжения аналиты, ассоциированные с заряженными мицеллами, мигрируют к границе с ЦД, где формируются комплексы включения макроцикла с мицеллами. Уменьшение количества свободного поверхностно-активного вещества становится недостаточным для образования мицелл, что приводит к высвобождению аналитов на границе раздела. Далее, сконцентрированные аналиты мигрируют за счет собственных электрофоретических подвижностей.

При выборе методов концентрирования под конкретную задачу надо учитывать не только природу аналитов, но и то, в каких реальных объектах запланирована апробация найденных закономерностей, а именно: природа матрицы анализируемой пробы, которую условно можно разделить на низко- и высокопроводящую относительно буферных электролитов, используемых в методе КЭ. Если с низкопроводящими матрицами в большинстве случаев проблем не возникает, то для высокопроводящих – имеются ограничения в применении методов онлайн концентрирования. Иногда проводимость матрицы можно снизить путем разбавления образца, но если концентрация определяемых аналитов изначально низкая, как в случае биологических жидкостей, то разбавления следует избегать. Накопленный опыт позволил обобщить применимость основных методов концентрирования, учитывая природу аналитов и матрицы пробы (таблица 4) [130].

Таблица 4. Основные методы концентрирования и их совместимость с высокопроводящими солевыми матрицами [130].

Режим онлайн концентрирования	Заряд аналита	Совместимость с высокопроводящей солевой матрицей	Достижимые SEF
Стэкинг с усилением поля	⊕ ⊖	несовместим	10^1-10^2
Стэкинг с большим объемом вводимой пробы	⊕ ⊖	несовместим	10^2-10^3
Электростэкинг	⊕ ⊖	несовместим	10^2-10^3
Динамический рН скачок\рН контролируемый стэкинг	⊕ ⊖	совместим	10^1-10^3
Свиписг	⊕ ⊖ ○	ограниченно совместим	10^1-10^5
Изотахофорез	⊕ ⊖	совместим	10^1-10^2
AFMC	○	ограниченно совместим	10^1-10^2
MSS	⊕ ⊖	ограниченно совместим	10^1-10^2

1.3.2 Сочетание различных методов онлайн концентрирования (гибридные методы)

У каждого из вышеописанных подходов внутрикапиллярного концентрирования имеются ограничения, которые можно нивелировать сочетанием двух или более режимов концентрирования. Подобные техники могут действовать синергетически [131, 132] или последовательно, когда соответствующий механизм разделения запускается после завершения предыдущего [133-136]. Помимо улучшения чувствительности такое объединение позволяет концентрировать и разделять аналиты с различными физическими и химическими свойствами в течение одного анализа.

К настоящему времени уже описаны различные гибридные варианты онлайн концентрирования, тем не менее есть общая тенденция, а именно: совмещение двух разных по механизму подходов. В большинстве случаев это – варианты, основанные на распределении и комплексообразовании (участие мицелл: свипинг или варианты AFMC и MSS) в сочетании с методами, где концентрирование происходит за счет изменения электропроводности растворов пробы и ФЭ (FASS, FASI, pH-динамический скачок и т.д.).

Некоторые из таких вариантов приобрели собственное название, например, совмещение длительного электрокинетического ввода и свипинга получило название *катион/анион селективный стэкинг – свипинг* (*cation/anion-selective exhaustive injection – sweeping (CSEI-sweeping, ASEI-sweeping)*). Метод принято считать первой комбинацией методов электрофоретического онлайн концентрирования. Он предложен J. P. Quirino и S. Terabe в 2000 г. для концентрирования катионов (для анионов требуется выбор соответствующего ПАВ), обеспечивая увеличения чувствительности почти в миллион раз [133]. Наряду с требованиями каждого из них, а именно, электрокинетический ввод из матрицы низкой проводимости (*электростэкинг*) и отсутствие мицелл в матрице пробы (*свипинг*), для такого гибридного варианта необходимо соблюдение следующего условия: аналиты заряжены и мигрируют навстречу ЭОП. После электрокинетического ввода на втором этапе концентрирования полярность напряжения меняется, аналиты мигрируют в обратную сторону, концентрируясь мигрирующими по направлению к ним мицеллами из фонового электролита (*режим свипинга*). Такой подход позволяет сконцентрировать не просто заряженные биологически активные аналиты [137, 138], но и индивидуальные энантиомеры [139, 140]. Концентрированию последних ниже посвящен специальный раздел.

Еще один вариант внутрикапиллярного концентрирования, получивший название – *электрокинетическое суперконцентрирование*. Он представляет собой комбинацию электростэкинга и изотахофореза. Его суть в электрокинетическом вводе пробы между ведущим

и терминальным электролитами с последующей реализацией изотахофореза при наложении напряжения. Хотя впервые метод описан в 2003 г. [134] для концентрирования катионов редкоземельных металлов, впоследствии он получил широкое распространение при концентрировании биологически активных соединений: алкалоидов [141], катионов [142], нуклеозидов [143], нейротрансмиттеров [144].

Сочетание *динамический рН-скачок – свипинг* не только обеспечило совместное разделение гидрофобных и гидрофильных соединений [132, 145-147], но и оказалось-полезным при определении лекарственных препаратов и их метаболитов. Поскольку большое количество метаболитов является слабоионным, градиент рН буферного электролита вносит вклад как в селективность разделения, так и в концентрирование. Этой проблеме посвящен специальный обзор [148].

Одно из необычных сочетаний – *свипинг с последующим разрушением мицелл (свипинг - MSS)* – обеспечивает извлечение аналитов из матрицы, их концентрирование, а затем уже извлечение из мицелл [135, 149, 150]. Главная идея такого подхода состоит в том, что перед пробой вводится мицеллярная пробка, при этом сохраняются условия MSS: аналиты и мицеллы имеют противоположный заряд, а в составе фонового электролита есть органический растворитель. При приложении напряжения мицеллы проникают в зону пробы и концентрируют противоположно заряженные аналиты (*механизм свипинга*), наблюдаемая электрофоретическая подвижность которых меняется на противоположную, и они переносятся мицеллами к границе с ФЭ, содержащим органический растворитель. Достигая этой границы, мицеллы разрушаются из-за присутствия органического растворителя, снова концентрируясь (*механизм MSS*). Обсуждаемые гибридные методы обобщены в таблице 5.

Таблица 5. Схемы гибридных методов онлайн концентрирования (обозн. см. табл. 4).

Название	Схема	Условия	Ключевые особенности концентрирования
катион/анион селективный стэкинг – свипинг <i>(cation/anion-selective exhaustive injection – sweeping (CSEI-sweeping, ASEI-sweeping))</i>		Электрокинетический ввод из матрицы низкой проводимости (<i>электростэкинг</i>) и отсутствие мицелл в матрице пробы (<i>свипинг</i> , <i>аналиты заряжены и мигрируют против ЭОП</i>)	После электрокинетического ввода полярность напряжения меняется, аналиты мигрируют в обратную сторону, концентрируясь мигрирующими им навстречу мицеллами из фонового электролита
электрокинетическое суперконцентрирование		Сохраняются условия электростэкинга и изотахофореза	Электрокинетический ввод пробы между ведущим и терминальным электролитами с последующей реализацией изотахофореза при наложении напряжения.
динамический рН-скачок – свипинг		Сохраняются условия динамического рН скачка и свипинга, в одном аналитическом цикле.	Капилляр заполнен ФЭ с мицеллами, далее – проба. При наложении напряжения происходит локальное изменение рН и концентрирование в режиме динамического рН скачка. Одновременно мицеллы ДДСН, мигрируют из ФЭ и концентрируют аналиты в зоне образца (<i>свипинг</i>).
свипинг с последующим разрушением мицелл (свипинг - MSS)		Сохраняются условия MSS: аналиты и мицеллы имеют противоположный заряд, а в состав ФЭ вводится органический растворитель	Перед пробой вводится мицеллярная пробка. При приложении напряжения мицеллы проникают в зону пробы и концентрируют аналиты (<i>механизм свипинга</i>). Достигая границы с ФЭ, содержащим органический растворитель, мицеллы разрушаются и высвобождают сконцентрированные аналиты.

Сочетание вариантов онлайн концентрирования оказалось полезным для режима неводного капиллярного электрофореза (НВКЭ), где используемые органические растворители имеют низкую проводимость, затрудняя реализацию стэкинга. Например, при определении тамоксифена и его метаболитов для концентрирования использовали сочетание FESI-MSS [151]. Однако электрокинетически введенные аналиты концентрировались за счет взаимодействия с мицеллами, а не из-за разницы в проводимости между образцом и ФЭ. Это позволяло использовать более длительный ввод пробы, а факторы концентрирования тамоксифена и его метаболитов составили 214–625. Подход был успешно применен для определения концентраций лекарственного препарата и его метаболитов в плазме крови человека. Подходы, используемые для онлайн концентрирования в НВКЭ, подробно описаны в обзоре [152].

К настоящему времени имеются публикации о комбинировании даже трех техник онлайн концентрирования в КЭ, например FASI – свипинг – MSS [153, 154], динамический рН скачок – свипинг – LASS [155], FASI – свипинг – AFMC [156, 157]. Удалось сконцентрировать аналиты в несколько тысяч раз, что может быть успешно использовано для чувствительного определения следовых количеств аналитов в сложных биологических образцах (рисунок 17).

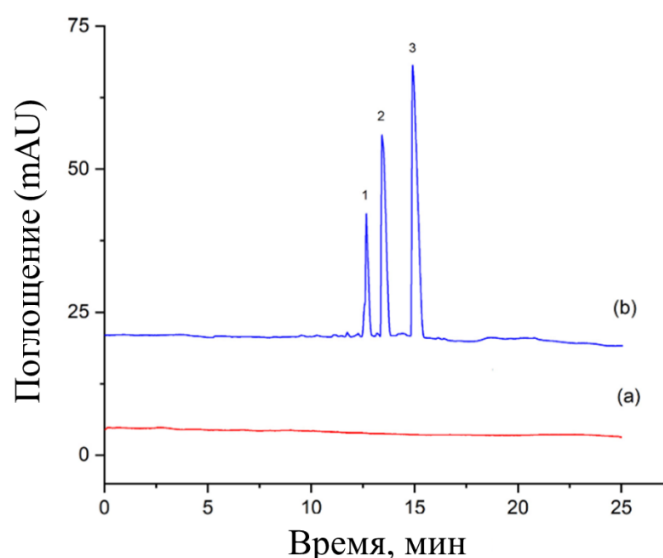


Рисунок 17. а) стандартный ввод пробы и б) трехступенчатое онлайн концентрирование (FASI-свипинг-MSS) реального образца (экскременты)

Условия: 50 мМ фосфатный буферный раствор (рН 2,5). Ввод пробы 3с 50 мбар (а) и 120 с 10 кВ. Напряжение +20 кВ.

Аналиты: 1- винбластина сульфат, 2- катарантин сульфат, 3-виндолинсульфат [154].

Такие варианты обеспечивают высокие факторы концентрирования, однако требуется тщательный подбор условий [15, 158], поскольку каждый из параметров может сильно повлиять на конечный результат: объем введенной мицеллярной пробки, объем ввода пробы, тип и

концентрация мицелл, количество органического растворителя. Появляются работы, где для оптимизации условий концентрирования применяют дизайн эксперимента и хемометрическую обработку [156].

1.3.3 Концентрирование энантиомеров

Внутрикапиллярное концентрирование индивидуальных энантиомеров – одна из малоизученных и непростых задач в области КЭ в виду дополнительных взаимодействий с хиральным селектором в процессе электрофоретического разделения. При этом общие закономерности онлайн концентрирования сохраняются: уменьшение разрешения с увеличением времени ввода пробы, что в случае разделения энантиомеров может быть особенно критично [159, 160].

Анализ имеющихся публикаций показал, что для энантиомеров применяются в основном гибридные методы концентрирования, что позволяет сохранить селективность разделения; доминирует свипинг с электрокинетическим вводом (FESI-свипинг, CSEI-свипинг) (таблица 6). Сообщается о концентрировании катионов индивидуальных энантиомеров в 10 000 раз с сохранением достигнутых факторов энантиселективности [159, 161].

Так, упоминаемый гибридный вариант (*CSEI – свипинг*) модифицируют, а именно, в качестве хирального селектора в мицеллярный буферный раствор, содержащий додецилсульфат натрия, добавляют анионный ЦД [159] или же полностью заменяют мицеллы на анионное производное ЦД [161], выполняющее функции мицеллы и хирального селектора, т.н. *CSEI – свипинг – ЦД* модифицированный вариант онлайн концентрирования.

Таблица 6. Методы онлайн концентрирования энантиомеров в реальных объектах

Аналиты (рацематы)	Матрица образца	Метод онлайн концентрирования	SEF	ссылка
Фенирамин	Плазма крыс	LVSS-свилинг; CSEI-свилинг	160 4000	[162]
Пропроналол	Слюна, моча, плазма	FESI-свилинг	21 000	[160]
9 пар дериватизированных аминокислот	Образцы пива	Стэкинг на основе поли(этиленоксида)	110-220	[163]
Хлорфенирамин	Плазма крыс	CSEI-свилинг	190	[139]
Фенопрофен	Речная вода	LVSS–ASEI	1000	[164]
Флуоксетин, Норфлуоксетин	Моча, плазма	FASS	20	[165]
Гликопирролаты	Плазма крыс	CSEI-свилинг	495	[140]
Миртазапин	Плазма	FASS	50-60	[166]
Алпренолол	Модельная смесь	FESI-свилинг	100	[167]
Метамфетамин	Волосы	CSEI-свилинг модифицированный ЦД	10000	[159]
Циталопрам	Лекарственная форма, плазма крыс	LVSS-свилинг модифицированный ЦД CSEI-свилинг модифицированный ЦД	663 2163	[161]
Метилон, мефедрон, 4-метилэфедрин, метилендиоксипировалерон;	Моча	Электрокинетическое суперконцентрирование	940- 1310	[142]

1.3.4 Использование модификаторов при онлайн концентрировании

Модификаторы при онлайн концентрировании востребованы в разных аспектах:

- Формирование динамических и ковалентно пришитых покрытий позволяет контролировать скорость и направление ЭОПа, что принципиально для некоторых вариантов концентрирования, например, MSS (аналиты должны мигрировать в противоположном от ЭОПа направлении). Кроме того, покрытия уменьшают адсорбцию аналитов на стенках капилляра, способствуя увеличению чувствительности [153, 164, 168, 169].

- Традиционно используемые при онлайн концентрировании ПАВ (ДДСН и цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ)) заменяют на модификаторы, способные также выполнить роль мицелл и сконцентрировать аналиты: ионные жидкости в концентрации выше ККМ [59, 127, 153, 170, 171], гемини с образованием визикул [172], заряженные производные ЦД [161]. Выбор того или иного варианта определяется возможным дополнительным вкладом в селективность разделения.

- Использование полимеров для увеличения вязкости ФЭ [145, 173, 174]. Аналиты в растворе образца быстро мигрируют в зоне матрицы пробы и замедляются, достигая границы с ФЭ из-за высокой вязкости последнего; скорость определяемых молекул снижается, происходит концентрирование, аналогичное стэкингу с усилением поля.

Таким образом, метод капиллярного электрофореза является востребованным и перспективным при решении важнейших медико-биологических задач. Его достоинствами являются наличие дополнительной движущей силы за счет наложения напряжения; высокая эффективность и экспрессность, менее жесткие требования к определяемым анализам и используемым растворам. Возможность модификации электрофоретической системы позволяет в одном аналитическом цикле разделять гидрофильные и гидрофобные биологически активные соединения, включая энантимеры. В качестве модификаторов успешно зарекомендовали себя циклодекстрины и их производные. При этом обнаружен ряд ограничений традиционно используемых систем на основе ЦД. Требуется поиск новых подходов к их модификации, например, использование для этой цели ионных жидкостей, что позволит существенно расширить диапазон определяемых соединений в КЭ, включая хиральное разделение, и способствовать увеличению факторов разрешения энантимеров за счет синергетического эффекта. Кроме того, подобного типа полифункциональные системы перспективны при регулировании селективности разделения аналитов и в процессах внутрикапиллярного концентрирования, способствуя снижению пределов обнаружения

определяемых соединений. Имеются единичные публикации, касающиеся введения в молекулу ЦД имидазольного катиона, однако, по нашему мнению, именно такие структуры могут обеспечить дополнительные эффективные взаимодействия с аналитами, расширив аналитические возможности электрофоретического метода и в хиральном разделении. Недостаточно исследован вопрос внутрикапиллярного электрофоретического концентрирования индивидуальных энантиомеров, что является важной и нетривиальной задачей.

Все эти вопросы решаются в рамках данной исследовательской работы.

Глава II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

II.1 Оборудование

Электрофоретическое определение проводили с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель-105М» фирмы «Люмэкс» (Россия) со спектрофотометрическим детектором и кварцевых капилляров с внешним полиимидным покрытием со следующими характеристиками: общая длина капилляра – 60 см, эффективная длина капилляра – 50 см; внешний диаметр – 360 мкм, внутренний диаметр – 50 мкм.

Подготовку образцов для анализа проводили при использовании

средств измерения: аналитических весов OHAUS Pioneer (PA214C, дискретность 0.0001 г) рН-метра HI 2210 (Германия) (дискретность рН 0,01); автоматических дозаторов 20-200 мкл (дискретность 1 мкл); 100-1000 мкл (дискретность 5 мкл) фирмы Satorius; и

вспомогательного оборудования: центрифуги ELMi CM-50MP (Латвия), УЗ-ванны Branson Ultrasonic Bath 2510 (США) и мульти-вортекса Multi V-32 BioSan (Латвия), (США); сушильного лабораторного шкафа “LOIP LF” (Санкт-Петербург).

Эксперименты для независимой оценки предложенных электрофоретических подходов осуществляли методом ОФ ВЭЖХ на жидкостном хроматографе «LC-40 Nexera» фирмы «Shimadzu» (Япония), колонка Agilent Zorbax SB-C8 2.1 мм × 150 мм 3.5-микрон.

Оценку наличия и толщины ковалентного покрытия на внутренней стенке кварцевого капилляра проводили по снимкам, полученным методом СЭМ на сканирующем электронном микроскопе с полевым эмиссионным катодом Carl Zeiss Merlin.

Обработку результатов электрофоретических анализов проводили с помощью программного обеспечения «Эльфран» для Windows. Пределы обнаружения рассчитывались как отношение сигнал/шум (S/N)×3. Значения шума получали в программе «Эльфран», автоматически выделяя участок без сигнала аналитов. Предел количественного определения рассчитывали как отношение сигнал/шум (S/N)×10. Оценка прецизионности проводилась путем расчета среднеквадратичного отклонения результатов трех параллельных измерений времен миграции аналитов. Статистическую обработку проводили с использованием ПО Excel. Параметры валидации предложенных подходов при определении биологически активных соединений по предложенным методикам в реальных объектах и оценка прецизионности описаны в II.9

II.2 Реактивы

Стандарты: (-)-адреналин (A, «Sigma»); L-(-)-норадреналин (NA, «Aldrich»); DL-норметанефрина гидрохлорид (NMN, «Sigma»); дофамина гидрохлорид (DA, «Sigma»), D,L-метанефрина гидрохлорид (MN, «Sigma»), серотонина гидрохлорид (5-НТ, «Sigma»), ванилилминдальная кислота (VMA, «Sigma»), гомованилиновая кислота (HVA, «Sigma»), 3,4-дигидроксibenзиламина гидробромид (3,4-DHBA, «Sigma»), 3-метокситирамина гидрохлорид (3-МТА, «Sigma»), гомогентизиновая кислота (HHA, «Sigma»), 5-гидроксииндолуксусная кислота (5-НИАА, «Sigma»), кортикостерон (B, Sigma-Aldrich), кортизон (E, Sigma-Aldrich), гидрокортизон (F, Sigma-Aldrich), 11-дезоксикортизол (S, LGC), 11-дезоксикортикостерон (Doc, Dr. Ehrentorfer), прогестерон (Pr, Sigma-Aldrich), S,R-кетопрофен («Sigma»); S-кетопрофен («Sigma»); S,R-кеторолак («Sigma»), S-кеторолак («Sigma»).

Синтез модификаторов и ковалентных покрытий: 1-бромбутан (99%, «ReagentPlus»), 1-бромоктан (99%, «ReagentPlus»), имидазол (> 99%, «Sigma-Aldrich»), (3-глицидоксипропил)триметоксисилан (GPTMS, «Sigma»), 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил, (DPPH) («Sigma»), ацетон (>99.8 %, «Merck»), диметилформамид (DMФА, >99.9 %, «J.T. Baker»), β-циклодекстрин (β-ЦД, >98%, «Sigma-Aldrich»), пара-толуолсульфонилхлорид («Sigma-Aldrich»), 1-метилимидазол («Sigma-Aldrich»), бензилтриэтиламмоний хлорид (ТЕВАС, Sigma-Aldrich), диметилсульфоксид (DMCO, ACS reagent, ≥99.9%), n-бутанол (suitable for HPLC, ≥99.7%), 2-пропанол (ACS reagent, ≥99.5%)

Приготовление рабочих растворов: ацетонитрил (ACN, Fluka, HPLC grade), метанол (Fluka, HPLC grade), трихлоруксусная кислота (ACS reagent, ≥99.0%), муравьиная кислота (Supelco, ≥98%), гидроксид натрия («ч.д.а.», «Химреактив»), соляная кислота («х.ч.», «Реахим»); дигидрофосфат натрия двухводный («х.ч.», «Реахим»); гидрофосфат натрия двухводный («х.ч.», «Реахим»); 1-додецил-3-метилимидазолий хлорид (C₁₂MImCl, Acros organics); 1-гексадецил-3-метилимидазолий хлорид (C₁₆MImCl, Acros organics); цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ, Acros organics); додецилсульфат натрия (ДДСН, ≥98.5%, «ReagentPlus»); (2-гидроксипропил)-β-циклодекстрин (ГП-β-ЦД, «Sigma-Aldrich»); этилендиаминтетраацетат диводороддинатрия дигидрат (Na₂EDTA, «Sigma»), сульфатированный β-циклодекстрин, 12-15 моль на моль β-ЦД (s-β-ЦД «Sigma»), α-циклодекстрин (α-ЦД, ≥98%, «Sigma-Aldrich»); карбонат натрия («ч.д.а.», «Химреактив»), ледяная уксусная кислота («Sigma-Aldrich»), оксид алюминия (Al₂O₃, >98%, «Sigma-Aldrich»), ванкомицин (European Pharmacopoeia Reference Standard), амикацин (European Pharmacopoeia Reference Standard), амоксициллин (European Pharmacopoeia Reference Standard), хлороформ (≥99.8%, «Sigma-Aldrich»), декстран (Mr ~40,000, «Sigma-Aldrich»), деионизованная вода.

II.3 Синтез модификаторов

Для подтверждения структур всех полученных соединений использовали метод ядерно-магнитного резонанса на ядрах ^1H и сравнение спектров с литературными данными.

II.3.1 Синтез 6*A*-*O*-*p*-толуолсульфонил- β -циклодекстрина

В трехгорлую колбу объемом 1 л помещали 0.42 М раствор гидроксида натрия (0.5 л), 14.29 г β -циклодекстрина, 6.67 г *n*-толуолсульфонилхлорида и перемешивали при температуре 0–5 °С в течение 2 ч. Далее добавляли еще одну порцию *n*-толуолсульфонилхлорида (10 г), продолжая перемешивать реакцию смесь при температуре 0 – 5 °С в течение 3 ч. Охлажденный раствор фильтровали через фильтр Шотта, к фильтрату добавляли 100 мл раствора 10%-ной соляной кислоты и оставляли на ночь в холодильнике при 0 °С. Выпавший продукт сушили под вакуумом и очищали двукратной перекристаллизацией из воды. Получали 6*A*-*O*-*p*-толуолсульфонил- β -циклодекстрин (**Ts- β -ЦД**) массой 4.20 г. Краткая схема представлена на рисунке 18. Структуру полученного соединения подтверждали методом ядерно-магнитного резонанса на ядрах ^1H , сравнивая полученный спектр с литературными данными [175].

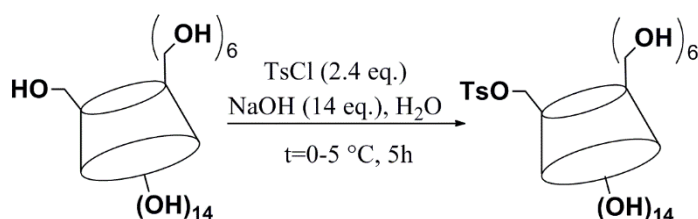


Рисунок 18. Схема синтеза 6*A*-*O*-*p*-толуолсульфонил- β -циклодекстрина.

II.3.2 Синтез тозилатов 3-алкил-1- β -циклодекстринимидазола

Выполнен синтез двух производных 3-метил-1- β -циклодекстринимидазолий тозилата (3-Me-1- β -CDImOTs) и 1-бутил-3- β -циклодекстринимидазолий тозилата (3-Bu-1- β -CDImOTs) из Ts- β -ЦД, синтез которого описан выше; схема представлена на рисунке 19.

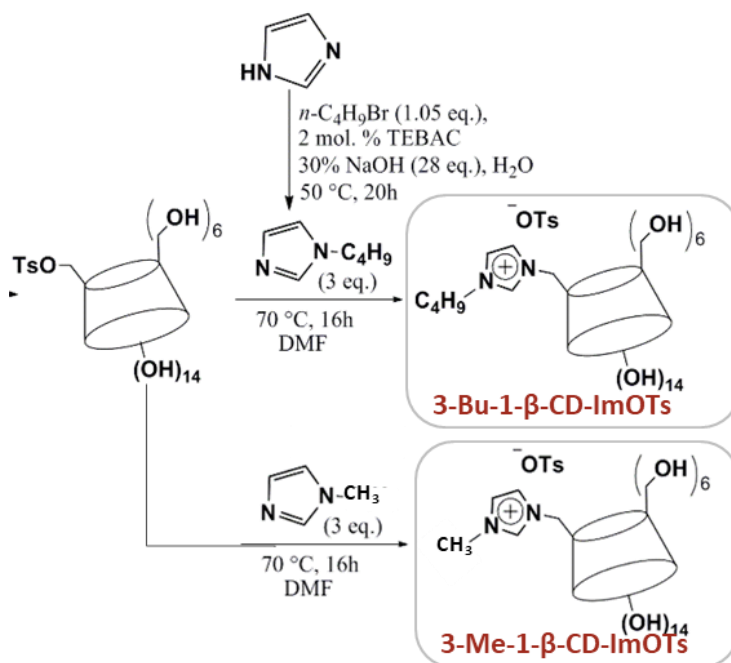


Рисунок 19. Схема синтеза модификаторов на основе имидазола и β-ЦД.

3-метил-1-β-циклодекстринимидазолий тозилат

1 г Ts-β-ЦД растворяли в 2 мл ДМФА, добавляли 0.19 г 1-метилимидазола и перемешивали при 90 °С в течение 48 ч, далее охлаждали до комнатной температуры, добавляли 7.8 мл ацетона и перемешивали в течение 30 мин. Осадок отфильтровывали, промывали ацетоном и сушили под вакуумом, получая белое твердое вещество.

3-бутил-1-β-циклодекстринимидазолий тозилат

Для получения бутильного производного предварительно синтезировали *N*-бутилимидазол [176] по следующему алгоритму: имидазол (0.107 моль) и хлорид триэтилбензиламмония (2 моль %) растворяли в 30%-ном водном растворе NaOH (20 мл) и интенсивно перемешивали. Затем по каплям добавляли 1-бромбутан (0.113 моль) при комнатной температуре и смесь перемешивали при 50 °С в течение 20 ч до появления двух фаз. Верхнюю органическую фазу экстрагировали, промывали и использовали на-следующей стадии. Продукт характеризовали показателем преломления при 22 °С, что хорошо согласовывалось с литературными данными.

Далее Ts-β-ЦД (1.4 г, 0.001 моль) и *N*-бутилимидазол (0.4 г, 0.003 моль) нагревали в ДМФА (2.6 мл) и перемешивали при 70 °С в течение 16 ч [177]. Осадок отфильтровывали, промывали ацетоном и сушили на роторном испарителе. Получали белое твердое вещество массой 1.3 г.

II.4 Приготовление рабочих растворов

II.4.1 Приготовление стандартных растворов определяемых соединений

Приготовление стандартных растворов выполняли путем растворения навесок 1-10 мг в объеме растворителя, необходимом для получения конечной концентрации 1 мг/мл (таблица 7). Все стандартные растворы хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до их использования (не более 2 месяцев). Необходимые рабочие растворы готовили разбавлением стандартных дистиллированной водой или соответствующим буферным раствором и хранили при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ не более 5 дней.

Таблица 7. Приготовление стандартных растворов

Стандарты	Используемый растворитель
Биогенные амины	0.1 М HCl
фенил- индол карбоновые кислоты	деионизованная вода
кортикостероидные гормоны	ацетонитрил
кетопрофен, кеторолак и ибупрофен	ацетонитрил/вода (10/90 объемн.)
белки	деионизованная вода

II.4.2 Приготовление буферных растворов

Электрофоретическое разделение проводили в фоновых электролитах в диапазоне pH 2.0 – 12; для их приготовления использовали исходные фосфатные буферные растворы (ФБР) с большей концентрацией и соответствующими значениями pH.

Исходные фосфатные буферные растворы (100 мМ) готовили путем растворения 4,45 г дигидрата динатрия гидрофосфата ($M=177,99\text{ г/моль}$) или 3,90 г дигидрата дигидрофосфата натрия ($M=156,01\text{ г/моль}$) в 20 мл деионизированной воды и обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин. Затем pH доводили до необходимого значения (2,0; 2,5; 3,2; 3,8; 4,5; 6,4; 8,0; 9,5) с помощью 0,5 М раствора NaOH или 1 М раствора HCl. После этого добавляли дистиллированную воду до полного объема раствора (25 мл). Все буферные растворы были отфильтрованы через 0,45-мкм мембранный фильтр Millipore шприцевого типа, обработаны ультразвуком и центрифугированы перед использованием. Фоновые электролиты получали разбавлением буферных растворов дистиллированной водой.

II.5 Ковалентные покрытия на основе имидазолиевого катиона

II.5.1 Синтез ковалентных покрытий

Алгоритм синтеза ковалентных покрытий на основе имидазолиевого катиона (рисунок 20):

- активация стенок капилляра 2 М раствором NaOH в течение 1ч при температуре 90 °С;
- промывка ацетоном и выдерживание при температуре 160 °С для удаления адсорбированной на поверхности капилляра воды;
- силилирование в течение 6 ч (указано суммарное время, затраченное на получение олигомерного слоя: капилляр последовательно промывали и заполняли четыре раза силилирующим агентом, оставляя на 2 ч, 1.5 ч, 1.5 ч и 1 ч. при 110 °С в термостате). Для приготовления раствора силилирующего агента 0.1 масс. % DPPH растворяли в смеси ДМФА:GPTMS (7:3, по объему).
- Функционализация для получения структур по типу имидазолиевых ионных жидкостей. Первый этап функционализации представлял собой реакцию нуклеофильного замещения имидазолом, растворенным в ДМФА (25 мг/мл) при 90 °С в течение 6 ч, а на втором этапе выполнялась постфункционализация с использованием 1-бромбутана, 1-бромоктана (10ч при 80 °С) или Ts-β-ЦД. Для последнего – проведена оптимизация условий. Варьировались параметры: время реакции (от 10 до 22 ч), температура (от 80 до 100 °С) и концентрация модифицирующего агента (от 25 до 750 г).

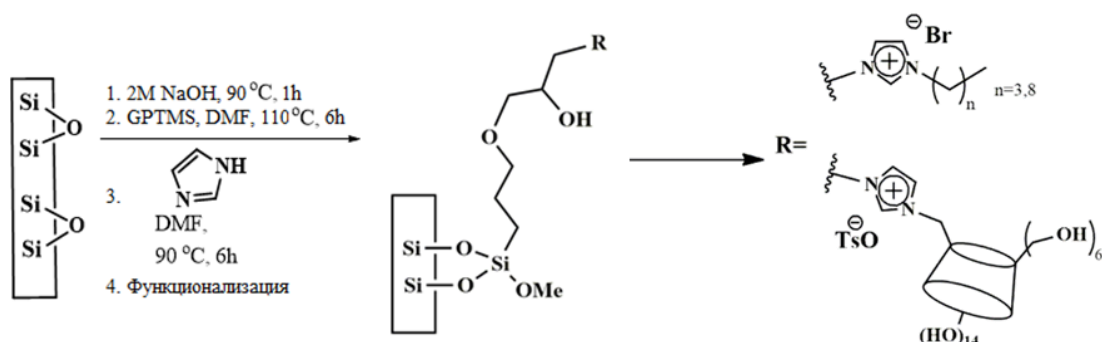


Рисунок 20. Схема синтеза ковалентных покрытий на основе имидазола с возможностью постфункционализации.

II.5.2 Характеристика покрытий физико-химическими методами анализа

Подтверждение наличия и структуры покрытия

Для оценки сформированного покрытия измеряли направление и скорость ЭОПа, а для покрытия на основе ЦД дополнительно рассчитывали селективность разделения модельной смеси стероидных гормонов. Анодный ЭОП указывал на наличие положительного заряда на поверхности капилляра, а разделение смеси стероидных гормонов – на наличие циклодекстрина на поверхности кварцевого капилляра и реализацию режима капиллярной электрохроматографии. Для подтверждения сформированного покрытия делали снимки внутренней поверхности капилляра с помощью метода СЭМ, где наличие шероховатостей свидетельствовало о формировании покрытия.

Оценка стабильности ковалентных покрытий

Стабильность ковалентных покрытий *от анализа к анализу* и *от капилляра к капилляру* оценивали путем измерения скорости ЭОПа в ходе электрофоретических экспериментов в следующих условиях: 10 мМ фосфатный буферный раствор (рН 2.0), -20 кВ; 220 нм; маркер ЭОП - 5 %-ный (объемн.) водный раствор ДМФА.

Стабильность покрытия *в среде органического растворителя* (ацетонитрила), оценивали путем измерения ЭОПа после пропускания через капилляр с ковалентным покрытием в течение 5 мин ацетонитрила, сопоставляя полученное значение с соответствующей величиной до введения ацетонитрила. Далее заполненный ацетонитрилом капилляр с ковалентным покрытием оставляли на 2 дня, а затем снова проводили измерение скорости ЭОПа.

Условия: 10 мМ фосфатный буферный раствор (рН 2.0), -20 кВ; 220 нм; маркер ЭОП – 5 %-ный (объемн.) водный раствор ДМФА.

Для выявления *рабочего диапазона рН* оценивали стабильность покрытия, измеряя скорость ЭОПа в диапазоне значений рН 2.0-4.0; 5.4; 6.4; 7.9; 9, 11; 12.3 с концентрацией буферного раствора 10 мМ. Измерение проводили трижды в каждой точке в направлении уменьшения кислотности, а затем – ее увеличения; рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение. Процедуру повторяли дважды.

II.5.3 Анализ основных аналитов – биогенных аминов

Для выявления условий разделения биогенных аминов (концентрация 0.5-25 мкг/мл) с использованием ковалентного покрытия варьировали концентрацию фосфатного буферного раствора (5 – 25 мМ при постоянном рН 2.0) и рН фонового электролита (2 – 4) при постоянной

концентрации фосфатного буферного раствора 10 мМ); напряжение: -20 кВ; УФ-детектирование 220 нм; ввод пробы 2-80 с при 30-50 мбар; температура: 20 °С.

II.5.4 Анализ кислотных аналитов – фенол- и индолкарбоновых кислот

Для выявления условий разделения фенол- и индолкарбоновых кислот с использованием ковалентного покрытия (0.5-120 мкг/мл) варьировали следующие условия: концентрация (5 – 25 мМ) и рН фосфатного буферного раствора (от 2.0 до 5.0).

II.5.5 Анализ гидрофобных аналитов – кортикостероидных гормонов

Для выявления условий разделения стероидных гормонов (концентрация 0.5-10 мкг) с использованием ковалентного покрытия варьировали следующие условия: концентрацию (5 – 25 мМ) и рН фосфатного буферного раствора (2.0; 3.0; 4.0; 7.0), содержание органического растворителя (метанола или ацетонитрила, 0 – 25 %); ввод пробы: 2 – 20 с при 30 – 50 мбар; при сохранении следующих параметров: напряжение -20 кВ; УФ-детектирование 254 нм; температура 20 °С.

II.6 Введение модификатора на основе имидазольного катиона в состав фонового электролита

II.6.1 Подготовка растворов модификаторов

Приготовление раствора 3-бутил-1-β-циклодекстринимидазолий тозилата

Для получения 2 мМ раствора 3-бутил-1-β-циклодекстринимидазолий тозилата навеску 15 мг растворяли в 5,36 мл воды, выдерживали в УЗ ванне в течение 20 мин при 40 °С.

Приготовление раствора 3-метил-1-β-циклодекстринимидазолий тозилата

Для получения 10 мМ раствора 3-метил-1-β-циклодекстринимидазолий тозилата навеску 67,8 мг растворяли в 5 мл воды, выдерживали в УЗ ванне в течение 20 мин при 40 °С.

II.6.2 Влияние концентрации модификатора на скорость электроосмотического потока (динамическая модификация стенок кварцевого капилляра)

Для изучения влияния концентрации модификатора в фоновом электролите на степень динамической модификации стенок кварцевого капилляра измеряли значение скорости ЭОПа при наличии в фоновом электролите модификатора с различной концентрацией (0.25; 0.5; 0.7; 1.0; 1.25; 1.5 мМ). После каждой серии анализов с заданной концентрацией модификатора капилляр последовательно промывали щелочью, кислотой, водой для удаления адсорбированного модификатора.

Условия: 10 мМ фосфатный буферный раствор (рН 6.4), -20 кВ; 220 нм; маркер ЭОП – 5 %-ный (объемн.) водный раствор ДМФА.

II.6.3 Анализ стероидных гормонов

Для выявления условия разделения кортикостероидных гормонов в режиме КЭХ с использованием синтезированного модификатора в качестве псевдостационарной фазы варьировали следующие параметры: рН фонового электролита (2.0; 2.8; 3.2; 3.8; 4.5; 6.4; 7.5; 8.0) и концентрацию фосфатного буферного раствора (5 – 50мМ), концентрацию модификатора на основе имидазолиевого катиона и ИЖ (0.1 – 2.25 мМ), содержание органического растворителя (0 – 20 объемн. %).

II.6.4 Энантиоразделение лекарственных препаратов

Для выявления условия разделения энантиомеров лекарственных препаратов варьировали следующие параметры: рН фонового электролита (2.0; 2.8; 3.2; 3.8; 4.5; 6.4; 7.5; 8.0) и концентрацию фосфатного буферного раствора (5-50 мМ), концентрацию модификатора на основе имидазолиевого катиона и ИЖ (0.1 - 2.25 мМ), содержание органического растворителя (0 – 20 % объемн.) и его природу (ацетонитрил, метанол, этанол, 2-пропанол, 1-бутанол)

II.6.5 Расчет констант комплексообразования производного β -циклодекстрина с индивидуальными энантиомерами

Для расчета констант комплексообразования использовали алгоритм, предложенный в [178] с некоторыми изменениями. Для учета возможного влияния вязкости раствора, которая может быть вызвана введением олигосахаридов в ФЭ, была предварительно построена графическая зависимость скорости ЭОПа от динамической вязкости раствора (в качестве референсных точек вязкости взяты растворители метанол, деионизованная вода, этанол, диметилсульфоксид, 2-пропанол. Далее измеряли скорость ЭОПа и электрофоретические подвижности энантиомеров при различных концентрациях хирального селектора в составе ФЭ, учитывая поправки на вязкость растворов.

II.7 Двойные хиральные системы

II.7.1 Изучение аналитических возможностей 1-Ви-3- β -CDImOTs в качестве хирального селектора в двойных хиральных системах

Тестовые эксперименты для изучения эффекта применения двух хиральных селекторов при разделении модельной смеси энантиомеров кетопрофена (10 мкг/мл) и кеторолака (50 мкг/мл) проводили с варьированием концентрации второго модификатора в составе ФЭ, в то

время как концентрация 1-Bu-3- β -CDImOTs оставалась постоянной (1мМ), т.е. второй хиральный селектор брали в концентрациях 0.5 мМ; 1.0 мМ и 1.5мМ (или 2.0 мМ). Условия: ввод пробы 2 с 30 мбар; 25 мМ фосфатный буферный раствор (рН 6.4); 254 нм, 20 кВ.

В качестве второго хирального селектора испытаны следующие соединения: незаряженные ЦД (β -ЦД, ГП- β -ЦД, α -ЦД), а также сульфо- β -ЦД, декстран и антибиотики (ванкомицин, амоксициллин и амикацин). Готовили исходные растворы в концентрации 10 мМ (для амоксициллина и β -ЦД – 4 мМ из-за низкой растворимости в воде) путем растворения необходимой навески в воде и далее использовали для введения в фоновый электролит.

II.8 Онлайн концентрирование

II.8.1 Применение ковалентных покрытий на основе имидазольевого катиона

Стэкинг с усилением поля для биогенных аминов

Концентрирование биогенных аминов (концентрация 5×10^{-3} -25 мкг) в режиме стэкинга с усилением поля проводили при следующих условиях: фоновый электролит 5 – 25 мМ фосфатный буферный раствор (рН 2.0); напряжение -20 кВ; УФ-детектирование 220 нм; ввод пробы 2-20 с при 30 – 50 мбар; температура 20 °С

Стэкинг с большим объемом вводимой пробы для кортикостероидных гормонов

Концентрирование стероидных гормонов (концентрация 0.5 – 10 мкг) в режиме стэкинга с большим объемом вводимой пробы проводили при следующих условиях: фоновый электролит 10 мМ фосфатный буферный раствор (рН 2.0); напряжение: -20 кВ; УФ-детектирование 254 нм; ввод пробы: 2 – 80 с при 30-50 мбар; температура 20 °С.

Электростэкинг-сви́пинг биогенных аминов

Для концентрирования биогенных аминов в режиме электростэкинг-сви́пинга в качестве мицеллообразующего агента использовали ДДСН ($C_{ккм}=8,2$ мМ) при следующих условиях: фоновый электролит: 10 мМ фосфатный буферный раствор (рН 2.0), ДДСН (15-50 мМ); напряжение +20 кВ; длина волны: 220 нм; ввод пробы: 2-100 с при 10-15 Кв; температура: 20 °С.

Использование пробки модификатора для концентрирования стероидных гормонов

Использовали два типа ввода пробки модификатора: *электрокинетический* - после (2 – 40 с, 5 – 15 кВ) и *гидродинамический* (2 – 20 с, 30 мбар) - до ввода анализируемого образца в предварительно заполненный фоновым электролитом кварцевый капилляр. В качестве

мицеллообразующего агента использовали растворы ионных жидкостей: 15 – 20 мМ $C_{12}MImCl$ и 1 мМ $C_{16}MImCl$, 1 мМ ЦТАБ.

II.8.2 Концентрирование стероидных гормонов в режиме электрокинетической хроматографии

Концентрирование стероидных гормонов (концентрация 0.5 – 10 мкг) в режиме *стэкинга* с большим объемом вводимой пробы проводили при следующих условиях: 5 мМ фосфатный буферный раствор (рН 6.4), 0.7 мМ 3-Ме-1- β -CD-ImOTs, 10 % (объемн.) ацетонитрила. Модельная смесь из пяти стероидных гормонов (0.1-10 мкг/мл): ввод пробы – 2 – 50 с, 30 мбар; напряжение +20 кВ, длина волны 254 нм.

Концентрирование стероидных гормонов *при электрокинетическом вводе в виде комплексов с ЦД* проводили в следующих условиях: 5 мМ фосфатный буферный раствор (рН 6.4), 0.7 мМ 3-Ме-1- β -CD-ImOTs, 10 % (объемн.) ацетонитрила; модельная смесь, содержащая пять стероидных гормонов (0.1-10 мкг/мл) в водном растворе, 3-Ме-1- β -CD-ImOTs (0.15 мМ); ввод пробы 2 – 50 с, 20 кВ.

II.8.3 Концентрирование индивидуальных энантиомеров в режиме электрокинетической хроматографии

Концентрирование индивидуальных энантиомеров проводили как с помощью классических подходов, так и при сочетании нескольких вариантов онлайн концентрирования (гибридные методы) (таблица 8).

Таблица 8. Апробированные условия внутрикапиллярного концентрирования энантиомеров кетопрофена и кеторолака.

Вариант онлайн концентрирования	Состав ФЭ	Состав матрицы пробы	Диапазон концентраций энантиомеров	Ввод пробы	Длина волны, напряжение
<i>Стэкинг с усилением поля</i>	25 мМ фосфатный буферный раствор pH 6.4, 1 мМ 3-Bu-1-β-CD-ImOTs	2.5 мМ ФБР (pH 6.4)	0.5-50 мкг/мл	2-80 с 30 мбар	254 нм, +20 кВ
<i>Стэкинг с большим объемом ввода пробы</i>	25 мМ ФБР pH 6.4, 1 мМ 3-Bu-1-β-CD-ImOTs	25 мМ ФБР pH 6.4	0.5-50 мкг/мл	40 с 30 мбар	254 нм, +20 кВ
<i>Свилинг</i>	25 мМ ФБР pH 6.4, 5-20 мМ ДДСН, 1 мМ 3-Bu-1-β-CD-ImOTs	25 мМ ФБР pH 6.4	0.5-50 мкг/мл	2-40 с 30 мбар	254 нм, +20 кВ
	25 мМ ФБР pH 6.4, 5-20 мМ C ₁₂ MImCl, 1 мМ 3-Bu-1-β-CD-ImOTs	25 мМ ФБР pH 6.4	0.5-50 мкг/мл	2-40 с 30 мбар	254 нм, - 20кВ
<i>Динамический pH скачок</i>	25 мМ ФБР pH 6.4, 1 мМ 3-Bu-1-β-CD-ImOTs	25 мМ ФБР pH 2.5 или 3.2	0.5-50 мкг/мл	2-40 с 30 мбар	254 нм, +20 кВ
<i>Гибридный вариант</i>	25 мМ ФБР pH 6.4, 1 мМ 3-Bu-1-β-CD-ImOTs	25 мМ ФБР pH 2.5 или 3.2, до ввода образца—10 мМ ДДСН	0.5-50 мкг/мл	2-40 с 30 мбар	254 нм, +20 кВ

II.9 Анализ реальных объектов

Образцы крови, мочи, а также нелекарственная плазма человека получена из ФГБУ «НЦЭРМ им. Никифорова» (Санкт-Петербург, Россия).

II.9.1 Определение биогенных аминов в образцах мочи

Пробоподготовку образцов мочи проводили согласно описанной ранее методике сорбционного концентрирования с использованием активированного оксида алюминия [179]. Для предотвращения окисления аналитов к 5 мл образца мочи добавляли 1.2 мл 50 мМ водного раствора Na₂ЭДТА, далее 1 М водным раствором Na₂CO₃ доводили pH образца до значения 8.5, вносили 25 мг активированного оксида алюминия, перемешивали и отфильтровывали с использованием системы Pperpu с мембранным насосом. На последнем этапе сорбент промывали дистиллированной водой (дважды по 3 мл) и десорбировали аналиты путем промывания 0.5 мл 1 М раствором уксусной кислоты. Концентрации биогенных аминов в образцах мочи найдены методом абсолютной градуировки. Калибровочный диапазон индивидуальных аналитов 10-100 нг/мл.

II.9.2 Определение стероидных гормонов в образцах плазмы крови человека

Образцы венозной крови отбирали у здоровых добровольцев натощак в пробирки с гепарином объемом 5 мл. После центрифугирования при 3000 об/мин в течение 5 мин при 4 °С плазму переносили в пропиленовые пробирки и хранили при -20 °С до анализа.

Для предварительной обработки образцов плазмы использовали метод жидкостно-жидкостной экстракции. В 1,0 мл плазмы или калибровочных проб добавляли 10 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта. После перемешивания на вортексе в течение ~ 2 мин добавляли хлороформ (5 мл) и тщательно перемешивали на вортексе в течение 5 мин, затем смесь центрифугировали при 15000 об/мин при 4 °С (10 мин). После центрифугирования верхний слой удаляли, а нижний органический слой дважды промывали 0.5 мл 0.1 М раствора NaOH и 1.0 мл H₂O. Затем, когда большая часть воды была удалена, добавляли сульфат натрия и оставляли на 20 мин. Обезвоженный слой хлороформа переносили в эппендорф объемом 0.6 мл и упаривали досуха. Остаток перерастворяли в 200 мл воды с добавлением 0.05 мМ 3-Me-1-β-CD-ImOTs, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 3 мин и прозрачный супернатант вводили в кварцевый капилляр для анализа.

Содержание стероидных гормонов определяли методом абсолютной градуировки. Для приготовления калибровочных стандартов использовали фосфатно-солевой буфер в качестве суррогатной матрицы: к 1 мл фосфатно-солевого буфера добавляли 10 мкл соответствующего рабочего раствора для получения калибровочных растворов стероидов, эквивалентных 5.0; 10.0; 25.0; 50.0; 100.0 и 250.0 нг/мл. Для получения рабочих растворов исходные растворы кортикостероидов (1 мг/мл) разбавляли деионизированной водой до необходимой концентрации (50; 100; 250; 500; 1000; 2500 нг/мл). Рабочий раствор внутреннего стандарта (20 мкг/мл) получали разбавлением исходного раствора в деионизированной воде.

II.9.3 Определение энантиомеров кеторолака в образцах плазмы крови человека

Образцы венозной крови были взяты у здоровых добровольцев в пробирки Vacutainer объемом 5 мл, содержащие K₃EDTA через 45 мин после приема одной таблетки «Кеторол экспресс». После центрифугирования при 3000 об/мин в течение 5 мин при 4 °С плазму переносили в полипропиленовые пробирки и хранили при -20 °С до анализа.

Содержание индивидуальных энантиомеров находили методом абсолютной градуировки. Рабочие растворы R,S-кеторолака 5.0; 10.0; 15.0; 20.0; 25.0; 50.0 мкг/мл готовили разбавлением исходного раствора дистиллированной водой. Соотношение концентраций энантиомеров в рацемической смеси принимали за 1:1, поэтому концентрации индивидуальных энантиомеров составляли 2.5; 5.0; 7.5; 10.0; 12.5; 25.0 мкг/мл. Калибровочные образцы готовили путем

добавления 20 мкл рабочего раствора к 180 мкл не содержащей лекарственного средства плазмы. Конечные концентрации калибровочного стандарта в плазме составляли 0.25; 0.50; 0.75; 1.00; 1.25; 2.5 мкг/мл.

Для электрофоретического анализа к калибровочным образцам добавляли 20 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта (10 мкг/мл *S*-кетопрофена), затем для осаждения белка добавляли 50 мкл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. После этого образцы перемешивали 5 мин на вортексе и центрифугировали при 7000 об/мин в течение 5 мин. Затем по 100 мкл супернатанта перемещали в эппендорф на 1.5 мл и разбавляли 100 мкл дистиллированной воды.

Для хроматографического анализа к калибровочным стандартам добавляли 400 мкл 0.2 %-ного (масс.) раствора трихлоруксусной кислоты в метаноле. После этого образцы перемешивали 5 мин на вортексе и центрифугировали при 7000 об/мин в течение 5 мин. Затем по 100 мкл супернатанта перемещали в вials и анализировали методом ВЭЖХ.

Образцы плазмы пациентов размораживали при комнатной температуре и к 200 мкл плазмы добавляли 20 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта (10 мкг/мл *S*-кетопрофена). Осаждение белка и дальнейшую предобработку образцов проводили по описанным методикам электрофоретического или хроматографического анализа.

Для оценки повторяемости измерение каждой калибровочной точки проводили 5 раз, для оценки внутрилабораторной прецизионности измерения проводили на следующий день и через неделю по 3 раза.

II.9.4 Пробоподготовка таблеток с действующим веществом кеторолак

Таблетку, содержащую кеторолак в качестве действующего вещества («Ketorol express», Dr. Reddy's Laboratories, LTD, 10 mg), растворяли в 10 мл смеси воды и ацетонитрила (1:1, объемн.), обрабатывали УЗ в течение 10 мин и центрифугировали при 7000 об/мин в течение 10 мин. Перед электрофоретическим анализом супернатант разбавляли в 100 раз деионизованной водой.

II.10 Эксперименты без модификации электрофоретической системы

Для оценки эффективности предложенных модификаций электрофоретических систем полученные значения эффективности и селективности разделения сравнивали со значениями, полученными в экспериментах без модификации электрофоретической системы при тех же концентрациях и значениях рН фонового электролита.

Глава III. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Метод капиллярного электрофореза является одним из перспективных при определении биологически активных соединений и лекарственных препаратов в объектах со сложной матрицей. Поиск эффективных модификаторов электрофоретических систем для формирования покрытий (динамических и ковалентных) внутренних стенок кварцевого капилляра и применения их в гибридных вариантах внутрикапиллярного (*on-line*) концентрирования позволяет снизить пределы обнаружения до значений, достаточных для анализа биологических жидкостей, и при этом влиять на селективность электрофоретического разделения аналитов.

В качестве исследуемых модификаторов нами выбраны имидазолиевые ионные жидкости и модификаторы на основе имидазолиевого катиона, являющиеся одними из универсальных в области КЭ и подходящими для разделения большого количества биологически активных соединений благодаря наличию положительного заряда, ароматической системы и легкости введения в имидазолиевое кольцо различных заместителей. В качестве таких заместителей могут быть циклодекстрины, способные выступать в качестве комплексообразователей по отношению к гидрофобным аналитам и выполнять роль хирального селектора для энантиомеров лекарственных средств.

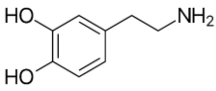
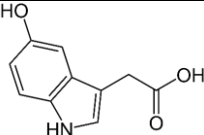
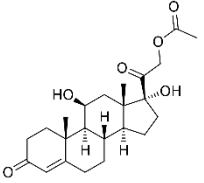
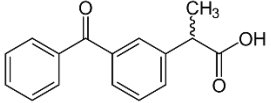
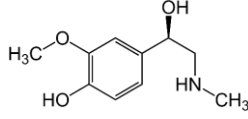
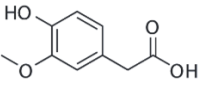
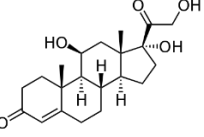
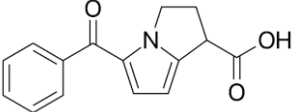
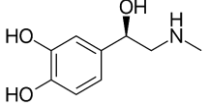
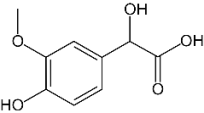
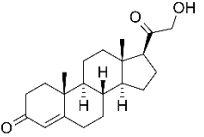
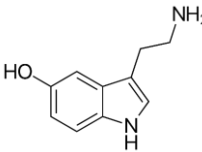
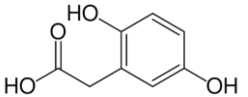
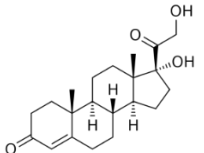
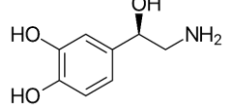
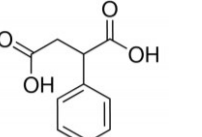
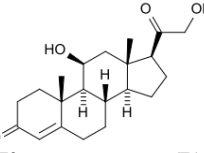
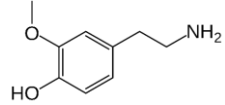
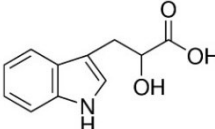
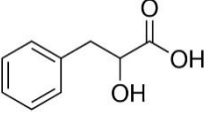
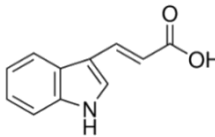
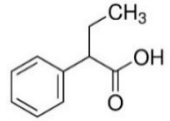
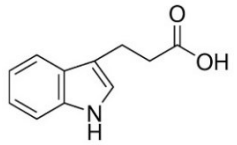
Таким образом, наибольший интерес вызывают полифункциональные модификаторы, способные выполнять ряд функций: модифицировать стенки кварцевого капилляра (в том числе и с обращением ЭОП), регулировать эффективность и селективность разделения за счет образования водородных связей, электростатических и π - π - взаимодействий с аналитами, способствовать разделению близких по структуре соединений путем реализации дополнительных механизмов взаимодействия (комплексообразование с ЦД), участвовать в процессах онлайн концентрирования.

При выполнении данной работы нами выделено для специального исследования три возможных функций изучаемых модификаторов:

- в качестве псевдостационарных фаз;
- хиральных добавок;
- модификаторов внутренних стенок кварцевого капилляра с формированием ковалентных покрытий и реализацией режима капиллярной электрохроматографии

На модельных смесях различных классов аналитов (таблица 9) выявлены аналитические возможности исследуемых модификаторов в качестве стационарных и псевдостационарных фаз.

Таблица 9. Структуры исследуемых соединений и значения их рКа

Биогенные амины	Кислотные производные биогенных аминов, фенил- индолкарбоновые кислоты	Кортикостероидные гормоны	Рацематы нестероидных противовоспалительных препаратов
 <p>Дофамин (DA) pKa=8.93</p>	 <p>5-Гидроксииндолуксусная кислота (5-HTAA) pKa = 4.22</p>	 <p>Кортизон (E)</p>	 <p>R,S-кетопрофен (ket)</p>
 <p>Метанефрин (MN) pKa= 9.25</p>	 <p>Гомованилиновая кислота (HVA) pKa = 3.74</p>	 <p>Кортизол (F)</p>	 <p>R,S-кеторолак (ketor)</p>
 <p>Адреналин (A) pKa=8.91</p>	 <p>Ванилилминдальная кислота (VMA) pKa = 3.42</p>	 <p>Дезоксикортикостерон (DOC)</p>	
 <p>Серотонин (5-НТ) pKa = 9.31</p>	 <p>Гомогентизиновая кислота pKa = 3.57</p>	 <p>11-Дезоксикортизол (S)</p>	
 <p>Норадреналин (NA) pKa = 8.58</p>	 <p>Phenylsuccinic acid pKa1 = 3.78; pKa2 = 5.55</p>	 <p>Кортикостерон (B)</p>	
 <p>3-Метокситирамин (3-МТА) pKa = 9.64</p>	 <p>3-индолакриловая кислота pKa = 4.59</p>		
	 <p>3-фенилмолочная кислота pKa = 4.02</p>		
	 <p>3-индолмолочная кислота pKa = 3.86</p>		
	 <p>2- фенилмасляная кислота pKa = 4.66</p>		
	 <p>3-индолпропионовая кислота pKa = 4.39</p>		

III.1 Ковалентные покрытия на основе имидазольевого катиона

III.1.1 Формирование ковалентных покрытий

Предварительная подготовка капилляров с формированием линкера

Нами предложена схема синтеза ковалентных покрытий на основе имидазольевого катиона, включающая активацию стенок кварцевого капилляра щелочью, силилирование и функционализацию. Для получения структур по типу имидазольевых ионных жидкостей первый этап функционализации представлял собой реакцию нуклеофильного замещения имидазолом, а на втором этапе структуры используемых для последующей реакции реагентов варьировались.

Прежде всего оптимизировали процедуру подготовки капилляра к синтезу ковалентных покрытий: травление щелочью и удаление адсорбированной воды с поверхности капилляра. При активации поверхности капилляра рассматривали два варианта: травление капилляра 2 М раствором гидроксида натрия (выдерживание капилляра, заполненного щелочью, при температуре 90 °С в течение 1 ч) и продолжительную промывку при высоком давлении (1000 мбар). Первый вариант обеспечил лучший результат – при такой активации поверхности получали более стабильные покрытия.

Важным этапом перед проведением силилирования является десорбция воды, адсорбированной на внутренней поверхности капилляра. Для этого капилляр предварительно промывали ацетоном, продували воздухом и далее выдерживали при повышенной температуре в термостате, оставив концы капилляра не запечатанными. Диапазон изучаемых температур – 100–180 °С с шагом 20 °С. После выдерживания при повышенной температуре в течение 1 ч проводили силилирование и оценивали степень модификации путем сопоставления значений электроосмотического потока на капиллярах, модифицированных силилирующим агентом, с немодифицированным [180]:

$$\varphi = 2 \frac{(\mu_{OC} - \mu_{OSi})}{(\mu_{OC} + \mu_{OSi})}, \quad (2)$$

где μ_{OC} – скорость ЭОП в немодифицированном капилляре, см²/В×с;

μ_{OSi} – скорость ЭОП в капилляре с ковалентно пришитым силилирующим агентом, см²/В×с.

Наибольшая степень модификации достигнута при температуре дегидратации 160 °С (рисунок 21), что согласуется с результатами, полученным в [180] для 1-окт-7-енилтриметоксисилана.

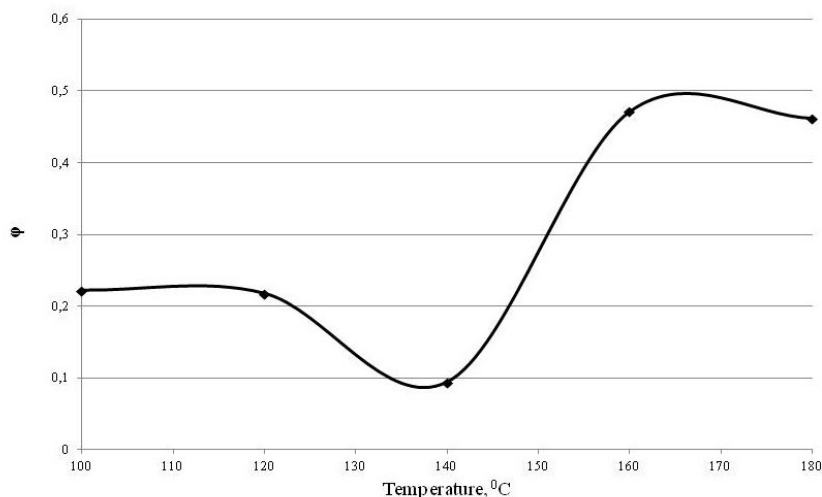


Рисунок 21. Степень модификации кварцевого капилляра на этапе силилирования после удаления адсорбированной воды при повышенных температурах.

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 10 мМ фосфатный буферный раствор (рН 7); 10 кВ; УФ-детектирование 220 нм; маркер ЭОП – 5%-ный (объемн.) раствор ДМФА в воде.

Реакцию силилирования проводили раствором, содержащим 30 % (объемн.) (3-глицидоксипропил)триметоксисилана и 0.1% (масс.) DPPH в ДМФА. После заполнения и герметизации концов капилляра, его выдерживали в термостате при 120 °С в течение 6 ч.

На следующем этапе проводили функционализацию имидазолом с раскрытием оксиранового цикла 3-глицидилпропилтриметоксисилана, протекающую по S_N2 механизму согласно правилу Красуского (замещение идет по наименее замещенному атому оксиранового цикла). Капилляр заполняли раствором имидазола в ДМФА (25 мг/мл) и выдерживали при 90 °С в течение 6 ч [181].

Общая схема синтеза представлена на рисунке 22.

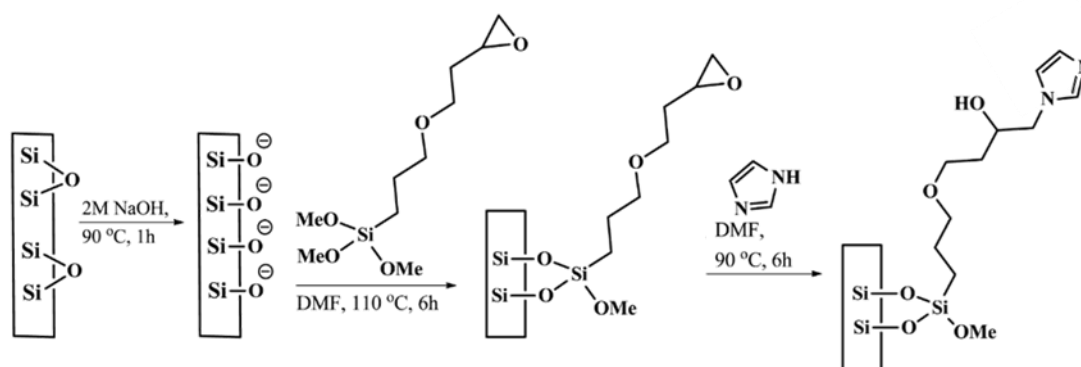


Рисунок 22. Схема синтеза линкера для ковалентных покрытий на основе имидазола

Постфункционализация ковалентных покрытий

Варьируя заместитель имидазольного катиона, можно менять функциональность покрытия и значительно расширять аналитические возможности синтезированных ковалентных покрытий. В зависимости от используемых на втором этапе функционализации реагентов получали ковалентные покрытия разных структур: алкилимидазольные и на основе β -ЦД. Последний был выбран в качестве функционализирующего агента из-за наличия гидрофобной полости, что делает его перспективным для селективного электрофоретического определения стероидных гормонов и энантиомеров лекарственных препаратов.

Для получения алкилимидазольных покрытий использовали алкилбромиды. Взаимодействие 1-бромбутана или 1-бромоктана с ковалентно иммобилизованным на внутренней стенке капилляра имидазолом приводило к формированию 1,3-диалкилимидазольных солей.

Для проведения реакции капилляр заполняли 1-бромалканом и выдерживали в течение 10 ч при 80 °С. Для последующей модификации циклодекстрином предполагалось (как и в случае функционализации алкилбромидами) проведение реакции нуклеофильного замещения имидазолом, ковалентно пришитым к стенкам капилляра, однако гидроксильные группы циклодекстрина являются плохо уходящими группами и не могут в данных условиях вступать в реакцию нуклеофильного замещения. Для получения функционализированных β -ЦД покрытий использовали предварительно синтезированное производное β -циклодекстрина, где одна первичная гидроксильная группа заменялась на хорошо уходящую – тозилную. Далее заполняли капилляр раствором тозилного производного в ДМФА и проводили оптимизацию условий реакции данного этапа постфункционализации. Варьировали концентрацию модифицирующего агента (25 – 750 мг/мл), температуру (80 – 100 °С) и время реакции (10 – 22 ч). Установлено, что при концентрации модификатора 500 мг/мл, времени – 22 ч и температуре 100 °С удается добиться требуемого результата: на сформированных покрытиях проведено ~ 150 электрофоретических анализов смесей гидрофобных и гидрофильных аналитов с высокой воспроизводимостью [182].

Обобщенная схема синтеза и получаемые структуры ковалентных покрытий представлены на рисунке 23.

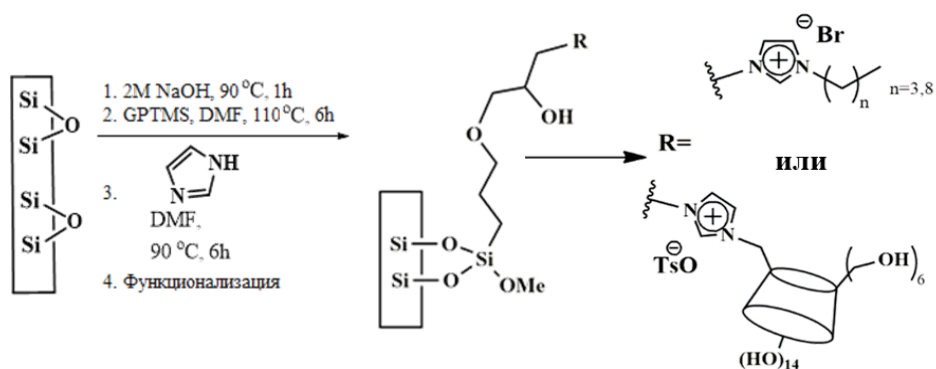


Рисунок 23. Обобщенная схема синтеза и получаемые структуры ковалентных покрытий

III.1.2 Характеристика синтезированных ковалентных покрытий

Положительно заряженные ковалентные покрытия на внутренней стенке кварцевого капилляра приводят к обращению ЭОП, и при pH фонового электролита 2.0 наблюдается сильный анодный ЭОП (рисунок 24).

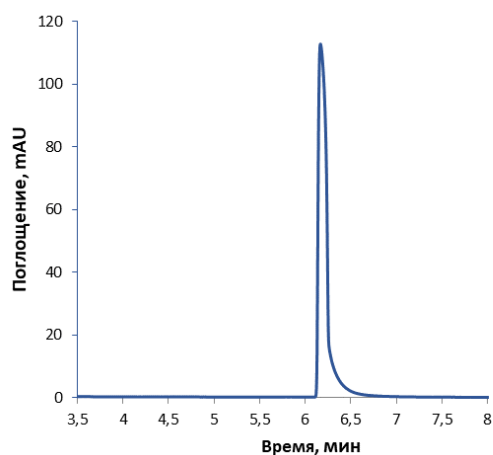


Рисунок 24. Электрофореграмма маркера ЭОП (Маркер ЭОП – 5%-ный (объемн.) раствор ДМФА в воде) на алкилимидазолиевых ковалентных покрытиях.

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 10 mM фосфатный буферный раствор (pH 2.0); -20 кВ; 220 нм.

Подтверждением наличия ковалентного покрытия на внутренней стенке кварцевого капилляра служат и снимки, полученные методом СЭМ (рисунок 25). На фотографиях видно, что на поверхности модифицированного капилляра имеется слой ковалентного покрытия. Измерение его толщины выполнено в нескольких точках и составляет 18-20 нм.

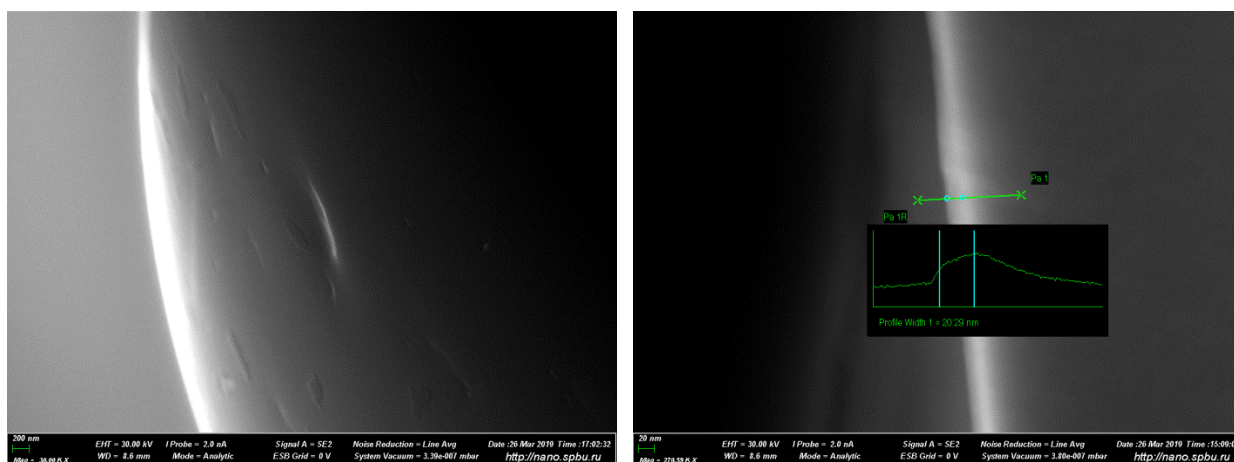


Рисунок 25. Фотография модифицированной внутренней поверхности кварцевого капилляра (слева) и определение толщины покрытия (справа). Условия: прибор Carl Zeiss Merlin, ускоряющее напряжение 30кВ; капилляры с ковалентным покрытием на основе имидазола и β -ЦД (условия функционализации: $C_{Ts-\beta-ЦД}$ =500 мг/мл; 22 ч, 100 °С).

Изучена стабильность ковалентных покрытий от анализа к анализу и от капилляра к капилляру. Выводы о стабильности капилляра делали на основании измерения скорости ЭОП (таблица 10).

Таблица 10. Воспроизводимость скорости ЭОП от капилляра к капилляру и от анализа к анализу.

	От капилляра к капилляру		От анализа к анализу	
	$\mu_e, 10^9 \text{ м}^2 \text{ В}^{-1} \text{ с}^{-1}$	RSD, %	$\mu_e, 10^9 \text{ м}^2 \text{ В}^{-1} \text{ с}^{-1}$	RSD, %
на основе ЦД	-34.7 ± 2.7	7.7	-36.4 ± 0.5	1.4
бутилимидазолиевое	-43.4 ± 1.4	3.2	-43.7 ± 0.4	0.9

Дополнительно, путем измерения скорости ЭОП, выполнена оценка стабильности ковалентных покрытий при введении в состав фонового электролита органического растворителя. Последние могут быть полезными в случае необходимости изменения гидрофобно-гидрофильного баланса при поиске условий разделения. Скорость ЭОП на анализируемом капилляре до введения ацетонитрила составляла $-40.7 \times 10^9, \text{ м}^2 \text{ В}^{-1} \text{ с}^{-1}$ и определялась в следующих условиях: 10мМ фосфатный буферный раствор (рН 2.0), -20 кВ, маркер ЭОП – 5%-ный водный раствор ДМФА. Далее через капилляр пропускали ацетонитрил в течение 5 мин и снова измеряли скорость ЭОП в условиях, аналогичных стартовому измерению скорости ЭОП. Процесс повторяли 15 раз. Изменение значений скорости ЭОП после суммарного воздействия ацетонитрила в течение одного часа составляло не более 4%, что соответствует стандартному отклонению измерения скорости ЭОП после промывки ацетонитрилом (-

$38.9 \pm 1.5 \times 10^9$, $\text{м}^2\text{В}^{-1}\text{с}^{-1}$, RSD $n=13$, $P=95\%$) и может быть связано с более длительным восстановлением диффузионного слоя вблизи поверхности покрытия. Таким образом, можно говорить о стабильности покрытия при введении ацетонитрила в ФЭ. Однако хранение заполненного ацетонитрилом капилляра с ковалентным покрытием в течение двух дней приводит к более значительному изменению скорости ЭОП (~15%), поэтому при работе с органическими растворителями рекомендовано перемывать капилляр рабочим буферным раствором, не оставляя его на долгое время заполненным органическим растворителем.

Для оценки стабильности покрытия при различных значениях pH фонового электролита и определения рабочего диапазона pH контролировали скорость ЭОП и сопоставляли со значениями, полученными на немодифицированном капилляре. Измерения на капиллярах с ковалентным покрытием проводили трижды в каждой точке в направлении уменьшения кислотности, а затем – ее увеличения. Процедуру повторяли дважды. Из представленных зависимостей можно сделать вывод, что частичное разрушение покрытия происходит в щелочной среде и обусловлено гидролизом силанольных связей, которые непосредственно участвуют в закреплении ковалентного покрытия на внутренней стенке кварцевого капилляра. Возрастание числа свободных силанольных групп из-за деградации покрытия приводит к увеличению скорости катодного ЭОП в щелочной среде и уменьшению скорости анодного ЭОП в кислой, однако даже после второй петли гистерезиса регистрируется анодный ЭОП, что указывает на наличие покрытия (Рисунок 26).

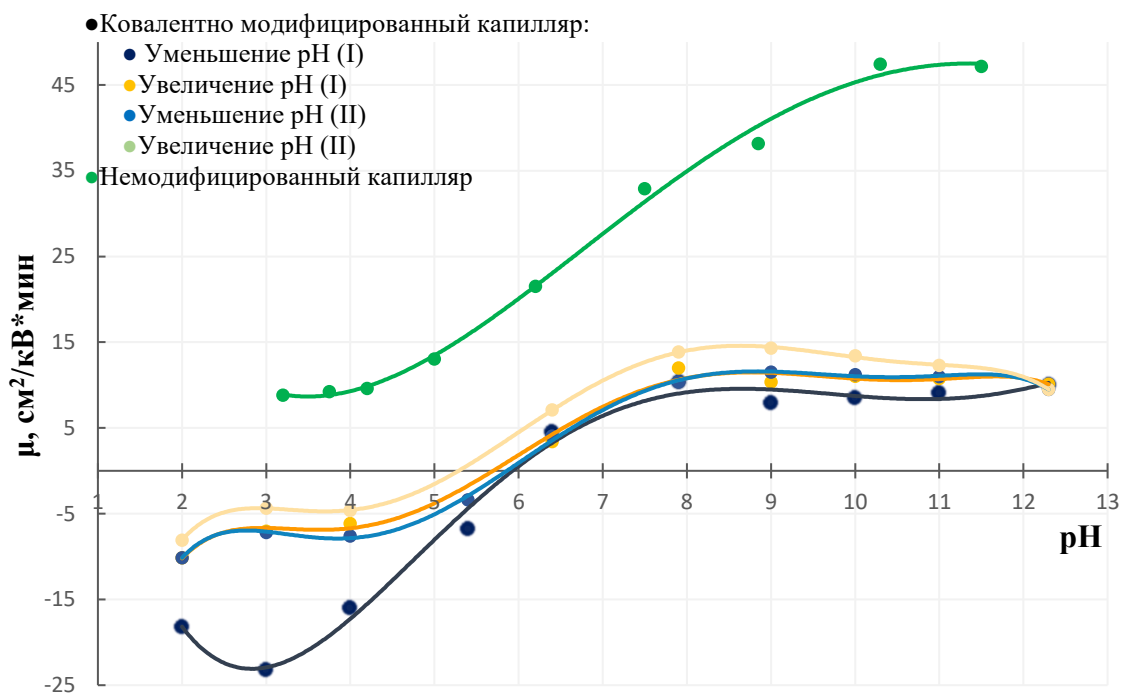


Рисунок 26. Проверка стабильности ковалентных покрытий стенок кварцевого капилляра в широком диапазоне pH на примере циклодекстринимидазолиевого покрытия.

Для оценки аналитических возможностей синтезированных покрытий выбраны различные соединения: в качестве гидрофильных аналитов – биогенные амины, гидрофобных – кортикостероидные гормоны; а для выявления возможности циклодекстринимидазолиевого покрытия способствовать хиральному разделению был взят рацемат кетопрофена.

III.1.3 Анализ биогенных аминов на ковалентно модифицированных капиллярах

Положительный заряд ковалентного покрытия на стенках кварцевого капилляра предотвращает сорбцию основных аналитов – биогенных аминов, обеспечивая их разделение с высокими значениями факторов разрешения ($R_s=0.9 - 2.7$). Обнаружено увеличение эффективности и селективности разделения в несколько раз по сравнению с определением на немодифицированном капилляре, что в существенной степени обусловлено π - π -взаимодействиями между аналитами и имидазолиевым кольцом и видно на примере пары дофамин-серотонин (рисунок 27А)

Изучено влияние заместителя имидазолиевого кольца в структуре ковалентного покрытия на результаты электрофоретического определения биогенных аминов. Время анализа биогенных аминов на покрытии, где в качестве заместителя выступал β -ЦД, увеличилось по сравнению с *N*-алкилимидазолиевыми покрытиями (рисунок 27В). Одна из возможных причин – уменьшение вклада электростатического отталкивания положительно заряженных аналитов от стенок капилляра с одноименным зарядом ввиду меньшей доступности имидазолиевого катиона.

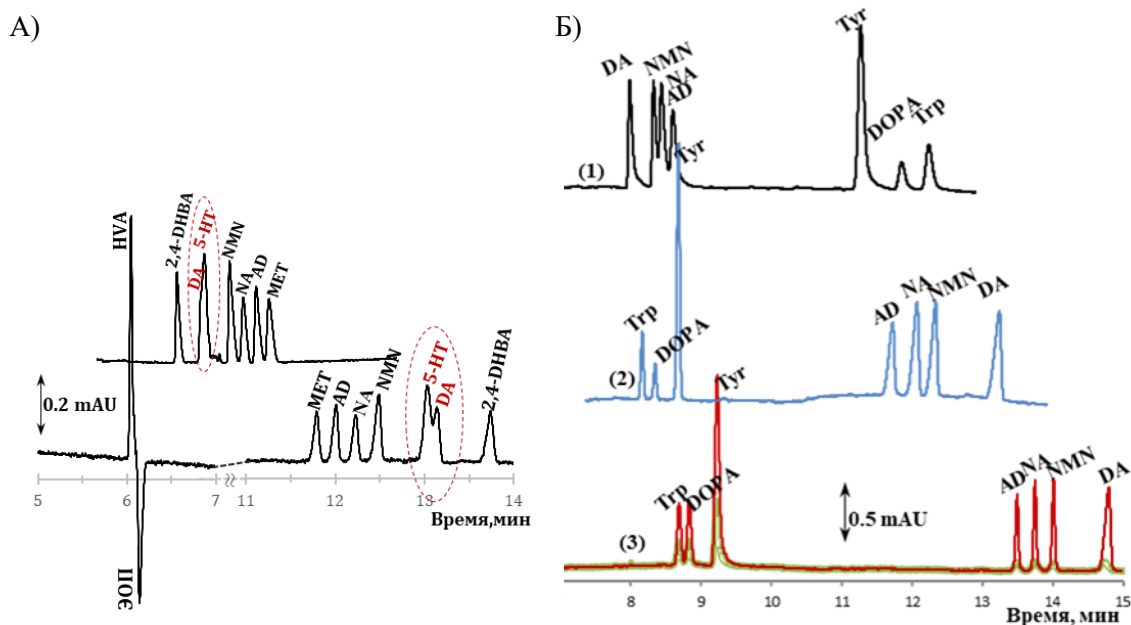


Рисунок 27. Электрофореграммы модельной смеси 7 биогенных аминов на немодифицированном (сверху) и капилляре и капилляре, ковалентно модифицированных бутилимидазолом (А) и катехоламинами и поглощающих в УФ области спектра аминокислот (сверху вниз) на немодифицированном (1) капилляре и капиллярах, ковалентно модифицированных бутилимидазолом (2) и циклодекстринимидазолом (2) (Б).

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 10 мМ раствор NaH_2PO_4 (доведенный до pH 2.0 0.1 М раствором HCl), ввод пробы 5с 30м бар, - 20кВ (на ковалентно модифицированных капиллярах) и +20 кВ (на немодифицированных капиллярах), 220нм.

Проба: модельная смесь биогенных аминов и поглощающих аминокислот (25 мкг/мл): NA – норадреналин, DA – дофамин, NMN – норметанефрин, AD – адреналин, Tyr – триптофан, Тур – тирозин, DOPA – 3,4-дигидроксифенилаланин.

Алкилимидазолиевые покрытия оказались перспективными для определения кислотных производных биогенных аминов, а также фенил- и индолкарбоновых кислот. Несмотря на то, что на бутилимидазолиевом покрытии возможно совместное определение кислотных, цвитерионных и основных аналитов (рисунок 28), электрофоретическое разделение близких по структуре соединений требует специальной оптимизации условий.

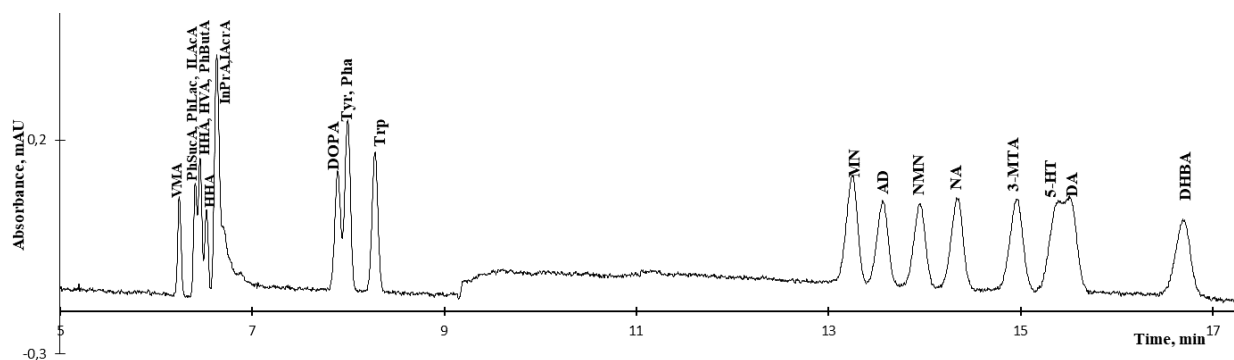


Рисунок 28. Электрофореграмма совместного определения кислотных и основных аналитов на бутилимидазолиевом ковалентном покрытии.

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 10 мМ раствор NaH_2PO_4 (доведенный до pH 2.0 0.1 М раствором HCl), ввод пробы: 2.0 с 30 мбар; -20 кВ; 220 нм. Стационарная фаза – ковалентное покрытие на основе бутилимидазолиевого катиона.

Для поиска условий разделения всех десяти карбоновых кислот исследовано влияние значения pH и ионной силы ФЭ на селективность их разделения. При pH 2 диссоциация кислот подавлена (pK_a этих кислот в диапазоне 3 - 5; см. таблица 9), увеличение значения pH фонового электролита приводит к диссоциации кислот и изменению их скорости миграции. Наблюдалось нелинейное изменение селективности разделения кислот: при увеличении pH от 2 до 3.8 селективность разделения всех кислот возрастала (максимальные значения достигались при pH 4.2); дальнейшее увеличение pH фонового электролита до 4.5 приводило к снижению селективности разделения некоторых кислот (рисунок 29), а для индолакриловой кислоты значительно возросла асимметрия пика. Увеличение ионной силы фонового электролита до 25 мМ не привело к заметному росту факторов селективности разделения.

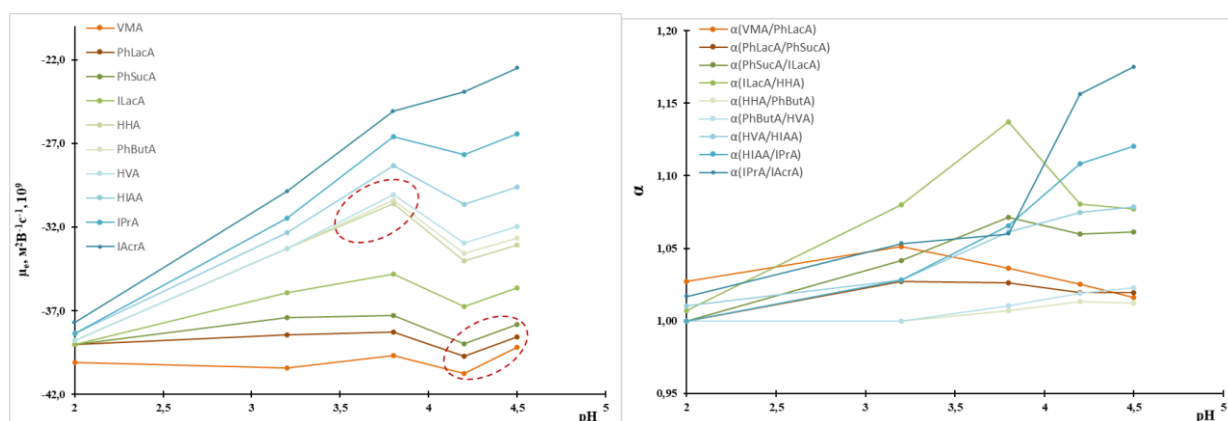


Рисунок 29. Зависимость изменений электрофоретических подвижностей (слева) и коэффициентов селективности (справа) десяти ароматических кислот от величины pH фонового электролита.

Разделение всех десяти кислот достигнуто в условиях: 10 мМ раствор NaH_2PO_4 (доведенный до pH 2.0 0.1 М раствором HCl), pH 4.2, -20кВ, 220 нм (рисунок 30)

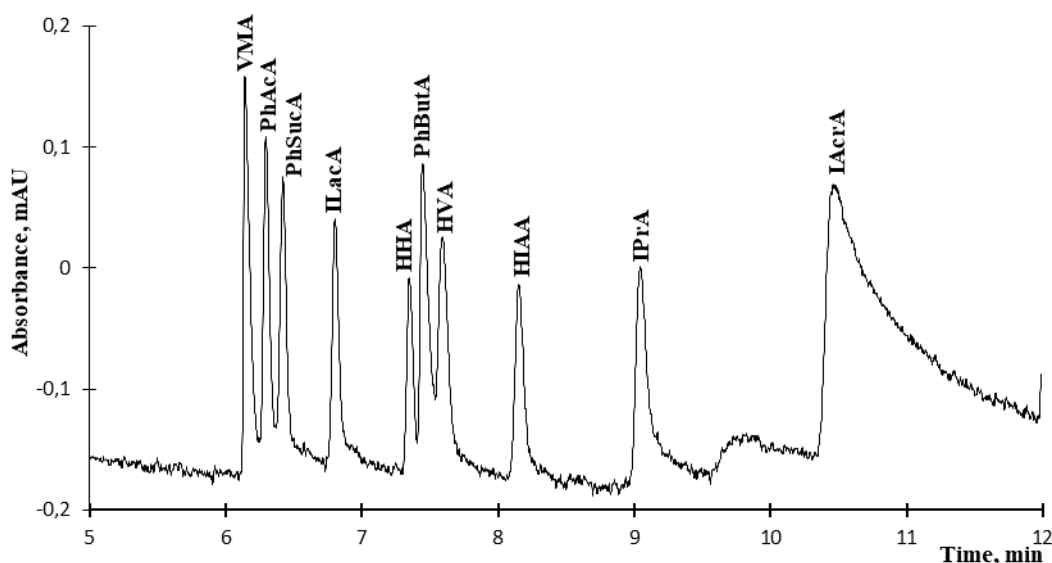


Рисунок 30. Электрофореграмма смеси фенил- и индолкарбоновых кислот на бутилимидазолиевом ковалентном покрытии.

Условия: 10 мМ NaH_2PO_4 (доведенный до pH 4.2 0.1 М HCl , ввод пробы: 2.0 с 30 мбар; -20 кВ; 220 нм. Стационарная фаза – ковалентное покрытие на основе бутилимидазолиевого катиона.

III.1.4 Концентрирование биогенных аминов на ковалентно модифицированных капиллярах

На всех трех типах ковалентных покрытий проведено концентрирование биогенных аминов в режиме стэкинга с большим объемом вводимой пробы. Более доступный в случае бутилимидазолиевого покрытия положительный заряд на поверхности капилляра приводит к более эффективному концентрированию; пределы обнаружения для октильных и циклодекстриновых покрытий оказались на порядок выше, чем в случае бутильных, что можно объяснить уменьшением вклада электростатического отталкивания от стенок капилляра с увеличением экранирования положительного заряда (таблица 11).

Таблица 11. Сравнение пределов обнаружения и факторов концентрирования биогенных аминов, полученных с применением внутрикапиллярного концентрирования в режиме стэкинга с большим объемом вводимой пробы на различных ковалентно связанных покрытиях.

	Бутилимидазолиевое		Октилимидазолиевое		Циклодекстринимидазоловое	
	SEF _h	ПО, нг/мл	SEF _h	ПО, нг/мл	SEF _h	ПО, нг/мл
DA	110	12	7	120	3	160
NA	140	11	4	230	5	170
NMN	120	14	8	150	5	170
A	120	17	8	170	6	240

Интересные результаты получены при введении мицеллообразующего агента ДДСН в состав ФЭ. За счет гидрофобных взаимодействий ДДСН сорбировался на поверхности модифицированного капилляра, что приводило к изменению её заряда на отрицательный. Генерировался катодный ЭОП при рН фонового электролита 2.0, что позволяло осуществить гибридный метод концентрирования – сочетание свипинга с электростэкингом и значительно снизить ПО (таблица 12). Краткая схема концентрирования представлена на рисунке 31. Сонаправленное движение аналитов и катодного ЭОП, генерируемого за счет образования бислоя молекулами ДДСН, позволило реализовать режим электростэкинга: большой объем пробы, растворенной в низкопроводящей матрице, вводился под напряжением в предварительно заполненный мицеллярным буфером капилляр. На границе с ФЭ аналиты взаимодействовали с полостью мицелл, что приводило к формированию ассоциатов и, как следствие, замедлению миграции аналитов и их концентрированию.

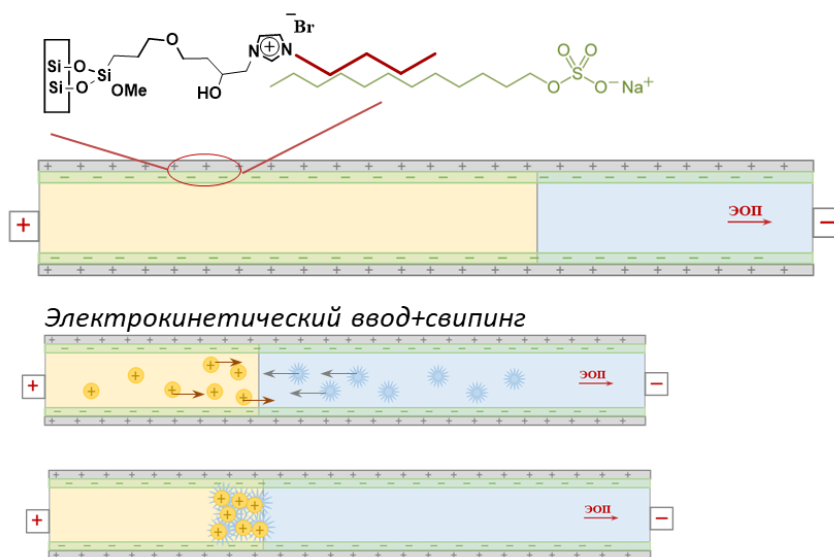


Рисунок 31. Схема гибридного концентрирования биогенных аминов (сочетание свипинга и электростэкинга)

Таблица 12. On-line концентрирование биогенных аминов на капиллярах, ковалентно модифицированных алкилимидазолиевой ионной жидкостью

Тип концентрирования	<i>N</i> -бутилимидазолиевое покрытие		<i>N</i> -октилимидазолиевое покрытие					
	Стэкинг с усилением поля	Свилинг+ электростэкинг	Стэкинг с усилением поля	Свилинг+ электростэкинг				
Ввод пробы	1500 мбар*с	750 КВ*с	1500 мбар*с	750 КВ*с				
Фоновый электролит	10 мМ NaH ₂ PO ₄ (рН 2.0)	10 мМ NaH ₂ PO ₄ (рН 2.0), 50 мМ ДДСН	10 мМ NaH ₂ PO ₄ (рН 2.0)	10 мМ NaH ₂ PO ₄ , (рН 2.0), 50 мМ ДДСН				
	SEF _h	ПО, нг/мл	SEF _h	ПО, нг/мл	SEF _h	ПО, нг/мл	SEF _h	ПО, нг/мл
DA	110	12	1030	2.1	7	120	3500	0.3
NA	140	11	1460	1.5	4	230	980	1.1
NMN	120	14	930	2.3	8	150	2200	0.5
A	135	17	1500	1.4	8	170	2600	0.6

Мицеллы ДДСН в составе фонового электролита выступали также и в качестве псевдостационарной фазы, что приводило к реализации режима мицеллярной электрокинетической хроматографии и изменению порядка миграции аналитов с увеличением эффективности и селективности разделения (рисунок 32).

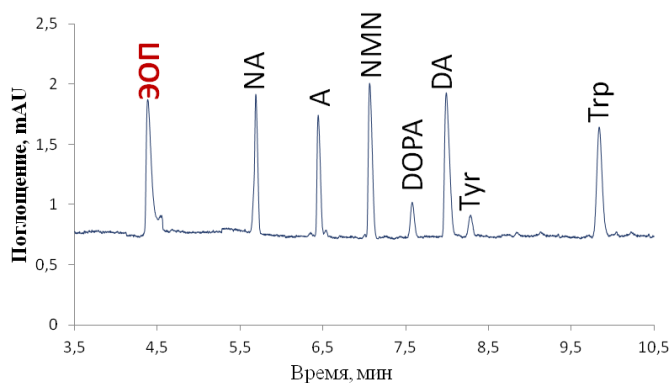


Рисунок 32. Электрофореграмма модельной смеси катехоламинов и аминокислот.

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 10 мМ раствор NaH₂PO₄, рН 2.0 (доведенный до требуемого значения рН 0.1 М раствором HCl) и 50 мМ ДДСН, -20кВ, 220 нм. Аналиты: NA – норадреналин, А – адреналин, NMN – норметанефрин, DA – дофамин, Tyr - тирозин, Trp – триптофан, DOPA – 3,4-дигидроксифенилаланин.

III.1.5 Электрофоретический анализ стероидных гормонов

Благодаря формированию положительного заряда на поверхности капилляра при функционализации покрытия ЦД возможно не только разделение гидрофильных биогенных аминов, но и реализация режима капиллярной электрохроматографии за счет формирования комплексов по типу «гость-хозяин». Из литературных данных известно, что ЦД вводят в фоновый электролит для разделения гидрофобных кортикостероидных гормонов, и следовательно, наличие β -ЦД в составе ковалентного покрытия могло бы обеспечить разделение этих аналитов благодаря их взаимодействию с гидрофобной полостью макроцикла. При этом в зонном режиме капиллярного электрофореза на алкилимидазолиевых покрытиях нейтральные стероидные гормоны элюируются вместе с анодным ЭОП без разделения (рисунок 33).

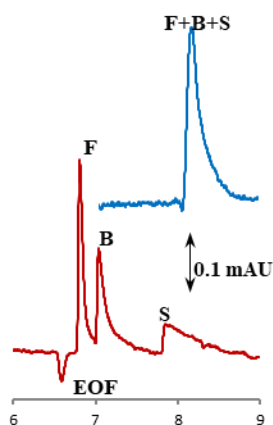


Рисунок 33. Электрофореграмма гидрофобных кортикостероидных гормонов на бутилимидазолиевом и циклодекстринимидазолиевом покрытии.

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 10 мМ раствор NaH_2PO_4 (доведенный до pH 2.0 0.1 М HCl, -20 кВ; 254 нм, модельная смесь стероидных гормонов (10 мкг/мл): **F**-кортизол, **S**- 11-дезоксикортизол, **B**- кортикостерон, ввод 5 с 30 мбар.

Удалось разделить три кортикостероидных гормона, при этом близкие по структуре кортизон и кортизол в этих условиях не разделялись и мигрировали вместе. В связи с этим испытаны различные подходы к увеличению селективности разделения этой пары аналитов: в фоновый электролит вводили различные добавки: β -ЦД, ГП- β -ЦД, β -ЦД-MImOTs, C_{16} MImCl и C_{12} MImCl в концентрациях, превышающих критическую концентрацию мицеллообразования, изменяли гидрофобно-гидрофильный баланс путем введения в ФЭ органических растворителей. Однако вместо ожидаемого эффекта наблюдали снижение селективности разделения (рисунок 34).

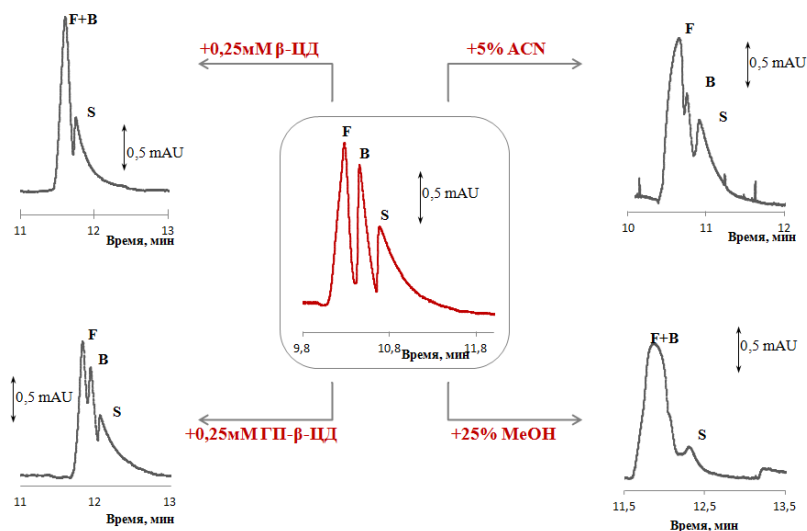


Рисунок 34. Влияние добавок в состав фонового электролита на селективность разделения стероидных гормонов.

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 10 мМ фосфатный буферный раствор (рН 2); кварцевый капилляр с покрытием на основе имидазола и β -ЦД (условия функционализации: $C_{T\beta\text{-ЦД}}=500$ мг/мл; 22 ч, 100 °С), -20 кВ, 254 нм; , модельная смесь стероидных гормонов (10 мкг/мл): F-кортизол, S-11-дезоксикортизол, В- кортикостерон, ввод 5 с 30 мбар.

Подобная ситуация объясняется следующим образом: добавки блокируют полости циклодекстринов, тем самым затрудняя доступ стероидных гормонов к макроциклам. При введении в фоновый электролит циклодекстринов такая блокировка может осуществляться за счет формирования их димеров с участием водородных связей между гидроксильными группами циклодекстринов в составе стационарной фазы и фонового электролита [183].

Однако примечательной особенностью таких покрытий является обнаруженная возможность совместного электрофоретического определения гидрофобных (стероидных гормонов) и гидрофильных аналитов (биогенных аминов и аминокислот) в одном аналитическом цикле (рисунок 35) с высокими значениями повторяемости миграционных характеристик (таблица 13)

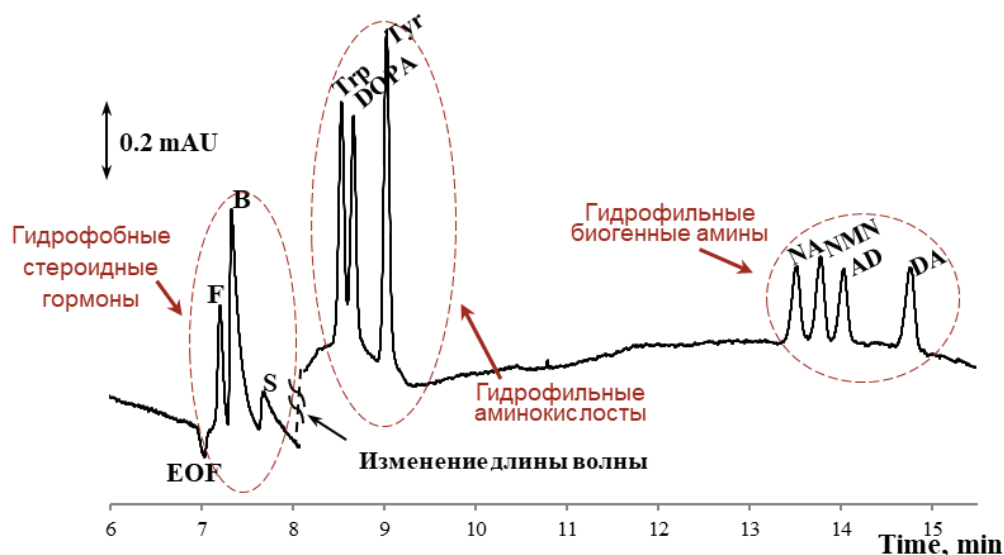


Рисунок 35. Электрофореграмма совместного определения гидрофобных кортикостероидных гормонов и гидрофильных биогенных аминов на ковалентно модифицированном капилляре, функционализированном β -ЦД [182].

Условия: 10 мМ раствор NaH_2PO_4 (доведенный до значения pH 2.0 0.1 М раствором HCl; ввод пробы: 2.0 с 30 мбар; -20 кВ; 254 нм (1-8 мин) и 220 нм (8-15 мин), 0 мбар (1-10 мин) и 40 мбар (10-15 мин).

Проба: модельная смесь стероидных гормонов (10 мкг/мл) F-кортизол, S-11-дезоксикортизол, B-кортикостерон, биогенных аминов и поглощающих аминокислот (25 мкг/мл); NA – норадреналин, DA – дофамин, NMN – норметанефрин, AD – адреналин, Trp – триптофан, Tyr – тирозин, DOPA – 3,4-дигидроксифенилаланин.

Таблица 13. Воспроизводимость миграционных характеристик кортикостероидных гормонов на циклодекстриномидазолиевом покрытии кварцевого капилляра.

	От капилляра к капилляру		От анализа к анализу	
	$\mu_e, 10^9 \text{ м}^2 \text{ В}^{-1} \text{ с}^{-1}$	RSD (%)	$\mu_e, 10^9 \text{ м}^2 \text{ В}^{-1} \text{ с}^{-1}$	RSD (%)
Кортизол (F)	-36.5 ± 2.0	5.4	-34.2 ± 0.5	1.5
Кортикостерон (B)	-35.7 ± 2.3	6.4	-32.5 ± 0.5	1.5
11-Дезоксикортизол (S)	-33.8 ± 2.3	6.8	-30.3 ± 0.2	0.7

III.1.6 Концентрирование стероидных гормонов

Как и в случае биогенных аминов, поиск приемлемых и эффективных вариантов внутрикапиллярного концентрирования стероидных гормонов потребовал специальной серии предварительных экспериментов. Режим стэкинга с большим объемом вводимой пробы оказался

малоэффективным: наблюдалось снижение селективности разделения, а введение добавок в состав ФЭ для реализации свипинга из-за блокировки полостей ЦД молекулами ПАВ так же приводило к снижению селективности разделения.

Требовался подход, который позволил бы сконцентрировать стероидные гормоны, не влияя на их взаимодействие с псевдостационарной фазой. Было высказано предположение, что введение псевдостационарной фазы в виде пробки до или после ввода образца могло бы обеспечить дополнительное взаимодействие с аналитами, способствуя концентрированию и не блокируя полости макроциклов в составе стационарной фазы.

Введение в фоновый электролит ЦТАБ, $C_{16}MImCl$, $C_{12}MImCl$ в концентрации выше ККМ не обеспечило требуемых характеристик электрофоретического разделения. Сохранить селективность разделения стероидных гормонов при увеличении объема ввода пробы удалось лишь в том случае, когда в виде пробки вводили положительно заряженный 3-Ме-1- β -CDImOTs (рисунок 36). Противонаправленная миграция такого соединения позволила сконцентрировать аналиты без блокировки полостей ЦД на поверхности капилляра.

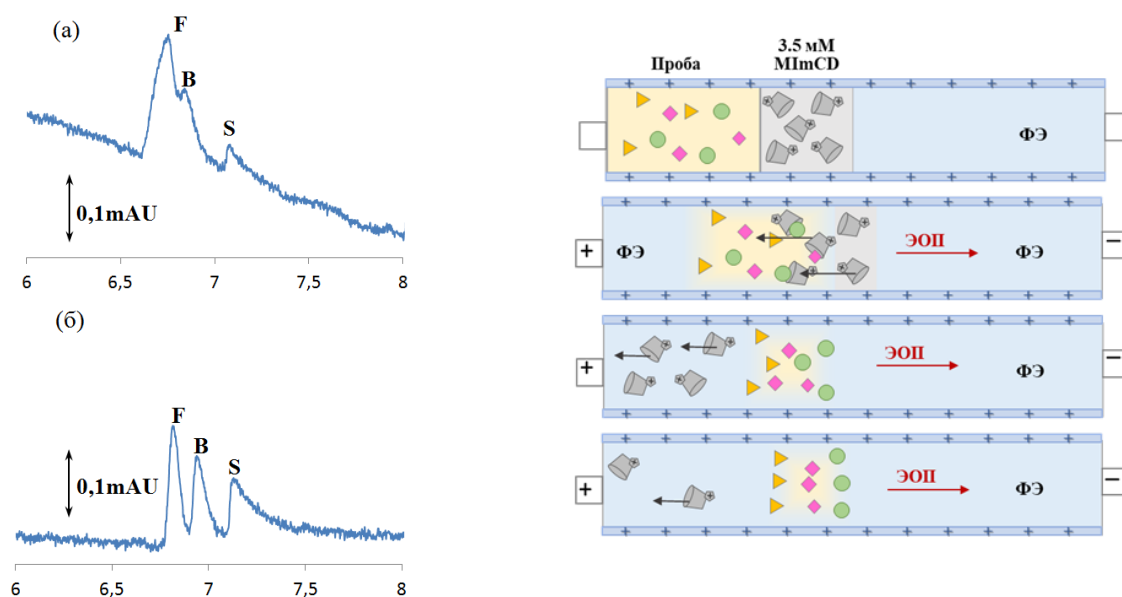


Рисунок 36. Электрофореграммы модельной смеси стероидных гормонов без (слева сверху) и с вводом (слева снизу) пробки для концентрирования; предполагаемая схема концентрирования стероидных гормонов с введением пробки псевдостационарной фазы (справа).

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 10 мМ фосфатный буферный раствор (pH 2) (а) + гидродинамический ввод пробки 3-Ме-1- β -CDImOTs (0.5 мг/мл) 5 с 30 мбар перед вводом определяемого образца; -20 кВ; 254 нм; ввод 10 с 30 мбар.

С целью увеличения факторов концентрирования варьировали время ввода пробки и концентрацию 3-Me-1- β -CDImOTs. Варьирование концентрации не оказало существенного влияния на контролируемые параметры, в то время как соотношение времени ввода стероидных гормонов и пробки повлияло на получаемые значения эффективности и селективности разделения. При вводе пробы стероидных гормонов (10 с 30 мбар и пробки 5с 30 мбар) удалось сконцентрировать стероиды всего лишь в 2-3 раза, а последующее увеличение времени ввода приводило к дестэкингу.

Наличие собственной электрофоретической подвижности модификатора, используемого для концентрирования, позволяет ввести его электрокинетически после ввода пробы (рисунок 37). При этом факторы концентрирования оказались ниже ожидаемых (SEF 2-10 при введении пробки 2 с 10 кВ), а пределы обнаружения составили 120-160 нг/мл.

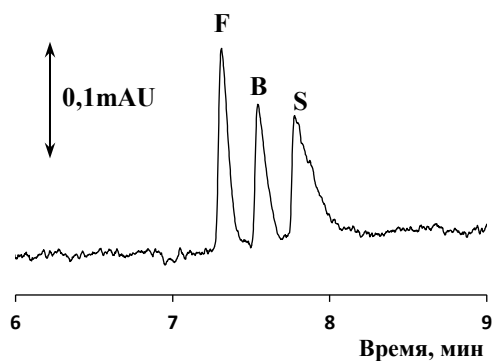


Рисунок 37. Электрофореграмма модельной смеси стероидных гормонов

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 10 мМ фосфатный буферный раствор (рН 2); электрокинетический ввод псевдостационарной фазы (0.5 мг/мл) после аналитов 2 с 10 кВ; -20 кВ, 254 нм. Модельная смесь стероидных гормонов 5 мкг/мл, 15 с 30 мбар.

III.1.7 Хиральное разделение кетопрофена на ковалентных покрытиях

В методах разделения и концентрирования при определении энантиомеров циклодекстрины могут выступать в качестве хиральных селекторов, однако в ходе предварительных экспериментов на ковалентно модифицированных капиллярах разделения энантиомеров не наблюдалось. Причина была, скорее всего, в недостаточном количестве активных центров для хирального разделения, что потребовало вернуться к этапу оптимизации стадии функционализации циклодекстрином. При варьировании условий синтеза ковалентных покрытий и увеличении количества ЦД на поверхности капилляра получали покрытия, обеспечившие разделение энантиомеров кетопрофена. Наряду с увеличением ионной силы ФЭ это приводило к повышению факторов разрешения энантиомеров кетопрофена с

энантиоселективностью 1.03 (рисунок 38). Для установления порядка их миграции проведен электрофоретический эксперимент с индивидуальным энантиомером известной конфигурацией (*S*-кетопрофен).

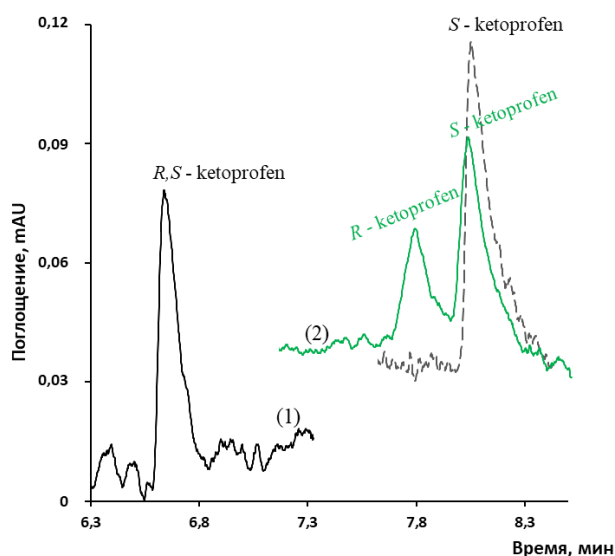


Рисунок 38. Электрофореграммы модельной смеси рацемата кетопрофена до (1) и после (2) оптимизации условий разделения (пунктирная линия – электрофореграмма *S*-кетопрофена для идентификации порядка миграции).

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 10мМ (а) и 20 мМ (б) ФБР (рН 2); -20 кВ; 254 нм; циклодекстринимидазолиевое покрытие (условия функционализации: $C_{Ts-\beta-ЦД}=750$ мг/мл; 22 ч, 100 °С), модельная смесь рацемата кетопрофена (25 мкг/мл), ввод пробы: 5 с*30 мбар.

Следует отметить, что использование высоких концентраций тозил- β -ЦД на этапе постфункционализации затруднено из-за большой вязкости раствора, поэтому дальнейшая оптимизация с увеличением концентрации функционализирующего агента не проводилась.

III.2 Модификаторы на основе имидазола и β -циклодекстрина в качестве псевдостационарных фаз при разделении гидрофобных аналитов

На капиллярах с ковалентно пришитой стационарной фазой на основе имидазола и β -ЦД с высокой селективностью в одном аналитическом цикле разделялись различные по полярности аналиты (кортикостероидные гормоны, аминокислоты и биогенные амины). Показано, что увеличение количества активных центров таких покрытий позволяет применять их и для хирального разделения лекарственных препаратов.

Интересным представлялось проверить возможности таких структур в качестве псевдостационарной фазы, где можно было бы легко контролировать количество модификатора,

а следовательно, и активных центров путем изменения его концентрации в составе фонового электролита.

С этой целью получены производные циклодекстрина, аналогичные по структуре ранее рассматриваемым ковалентным покрытиям - 1-Me-3- β -CDImOTs.

При выявлении возможности такого соединения способствовать формированию динамических покрытий было установлено, что введение в фоновый электролит ИЖ с объемным каркасным заместителем (1-Me-3- β -CDImOTs) не приводит к модификации стенок кварцевого капилляра с формированием положительно заряженных динамических покрытий и обращением ЭОП, несмотря на наличие положительного заряда в его структуре. Аналогичная картина наблюдается и для имидазольных ИЖ с небольшим алкильным радикалом, например, для C₄MImCl: факт сорбции модификатора на стенках капилляра подтверждается сравнением исходной скорости ЭОПа ($\mu_{\text{ЭОП}}=47.3 \times 10^{-9} \text{ м}^2 \text{ В}^{-1} \text{ с}^{-1}$) после активации стенок капилляра до введения модификатора в фоновый электролит со скоростью ЭОПа после его введения ($\mu_{\text{ЭОП}}=36.8 \times 10^{-9} \text{ м}^2 \text{ В}^{-1} \text{ с}^{-1}$) (рисунок 39). Длительная промывка капилляра 0.5 М раствором NaOH или 0.1 М раствором HCl не позволяет удалить адсорбированный модификатор, так что перед проведением электрофоретических экспериментов необходимо выполнить, как минимум, три холостых электрофоретических анализа для установления равновесия между модификатором в ФЭ и сорбированным на стенках капилляра.

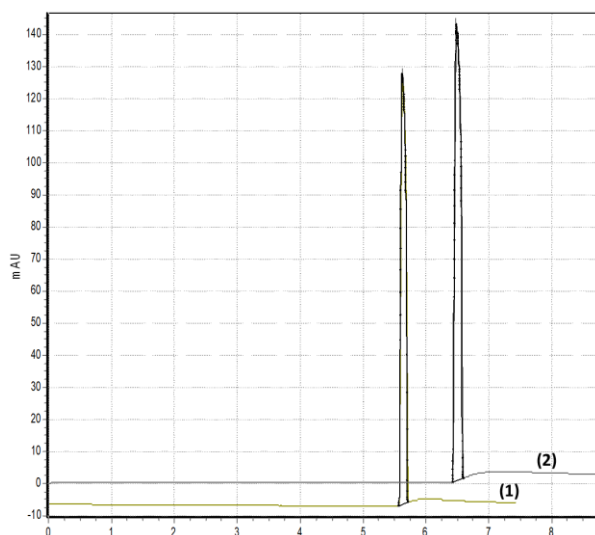


Рисунок 39. Электрофореграмма ЭОП до введения модификатора в ФЭ (1) и при добавлении положительно заряженного производного β -ЦД.

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 5 мМ ФБР (pH 6.4) 0 мМ (1) и 2мМ (2) 3-Me-1- β -CD-ImOTs, 20 кВ, 220 нм, маркер ЭОП – 3%-ный водный раствор ДМФА.

Определена собственная электрофоретическая подвижность синтезированного модификатора при pH 6.4 - $\mu_e = 10.5 \times 10^{-9} \text{ м}^2 \text{ В}^{-1} \text{ с}^{-1}$.

III.2.1 Разделение стероидных гормонов в режиме электрокинетической хроматографии

В структуре синтезированного 3-Me-1- β -CD-ImOTs имеются два функциональных центра: гидрофобная полость макроцикла и положительно заряженное имидазолиевое кольцо, что позволяет выполнить этому модификатору роль псевдостационарной фазы при электрофоретическом разделении незаряженных гидрофобных аналитов. В качестве модельных аналитов выбраны кортикостероидные гормоны. Ранее было доказано, что они образуют с полостью ЦД комплексы типа *гость-хозяин* [184].

Однако применение только незаряженного ЦД в качестве псевдостационарной фазы не обеспечивало разделения кортикостероидных гормонов: незаряженные макроциклы мигрируют вместе с ЭОП; их комплексы с этими аналитами не имеют электрофоретической подвижности [185]. Чаще всего в такие системы добавляют заряженные мицеллы, обеспечивающие различие в электрофоретических подвижностях определяемых компонентов [59]. За счет положительно заряженного имидазолиевого фрагмента нейтральные циклодекстрины приобретают собственную электрофоретическую подвижность: незаряженные аналиты, взаимодействуя с полостью ЦД, мигрируют как положительно заряженные ассоциаты по направлению к катоду.

Таким образом, при введении добавок в состав ФЭ изменение режима электрофоретического разделения может быть обусловлено сорбцией модификатора на стенках кварцевого капилляра и процессами комплексообразования между аналитами и модификатором, сорбированным на стенках капилляра и присутствующим в составе ФЭ (рисунок 40). При введении 3-Me-1- β -CD-ImOTs в фоновый электролит доминирующим процессом является именно формирование комплексов с модификатором в составе ФЭ, поскольку, как показано нами ранее, его сорбция на стенках капилляра крайне незначительна.

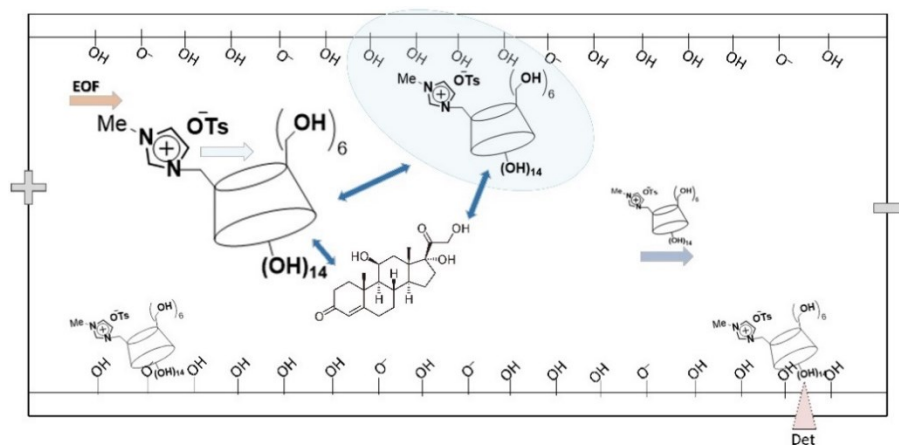


Рисунок 40. Схема трех предполагаемых механизмов, объясняющих процессы электрофоретического разделения стероидных гормонов при введении в фоновый электролит 3-Ме-1-β-CD-ImOTs.

Для разделения кортикостероидов потребовалось присутствие модификатора в составе ФЭ, а поиск условий разделения аналитов включал варьирование pH (2.0-8.0) и ионной силы (5-50 мМ) фонового электролита, а также концентрации 1-Ме-3-β-CDImOTs (0.1-2.25 мМ).

При введении модификатора в ФЭ даже в небольших концентрациях (0.25 мМ) удалось разделить 11-дезоксикортизол, кортикостерон, 21-гидроксипрогестерон, а кортизон и гидрокортизон (кортизол) мигрировали вместе. Увеличение концентрации модификатора не улучшило ситуацию (рисунок 41).

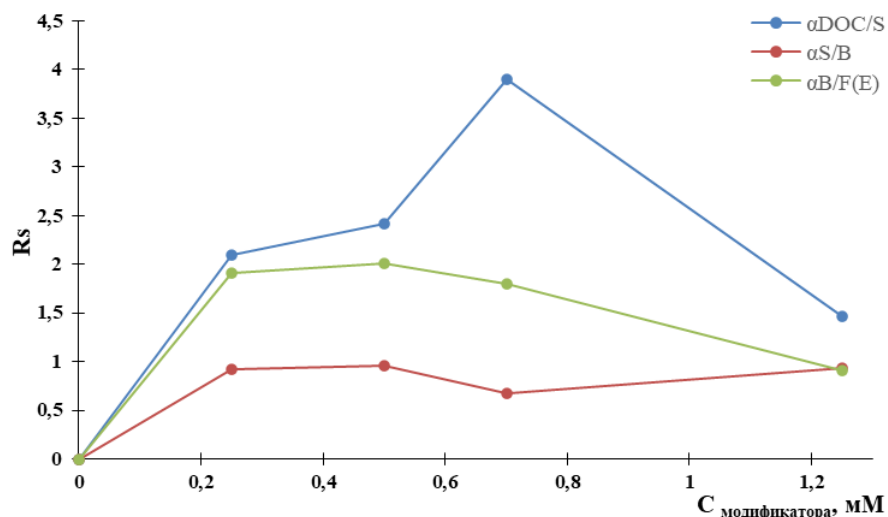


Рисунок 41 Изменение факторов разрешения при варьировании концентрации модификатора в составе ФЭ.

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 5 мМ ФБР (pH 3.2), 0-1.25 мМ 3-Ме-1-β-CD-ImOTs. Проба: модельная смесь кортикостероидных гормонов (10 мкг/мл): кортизон (E), гидрокортизон (F), 11-дезоксикортизол (S), кортикостерон (B), 21-гидроксипрогестерон (DOC), ввод пробы: 2 с 30 мбар; 20 кВ, 254 нм.

Варьирование значения рН фонового электролита (2.0; 2.8; 3.2; 3.8; 4.5; 6.4; 7.5; 8.0) влияло на скорость миграции аналитов и изменение эффективности: увеличение рН приводило к снижению эффективности, в то время как селективность разделения кортикостероидов возрастала. Тем не менее разделение близких по структуре кортизона и кортизола достигнуто не было. Рост эффективности при увеличении рН ФЭ обусловлен более быстрой миграцией аналитов за счет повышения скорости ЭОП. При этом обнаружено, что поглощение модификатора, обусловленное наличием имидазольного кольца, влияет на сигнал базовой линии: с возрастанием рН он увеличивается и затрудняет разделение аналитов (рисунок 42).

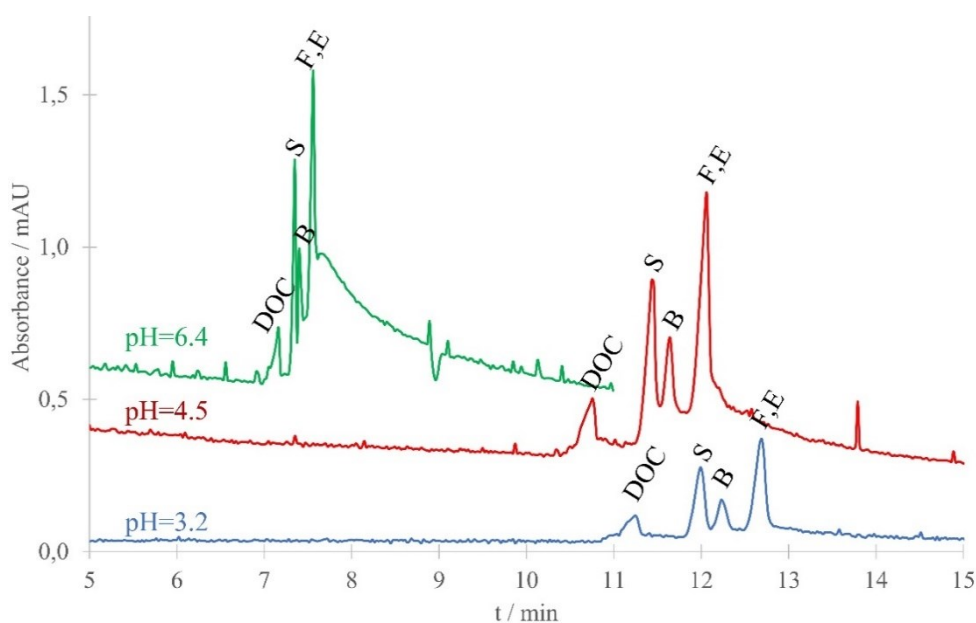


Рисунок 42. Электрофореграмма смеси кортикостероидных гормонов при разном значении рН ФЭ.

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 5 мМ ФБР (рН 3.2, 4.5 или 6.4), 0.7 мМ 3-Ме-1-β-CD-ImOTs. Проба: модельная смесь кортикостероидных гормонов (10 мкг/мл): кортизон (E), гидрокортизон (F), 11-дезоксикортизол (S), кортикостерон (B), 21-гидроксипрогестерон (DOC), ввод пробы: 2 с 30 мбар; 20 кВ, 254 нм.

Увеличение ионной силы (до 50 мМ), что могло бы уменьшить скорость ЭОПа и нивелировать обнаруженный эффект, не привело к ожидаемым результатам: повышение концентрации буфера приводило к заметному снижению разрешающей способности. Найдено приемлемое значение рН (3.2) и концентрации (5 мМ) фосфатного буферного раствора для достижения требуемой селективности разделения. Различия в константах комплексообразования и наличие собственной электрофоретической подвижности производного β-ЦД привели к

разделению четырех кортикостероидов в режиме электрокинетической хроматографии (рисунок 43) с введением 0.7 мМ модификатора в состав ФЭ.

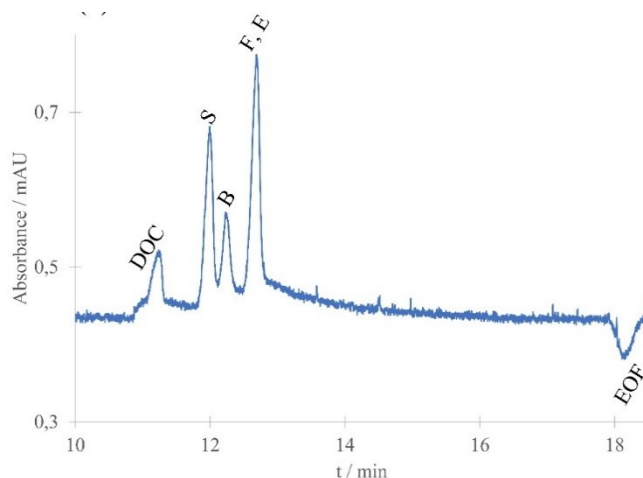


Рисунок 43. Разделение кортикостероидов при введении 1-Ме-3-β-CDImOTs в фоновый электролит.

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 5 мМ фосфатный буферный раствор (рН 3.2), 0.7 мМ 3-Ме-1-β-CD-ImOTs. Модельная смесь кортикостероидов (10 мкг/мл): кортизон (**E**), гидрокортизон (**F**), 11-дезоксикортизол (**S**), кортикостерон (**B**), 21-гидроксипрогестерон (**DOC**), ввод пробы 2 с 30 м бар; 20 кВ, 254 нм.

Варьирование рН и ионной силы буфера, а также концентрации модификатора в фоновом электролите оказалось недостаточным для разделения близких по структуре кортизона и гидрокортизона. Лишь изменение гидрофобно-гидрофильного баланса при добавлении органического растворителя в ФЭ повлияло на процесс комплексообразования и разделение этих стероидных гормонов. Исследовано влияние ацетонитрила и метанола на факторы разрешения кортикостероидов. При концентрации ацетонитрила 10 % (объемн.) разделение аналитов (в отличие от метанола) было достигнуто (рисунок 44).

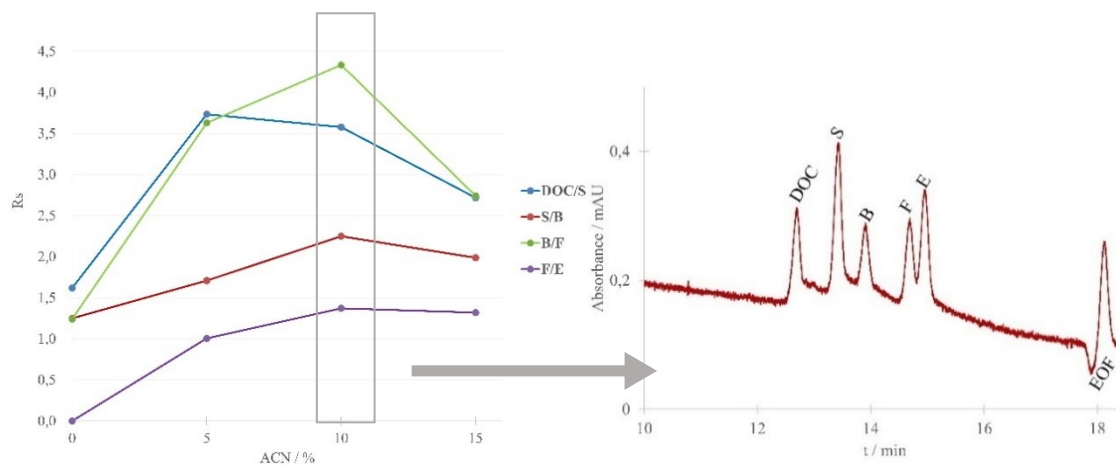


Рисунок 44. Исследование влияния ацетонитрила в составе фонового электролита на факторы разрешения (R_s) кортикостероидов (*слева*); электрофореграмма кортикостероидов с 3-Ме-1- β -CD-ImOT и 10 % (объемн.) ацетонитрила в составе ФЭ (*справа*).

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 5 мМ фосфатный буферный раствор, 0.7 мМ 3-Ме-1- β -CD-ImOT, 0-15 % ацетонитрила (объемн.). Модельная смесь кортикостероидов (10 мкг/мл): кортизон (E), гидрокортизон (F), 11-дезоксикортизол (S), кортикостерон (B), 21-гидроксипрогестерон (DOC); ввод пробы 2 с 30 мбар; 20 кВ, 254 нм.

Выявлены аналитические возможности моно-6-дезоксид-6-бутилимидазол- β -циклодекстрина тозилата (1-Bu-3- β -CDImOTs) при разделении стероидных гормонов. Обнаружены аналогичные закономерности, однако полное разделение кортикостероидов достигается при большей концентрации и ионной силы буферного раствора в случае 1-Bu-3- β -CDImOTs по сравнению со значениями, найденными для 3-Ме-1- β -CD-ImOTs в качестве псевдостационарной фазы. Время анализа в таких условиях увеличивается до 30 мин (рисунок 45).

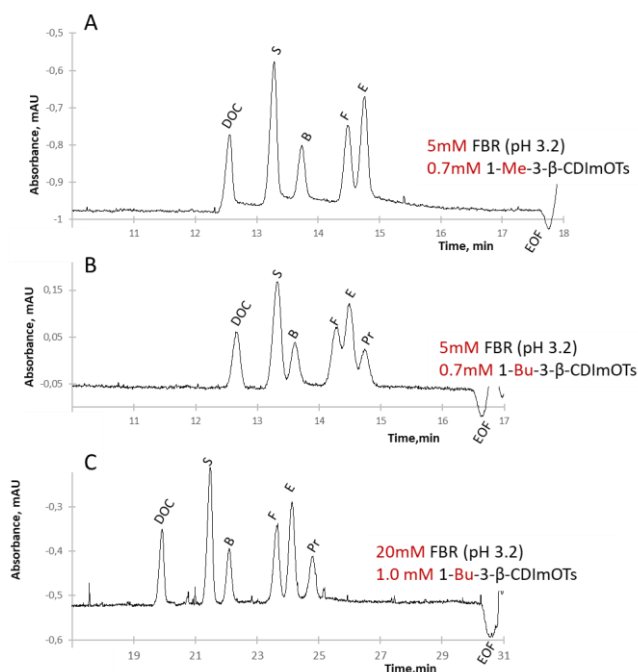


Рисунок 45. Электрофореграммы кортикостероидных гормонов, полученные при введении в фоновый электролит производных на основе имидазола и β -ЦД в качестве псевдостационарной фазы.

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 5 мМ (А, В) и 20мМ (С) фосфатный буферный раствор (рН 3.2), 0.7 мМ 3-Ме-1- β -CDImOTs (А) или 0.7 (В) и 1мМ (С) 1-Бу-3- β -CDIm, 10 (об.) % ACN, 20 кВ, 254 нм. Модельная смесь стероидных гормонов (10 мкг/мл): кортизон (Е), гидрокортизон (F), 11-дезоксикортизол (S), кортикостерон (B), 21-гидроксипрогестерон (DOC), ввод пробы 2 с 30 мбар.

Таким образом, для селективного разделения модельной смеси стероидных гормонов найдены условия: 5 мМ фосфатный буфер раствор (рН 3.2), 0.7 мМ 3-Ме-1- β -CD-ImOTs, 10 (об.) % ACN, напряжение 20 кВ, 254 нм. Значения ПО кортикостероидов, определенные как отношение сигнал/шум 3:1, в таких условиях составили 1.25–2.73 мкг/мл, что является слишком высоким для обнаружения этих аналитов в образцах плазмы. С целью снижения ПО изучены возможности различных методов внутрикапиллярного концентрирования.

III.2.2 Концентрирование стероидных гормонов

Применение такого варианта внутрикапиллярного концентрирования как стэкинг с усилением поля (FASS), основанного на различиях в проводимости раствора образца и фонового электролита, требует наличия собственной электрофоретической подвижности определяемых аналитов, которая отсутствует у стероидных гормонов. Однако возможность модификатора 3-Ме-1- β -CD-ImOTs образовывать комплексы включения с кортикостероидами позволяет не

только разделять последние, но и применить методы концентрирования, основанные на изменении электрофоретической подвижности заряженных ассоциатов «модификатор-кортикостероид». В этом случае в пробу добавляли 3-Ме-1-β-CD-ImOTs. Требуемая концентрация 3-Ме-1-β-CD-ImOTs в образце рассчитана в соответствии с концентрацией стероидов и предположением, что стероидные гормоны и циклодекстрин образуют комплексы в соотношении 1: 1. Исходный раствор стероидов (10 мкг/мл) готовили с добавлением 3-Ме-1-β-CD-ImOTs (0.15 мМ) в небольшом избытке. Наряду с реализацией FASS положительно заряженный ассоциат можно было электрокинетически ввести в капилляр для концентрирования в режиме электростэкинга (FASI) (рисунок 46).

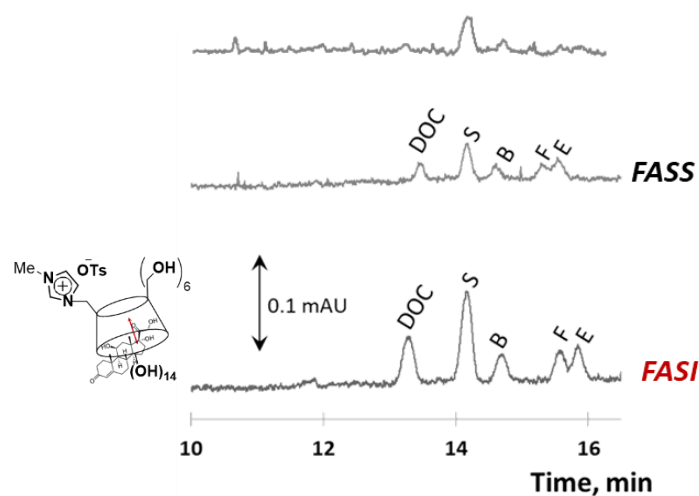


Рисунок 46. Электрофореграммы (сверху вниз), полученные без концентрирования, при гидродинамическом (FASS) и электрокинетическом (FASI) вводе ассоциатов кортикостероидных гормонов с 3-Ме-1-β-CD-ImOTs.

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 5 мМ фосфатный буферный раствор, 0.7 мМ 3-Ме-1-β-CD-ImOTs, 10 (объемн.) % ацетонитрила. Модельная смесь, содержащая пять стероидных гормонов (100 нг/мл): кортизон (E), гидрокортизон (F), 11-дезоксикортизол (S), кортикостерон (B), 21-гидроксипрогестерон (DOC); ввод образца – 2 с 30 мбар (без концентрирования), 50 с 30 мбар (FASS) или 50 с 20 кВ (FASI); 20 кВ, 254 нм.

В режиме электростэкинга удалось сконцентрировать стероидные гормоны в 16-25 раз. Результаты обобщены в таблице 14.

Таблица 14. Обобщение основных параметров, полученных в ходе двух вариантов концентрирования.

	FASS	FASI
Концентрация модельной смеси кортикостероидов, нг/мл	100	
Ввод пробы	900 мбар*с	1000 кВ*с
SEF	7-11	16-25
ПО, нг\мл	100-123	35-50

III.3 Разделение энантиомеров нестероидных противовоспалительных средств в режиме электрокинетической хроматографии

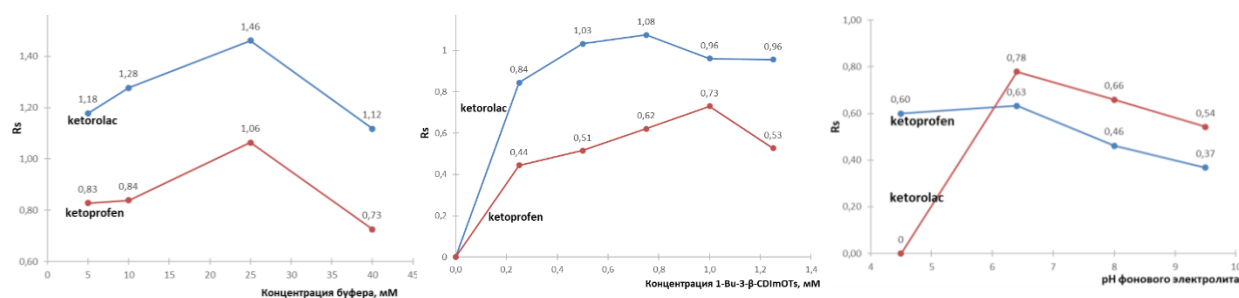
Наличие гидрофобной полости в ЦД позволяет им выступать и в качестве хирального селектора при разделении энантиомеров лекарственных средств, а наличие положительно заряженного имидазольного кольца в структуре селектора может обеспечить дополнительный вклад в эффективность и селективность разделения. В ходе тестовых экспериментов установлено, что обсуждаемый модификатор может быть использован для разделения НПВС (кетопрофена и кеторолака), но не для адrenoблокаторов. Причиной является основная природа последних. Изучение возможностей синтезированных производных β -ЦД в качестве хиральных селекторов проводили на примере модельной смеси рацематов кислотных нестероидных противовоспалительных средств – кетопрофена и кеторолака (структуры приведены в таблице 9).

III.3.1 Электрофоретическое разделение энантиомеров кетопрофена и кеторолака

Из-за отсутствия четких алгоритмов выбора условий разделения энантиомеров для определения наиболее значимых параметров потребовалась серия предварительных тестовых экспериментов, которая включала варьирование pH фонового электролита (2.0, 4.5, 7.5, 11.0), ионной силы буферного раствора (5, 10, 25, 50 мМ), концентрации хирального селектора 1-Bu-3- β -CDImOTs (0.25, 0.50, 1.00 мМ).

Наиболее значимыми параметрами оказались концентрация 1-Bu-3- β -CDImOTs и pH фонового электролита. Последний – влиял на аналитическую форму определяемых соединений. После серии предварительных экспериментов указанные параметры варьировали с более узким шагом для поиска оптимальных условий разделения. При pH фонового электролита, превышающим значения pKa аналитов (3.5-4.5), удалось достичь наибольших значений факторов разрешения. При дальнейшем увеличении pH (>6.5) скорость ЭОП заметно возросла, что

приводило к снижению селективности разделения НПВС. Зависимость факторов разрешения энантимеров от концентрации 1-Bu-3- β -CDImOTs также оказалась нелинейной (рисунок 47). Скорее всего потому, что избыток производных β -ЦД в составе фонового электролита способствовал формированию их комплексов между собой посредством водородных связей. При этом доступность полостей макроциклов снижалась, что вызвало и снижение селективности разделения энантимеров НПВС.



ФБР (5-40мМ), рН 6.4 + 1мМ 1-Bu-3- β -CDImOTs, 254нм, 20кВ

5мМ ФБР + 1-Bu-3- β -CDImOTs (0.25-1.25 мМ), 254нм, 20кВ

5мМ ФБР (рН 4.5 - 9.5) + 1мМ 1-Bu-3- β -CDImOTs, 254нм, 20кВ

Рисунок 47. Графические зависимости факторов энантиоселективности энантимеров кетопрофена и кеторолака от ионной силы фонового электролита, концентрации 1-Bu-3- β -CDImOTs и рН фонового электролита.

Таким образом, введение модификатора на основе β -ЦД и имидазола позволяет разделять энантимеры НПВС; наибольшие факторы энантиоселективности (1.46 и 1.06 для кеторолака и кетопрофена, соответственно) достигнуты при следующем составе фонового электролита: 25мМ фосфатный буферный раствор (рН 6.4), 1мМ 1-Bu-3- β -CDImOTs (рисунок 48) [186].

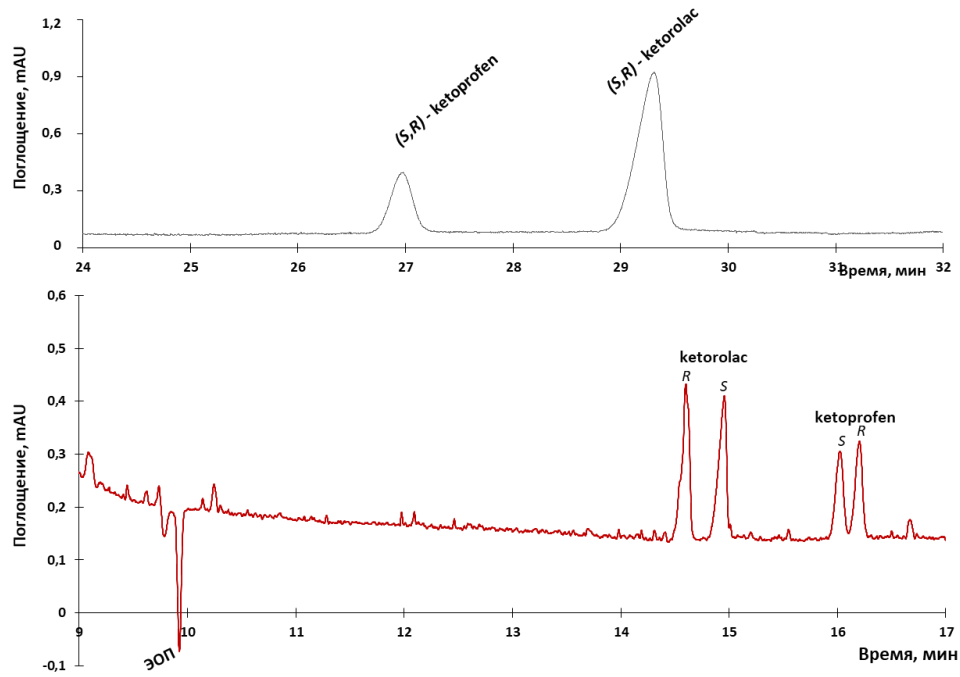


Рисунок 48. Электрофореграммы энантиомеров кетопрофена и кеторолака в отсутствии (сверху) и при наличии (снизу) 1-Bu-3-β-CDImOTs в составе ФЭ.

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 25мМ ФБР (рН 6.4), 0 мМ (А) и 1 мМ (В) 1-Bu-3-β-CDImOTs, 254нм, 20кВ; модельная смесь (*rac*-кетопрофен 10мкг/мл и *rac*-кеторолак 50 мкг\мл); ввод пробы 2 с 30 мбар;

При выявлении аналитических возможностей второго синтезированного положительно заряженного хирального селектора (1 мМ в ФЭ) также достигнуто разделение энантиомеров кетопрофена и кеторолака, при этом значения факторов энантиоселективности практически не отличались (рисунок 49). Из-за отсутствия существенных различий между двумя модификаторами последующие эксперименты выполняли с использованием 1-Bu-3-β-CDImOTs: значение его электрофоретической подвижности оказалось больше, что сокращает время анализа.

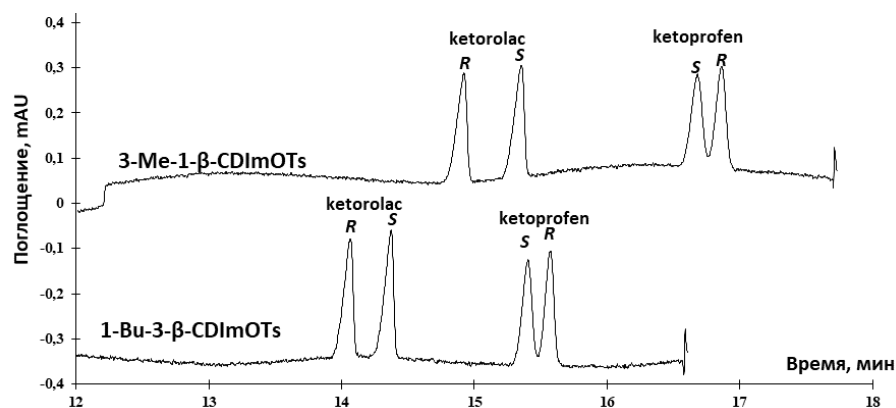


Рисунок 49. Электрофореграммы энантиомеров кетопрофена и кеторолака при введении 1-Bu-3-β-CDImOTs или 3-Me-1-β-CDImOTs в состав ФЭ.

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 25мМ ФБР (рН 6.4), 1 мМ 3-Me-1-β-CDImOTs или 1-Bu-3-β-CDImOTs, 254 нм, 20 кВ; модельная смесь (*rac*-кетопрофен 10 мкг/мл и *rac*-кеторолак 50 мкг/мл); ввод пробы 2 с 30 мбар.

Один из подходов увеличения селективности разделения близких по структуре аналитов, который часто используется и в области хирального КЭ, это – изменение гидрофобно-гидрофильного баланса путем введения органического растворителя в состав ФЭ. В случае разделения стероидных гормонов при введении ацетонитрила в ФЭ достигнуто разделение близких по структуре кортизона и гидроксикортизона, однако добавление органических растворителей при разделении энантиомеров кетопрофена и кеторолака не приводило к увеличению факторов энантиоселективности (рисунок 50).

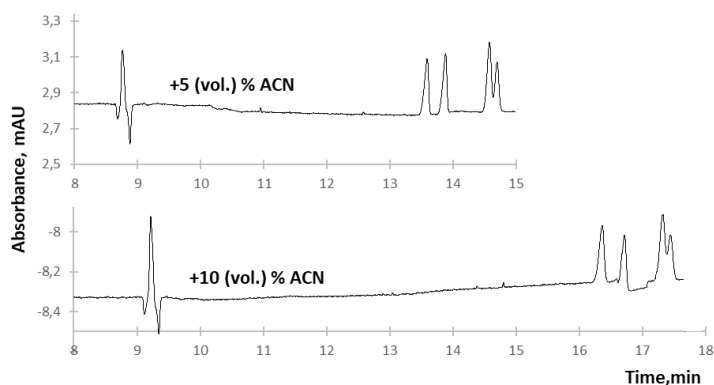


Рисунок 50. Электрофореграммы энантиомеров кетопрофена и кеторолака при введении ацетонитрила в состав фонового электролита.

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», модельная смесь (*rac*-кетопрофен 10мкг\мл и *rac*-кеторолак 50 мкг\мл); ввод пробы 2с 30мбар; 25мМ (рН 6.4), 1мМ 1-Bu-3-β-CDImOTs 5 или 10 (объемн.) % ACN, 254нм, 20кВ.

Проведена оценка влияния других органических растворителей, используемых для изменения гидрофобно-гидрофильного баланса на электрофоретическое разделение энантиомеров. Добавка метанола и этанола также не повлияла на селективность разделения, а более гидрофобные (пропан-2-ол и бутан-1-ол) – препятствовали процессу комплексообразования аналитов с полостями ЦД, сольватируя молекулы НПВС в ФЭ и снижая селективность разделения; в случае бутанола она приблизилась практически к нулю (рисунок 51).

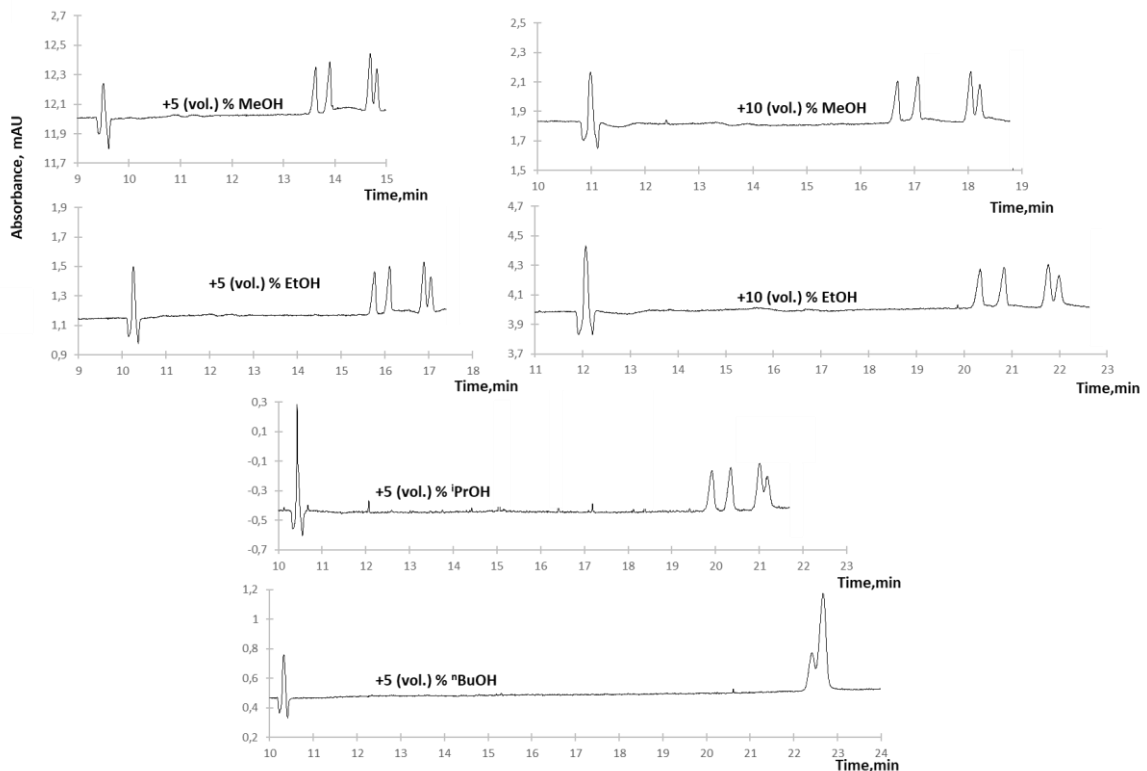


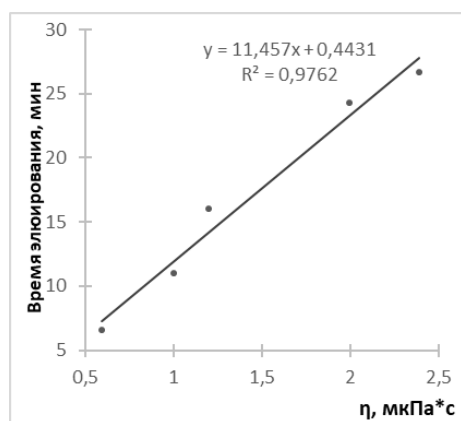
Рисунок 51. Электрофореграммы энантиомеров кетопрофена и кеторолака при введении низкомолекулярных спиртов в состав фонового электролита.

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 25мМ ФБР (рН 6.4), 1мМ 1-Bu-3-β-CDImOTs 5 или 10 (об.) % MeOH, EtOH, *i*-PrOH, *n*-BuOH (см. на рис.), 254нм, 20кВ. модельная смесь (*rac*-кетопрофен 10мкг/мл и *rac*-кеторолак 50 мкг/мл); ввод пробы 2 с 30 мбар;

III.3.2 Определение констант комплексообразования энантиомеров с синтезированным производным циклодекстрина

Для характеристики процесса комплексообразования индивидуальных энантиомеров с синтезированным производным ЦД рассчитаны константы комплексообразования согласно алгоритмам, предложенным в [178] с некоторыми изменениями в параметрах ввода и условий электрофоретического анализа. Расчет значений констант комплексообразования основан на

измерениях электрофоретических подвижностей энантиомеров при различных концентрациях модификатора в составе ФЭ. Однако при использовании в качестве модификаторов больших молекул, таких как циклодекстрины, изменение времен миграции может происходить из-за увеличения вязкости раствора. Для учета этого факта строили градуировочные зависимости времени элюирования аналитов от значений динамической вязкости при 20 °С растворителя, которым заполнен капилляр. В качестве растворителей известной динамической вязкости выступали вода, изопропиловый спирт, метанол, этиловый спирт и диметилсульфоксид. Измерение времени элюирования проводили следующим образом: капилляр заполняли одним растворителем под давлением 1000 мбар в течение 5 мин, после этого вводили маркер ЭОП (0.1%-ный водный раствор ДМФА, при 30 мбар в течение 2 с) и проводили анализ без применения напряжения при постоянном давлении 50 мбар. Для каждого растворителя процедуру повторяли трижды, далее строили зависимость времени элюирования от вязкости (рисунок 52).



Растворитель	Время элюирования ЭОП, мин	Вязкость при 20 °С, μПа*с	относительное смещение, %
MeOH	6.6	0.597	6
H ₂ O	11.0	1.002	7
EtOH	16,0	1.200	13
DMCO	24.3	1.996	4
iPrOH	26.7	2.390	5

Рисунок 52. Калибровочная кривая для определения вязкости растворов фоновых электролитов.

Затем аналогичное измерение времени элюирования проводили для всех растворов ФЭ с разной концентрацией ЦД при 20 °С. Однако значения времени элюирования мало отличались от значений, полученных при измерении воды, поэтому дальнейший пересчет – проводили методом пропорции относительно значений воды (таблица 15).

Таблица 15. Найденные значения вязкости фоновых электролитов при введении производного ЦД

Концентрация 1-Bu-3-β-CDImOTs в ФЭ	Время элюирования ЭОП, мин	динамическая вязкость при 20 °С, μПа*с
0.10 мМ	11.16	1.02±0.02
0.25 мМ	11.15	1.02±0.01
0.50 мМ	11.11	1.01±0.03
0.75 мМ	11.18	1.02±0.02
1.0 мМ	11.21	1.02±0.02
1.25 мМ	11.22	1.03±0.03
1.50 мМ	11.25	1.03±0.02

Полученные значения вязкости использовали для коррекции электрофоретических подвижностей энантиомеров (формула (3), таблица 16)

$$\mu^+ = \mu^{exp} \left(\frac{\eta_{exp}}{\eta_w} \right) \quad (3),$$

Где μ^+ – скорректированная подвижность,

μ_{exp} – наблюдаемая подвижность,

η_{exp} и η_w – вязкости ФЭ и воды, соответственно.

Таблица 16. Значения скорректированных электрофоретических подвижностей энантиомеров при разных концентрациях модификатора в составе фонового электролита.

C _{1-Bu-3-β-CDImOTs} , 10 ³ М	pC	скорректированная подвижность (μ ⁺), 10 ⁹ м ² *В ⁻¹ *с ⁻¹			
		R-кеторолак	S-кеторолак	S-кетопофен	R-кетопрофен
0.10	4.00	-16.21	-16.21	-16.32	-16.32
0.25	3.60	-13.58	-13.88	-14.37	-14.46
0.50	3.30	-11.23	-11.61	-12.51	-12.64
0.75	3.12	-9.77	-10.17	-11.25	-11.40
1.00	3.00	-8.59	-8.99	-10.17	-10.34
1.25	2.90	-7.75	-8.13	-9.31	-9.48
1.50	2.82	-7.76	-8.14	-9.32	-9.49
		Константы комплексообразования			
		2260±160	2070±150	1680±80	1620±80

В основе расчета констант комплексообразования лежит предположение, что стехиометрическое соотношение между аналитом и комплексообразователем соответствует 1:1. Для математической обработки вместо концентрации ЦД в составе ФЭ используют отрицательный логарифм концентрации (по аналогии с кислотно-основным равновесием ($pC = -\log[C_{1-Bu-3-β-CDImOTs}]$)). Получаемая нелинейная регрессия представляла собой зависимость

скорректированной подвижности от логарифма концентрации 1-Bu-3-β-CDImOTs. Значение pC в точка перегибе, получаемое при решении уравнения, равно логарифму константы комплексообразования (pK, красная линия на рисунке 53). Операцией, обратной логарифмированию, получали константы комплексообразования индивидуальных энантиомеров с используемым модификатором (таблица 16).

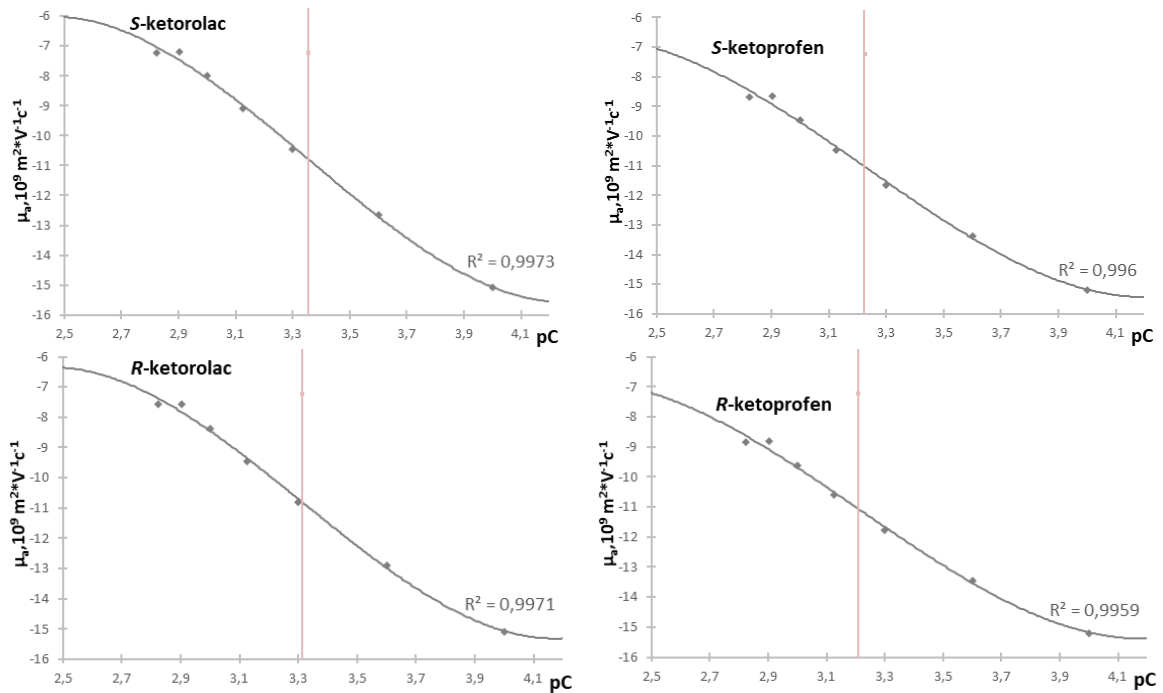


Рисунок 53. Зависимости скорректированных электрофоретических подвижностей индивидуальных энантиомеров кетопрофена и кеторолака при различных концентрациях 1-Bu-3-β-CDImOT, выраженных в виде обратного логарифма pC.

Высокие значения констант комплексообразования могут быть результатом дополнительных электростатических взаимодействий между положительно заряженным имидазолом в составе ЦД и отрицательно заряженным НПВС.

III.3.3 Двойные хиральные системы

Одна из малоизученных, но активно развивающихся областей в хиральном капиллярном электрофорезе – двойные хиральные системы, которые в ряде случаев позволяют значительно увеличить факторы энантиоселективности. Интересным представлялось проверить возможности синтезированного нами положительно заряженного хирального селектора – производного β-ЦД в таких системах. Наряду с 1-Bu-3-β-CDImOTs в качестве второго хирального селектора для двойных хиральных систем использовали, ряд различных по строению и свойствам соединений: β-ЦД, ГП-β-ЦД, сульфо-β-ЦД, декстран, амикацин, амоксициллин и ванкомицин.

Изучение совместного эффекта двух хиральных селекторов проводили с использованием модельной смеси кетопрофена и кеторолака. В тестовых экспериментах концентрации модификаторов в фоновом электролите выбирали таким образом, чтобы сопоставить три варианта: 1. Избыток 1-Bu-3- β -CDImOTs в фоновом электролите 2. Избыток второго хирального селектора в фоновом электролите; 3. Одинаковое мольное соотношение 1-Bu-3- β -CDImOTs и второго хирального селектора, т.е. концентрации двух модификаторов в приготовленных рабочих буферных растворах были в следующем соотношении (мольн.): 1:1.5 (или 1:2), 1:1, 2:1.

В первоначальных экспериментах по электрофоретическому разделению энантиомеров кетопрофена и кеторолака концентрация 1-Bu-3- β -CDImOTs составляла 1.0 мМ; именно ее взяли за основу, рассчитывая концентрацию второго хирального селектора, (соответственно, 0.5 мМ; 1.0 мМ и 1.5 мМ или 2.0 мМ, концентрация 1-Bu-3- β -CDImOTs оставалась постоянной - 1.0 мМ.

Прежде всего исследовали системы, где в качестве второго хирального селектора выступали *циклодекстрины*, поскольку комбинации из двух различных циклодекстринов наиболее распространены. В первую очередь, рассматривали 1-Bu-3- β -CDImOTs вместе с незаряженными ЦД (β -ЦД, ГП- β -ЦД и α -ЦД), противоположно заряженными производными ЦД (сульфо- β -ЦД). Независимо изучена система с высокомолекулярным олигосахаридом – декстраном (ММ~30-40 тыс.). Ожидаемого синергетического эффекта и увеличения факторов энантиоселективности выбранные двойные системы не проявили, а в случае β -ЦД и ГП- β -ЦД, наоборот, даже приводили к снижению селективности разделения (рисунок 54).

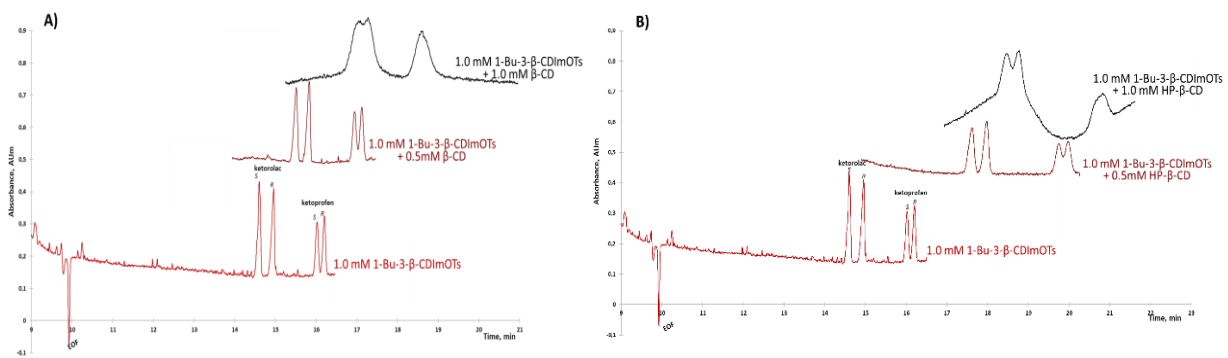


Рисунок 54. Электрофореграммы разделения энантиомеров НПВС с применением двойной хиральной системы с варьированием концентраций хиральных селекторов 1-Bu-3- β -CDImOTs + β -ЦД (А) и 1-Bu-3- β -CDImOTs + ГП- β -ЦД (В).

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 25мМ ФБР (рН 6.4), 1.0 мМ 1-Bu-3- β -CDImOTs и 0.5 мМ или 1.0 мМ β -ЦД (А) и ГП- β -ЦД (В), 254нм, 20кВ; модельная смесь (*rac*-кетопрофен 10 мкг/мл и *rac*-кеторолак 50 мкг/мл); ввод пробы 2 с 30 мбар.

Причиной могло быть образование димеров циклодекстринов и, как следствие, снижение доступности полостей для комплексообразования с энантиомерами НПВС. Уже при соотношении концентраций модификаторов 1:1 (мольн.) видно снижение селективности практически до 0. В системах с избытком β -ЦД или ГП- β -ЦД в ФЭ значительно увеличивалось время анализа, а селективность снижалась практически до нуля. Таким образом, в данном варианте двойных хиральных систем наблюдалась общая тенденция: снижение селективности разделения и эффективности при увеличении концентрации второго селектора.

Использование α -ЦД, декстрана и сульфо- β -ЦД не повлияло на факторы энантиоселективности, происходило лишь незначительное снижение значений факторов разрешения из-за снижения скорости ЭОПа (рисунок 55).

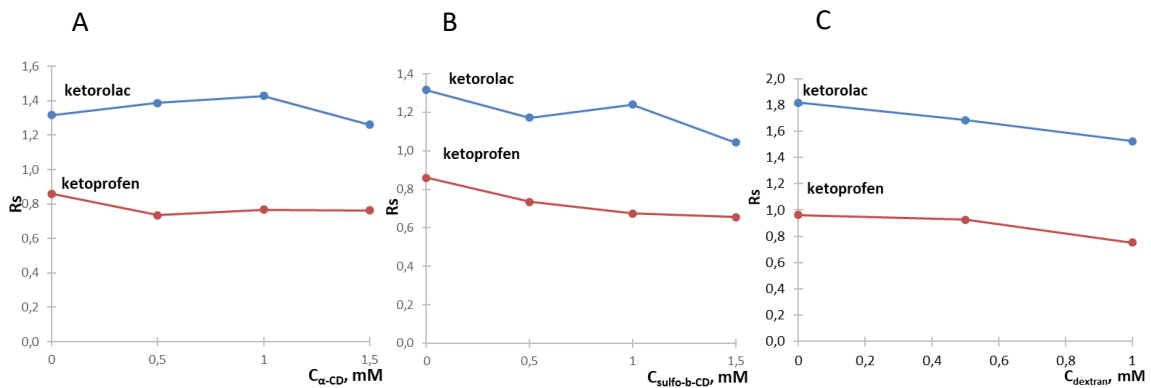
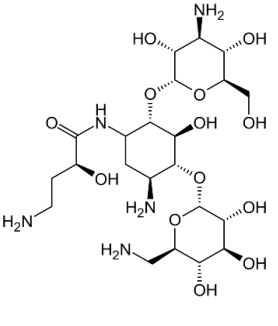
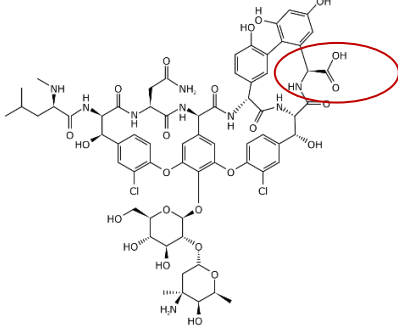
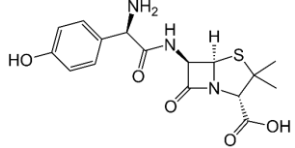


Рисунок 55. Изменение разрешения энантиомеров кетопрофена и кеторолака при добавлении в фоновый электролит в качестве второго хирального селектора α -ЦД (А), сульфо- β -ЦД (В) и декстрана (ММ=30-40 тыс.) (С).

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 25мМ ФБР (рН 6.4), 1.0 мМ 1-Bu-3- β -CDImOTs и 0.5 мМ или 1.0 мМ β -ЦД (А) и ГП- β -ЦД (В), 254 нм, 20 кВ; модельная смесь (гас-кетопрофен 10мкг/мл и гас-кеторолак 50 мкг/мл), ввод 2 с 30 мбар

Изучен и другой вариант двойных хиральных систем, где наряду с 1-Bu-3- β -CDImOTs были взяты *антибиотики*: ванкомицин, амоксициллин и амикацин (таблица 17). В тестовых экспериментах второй хиральный селектор также вводили в концентрациях 0.5мМ, 1.0мМ и 1.5мМ для выявления общей тенденции изменения факторов энантиоселективности.

Таблица 17. Антибиотики, выбранные в качестве второго хирального селектора и их кислотно-основные характеристики.

		
<p>Амикацин ($pK_a = 8.1$)</p>	<p>Ванкомицин ($pK_{a1} = 2.6$; $pK_{a2} = 7.2$; $pK_{a3} = 8.6$; $pK_{a4} = 9.6$; $pK_{a5} = 10.5$; $pK_{a6} = 1.7$)</p>	<p>Амоксициллин $pK_{a1} = 3.2$, $pK_{a2} = 7.4$</p>

В ходе предварительных экспериментов, где антибиотики вводили в фоновый электролит в концентрациях 0.5; 1.0 и 1.5 мМ дополнительно к 1мМ 1-Bu-3- β -CDImOTs, обнаружена интересная закономерность: использование ванкомицина в качестве второго хирального селектора приводит к нелинейному изменению факторов энантиоселективности кетопрофена. Наблюдается снижение значения этого параметра до нуля с последующим ростом. Было высказано предположение: два хиральных селектора оказывают конкурирующее взаимодействие, что может приводить к изменению порядка миграции энантиомеров кетопрофена

Для проверки данного предположения проведена специальная серия электрофоретических анализов с варьированием концентрации ванкомицина в ФЭ с меньшим шагом (0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.20 мМ), а для того, чтобы идентифицировать изменение порядка миграции энантиомеров, в анализируемую смесь НПВС вводили добавку *S*-кетопрофена в концентрации 2.5 мкг/мл (достаточной, чтобы различить два энантиомера по разной площади пиков) (рисунок 56).

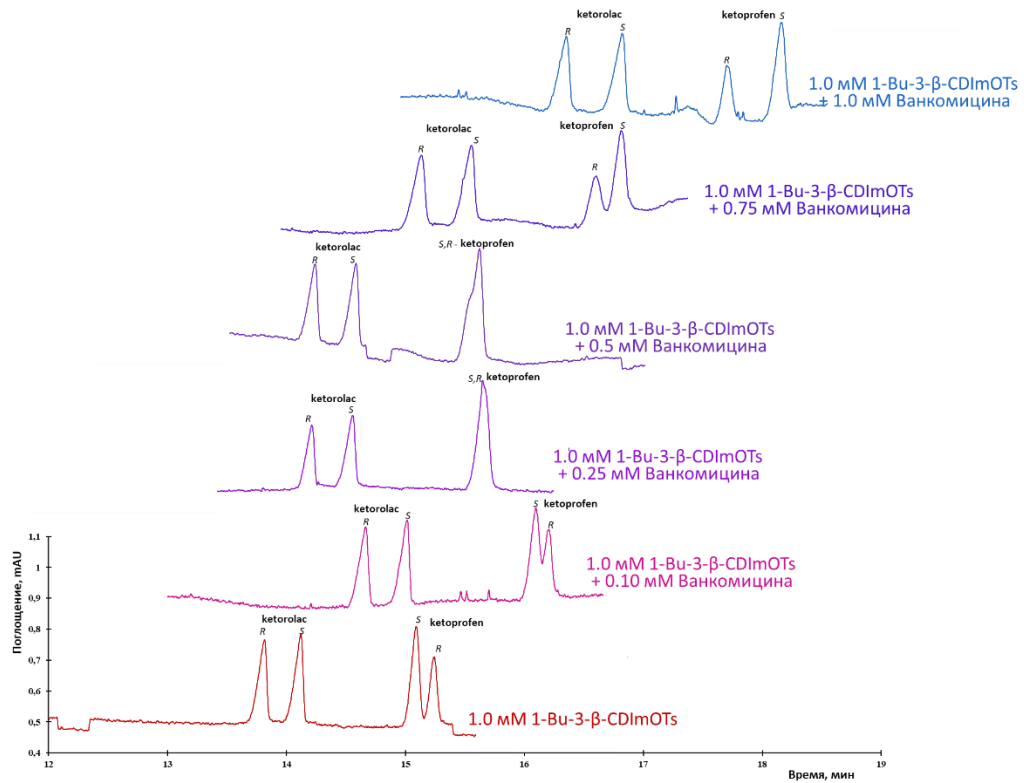


Рисунок 56. Электрофореграммы разделения энантиомеров НПВС при различном соотношении двух хиральных селекторов в фоновом электролите.

Условия: модельная смесь (*rac*-кетопрофен 10 мкг/мл + *S*-кетопрофен 2,5 мкг/мл и *rac*-кеторолак 50 мкг/мл), ввод 2 с 30 мбар; 25мМ фосфатный буферный раствор (рН 6.4), 1.0 мМ 1-Bu-3-β-CDImOTs и 0-1.0 мМ ванкомицина, 254 нм, 20 кВ.

При построении зависимости факторов энантиоселективности для кеторолака и кетопрофена от концентрации ванкомицина в составе ФЭ видно, что для кетопрофена наблюдается локальный минимум в области концентрации 0.25 мМ (рисунок 57А), где и происходит изменение порядка миграции энантиомеров кетопрофена, зафиксированное благодаря стандартной добавке *S*-кетопрофена (рисунок 57В).

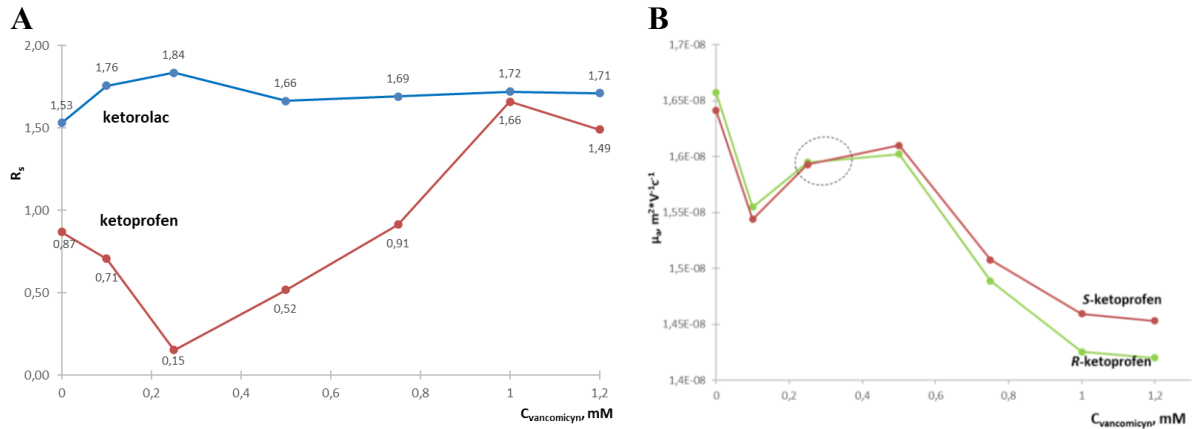


Рисунок 57. Графические зависимости факторов энантиоселективности кеторолака и кетопрофена (А) и наблюдаемой электрофоретической подвижности индивидуальных энантиомеров кетопрофена (В) от концентрации ванкомицина, введенного в фоновый электролит в качестве второго хирального селектора.

Условия: модельная смесь (*rac*-кетопрофен 10 мкг/мл + *S*-кетопрофен 2,5 мкг/мл и *rac*-кеторолак 50 мкг/мл), ввод 2с 30 мбар; 25 мМ фосфатный буферный раствор (рН 6.4), 1.0 мМ 1-Vu-3- β -CDImOTs и 0-1.0 мМ ванкомицина, 254 нм, 20 кВ.

Публикации, описывающие изменение порядка миграции энантиомеров при введении второго хирального селектора в состав фонового электролита, встречаются крайне редко, что затрудняет сравнительную интерпретацию результатов. С одной стороны, два хиральных селектора могут оказывать конкурирующее влияние, с другой – изменение порядка миграции в двойной хиральной системе (хиральная ИЖ и γ -ЦД) может объясняться образованием «нового хирального объекта» [113], который представляет собой комплекс между ЦД и хиральной ИЖ, что меняет механизм хирального распознавания в двойной системе.

При введении ванкомицина в качестве второго хирального селектора (концентрации обоих хиральных селекторов модификаторов 1 мМ, т.е. соотношение 1:1), факторы энантиоселективности кетопрофена увеличиваются до 1.66 с обращением миграции энантиомеров. Снижение концентрации модификаторов с сохранением их мольного соотношения (0.5 и 0.5 мМ) не позволяет сохранить такую же селективность разделения, что указывает на необходимость достаточного количества активных хиральных центров.

Аналогичная серия экспериментов проведена с двумя другими антибиотиками – амоксициллином и амикацином. Несмотря на то, что амоксициллин схож по кислотно-основным свойствам (рКа) с ванкомицином, ожидаемого изменения порядка миграции не произошло. Факторы энантиоселективности незначительно изменялись при введении амоксициллина в состав фонового электролита (рисунок 58).

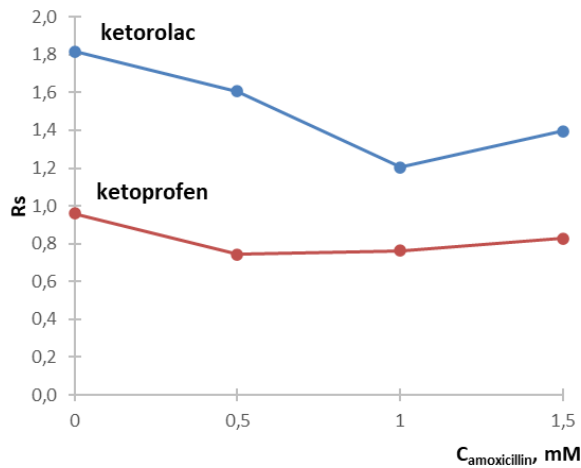


Рисунок 58. Изменение факторов разрешения энантимеров кетопрофена и кеторолака при добавлении в фоновый электролит в качестве второго хирального селектора антибиотика амоксицилина.

Условия: модельная смесь (*rac*-кетопрофен 10мкг/мл + *S*-кетопрофен 2,5 мкг/мл и *rac*-кеторолак 50 мкг/мл), ввод 2с 30мбар; 25мМ ФБР (рН 6.4), 1мМ 1-Bu-3-β-CDImOTs и 0-1.5 мМ амоксицилина, 254 нм, 20кВ.

С положительно заряженным при рН 6.4 амикацином наблюдали небольшой синергетический эффект в двойной хиральной системе и увеличение факторов энантиоселективности для обеих пар энантимеров НПВС при концентрации амикацина в ФЭ 0.5 мМ (рисунок 59), однако изменения порядка миграции энантимеров нами не зафиксировано.

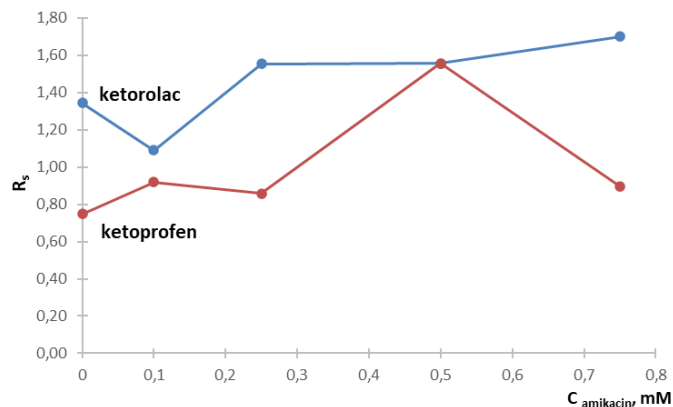


Рисунок 59. Графические зависимости факторов энантиоселективности кеторолака и кетопрофена при введении амикацина в ФЭ в качестве второго хирального селектора.

Условия: модельная смесь (*rac*-кетопрофен 10 мкг/мл + *S*-кетопрофен 2,5 мкг/мл и *rac*-кеторолак 50 мкг/мл), ввод 2с 30мбар; 25 мМ ФБР (рН 6.4), 1мМ 1-Bu-3-β-CDImOTs и 0-0.75 мМ амикацина, 254 нм, 20 кВ.

Из приведенной зависимости видно, что максимальные факторы энантиоселективности наблюдаются при соотношении двух хиральных селекторов 2:1 (мольн.), т.е. когда в состав ФЭ входит 1.0 мМ 1-Bu-3- β -CDImOTs, и 0.5 мМ амикацина.

Электрофореграмма разделенных энантиомеров в этих условиях приведена на рисунке 60.

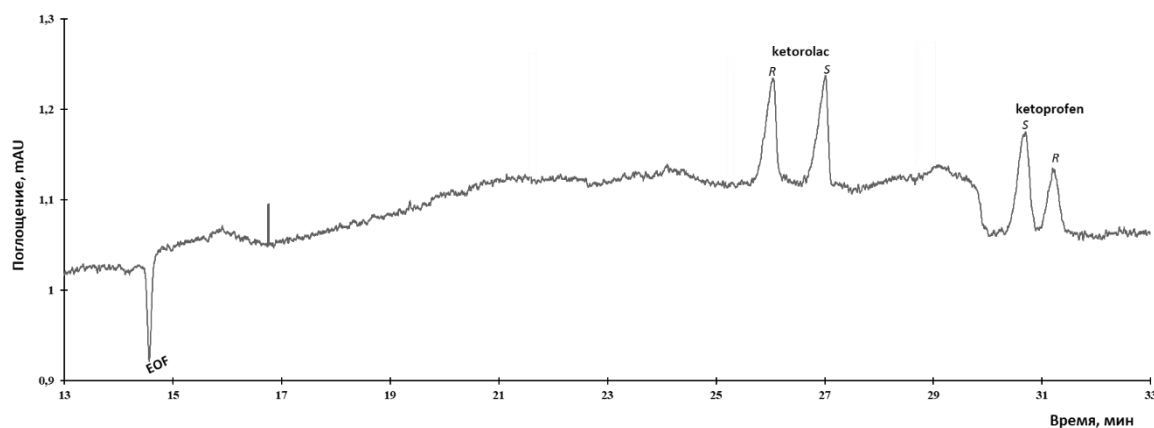


Рисунок 60. Электрофореграмма энантиомеров кетопрофена и кеторолака в двойной хиральной системе при введении в фоновый электролит амикацина.

Условия: модельная смесь (*rac*-кетопрофен 10мкг/мл + *S*-кетопрофен 2,5 мкг/мл и *rac*-кеторолак 50 мкг/мл), ввод 2с 30мбар; 25мМ ФБР (рН 6.4), 1мМ 1-Bu-3- β -CDImOTs и 0.5 мМ амикацина, 254нм, 20кВ.

Для выявления особенностей синтезированного хирального селектора на основе имидазола и β -ЦД выполнена серия сравнительных электрофоретических экспериментов, где в качестве хирального селектора выступали классические незаряженные циклодекстрины (β -ЦД и ГП- β -ЦД), ванкомицин; реализованы варианты и с двойными хиральными селекторами в виде сочетаний β -ЦД+ ванкомицин и ГП- β -ЦД+ванкомицин. Для корректного сопоставления с результатами, полученными в системах с 1-Bu-3- β -CDImOTs, выбрана такая же концентрация модификаторов – 1 мМ (рисунок 61).

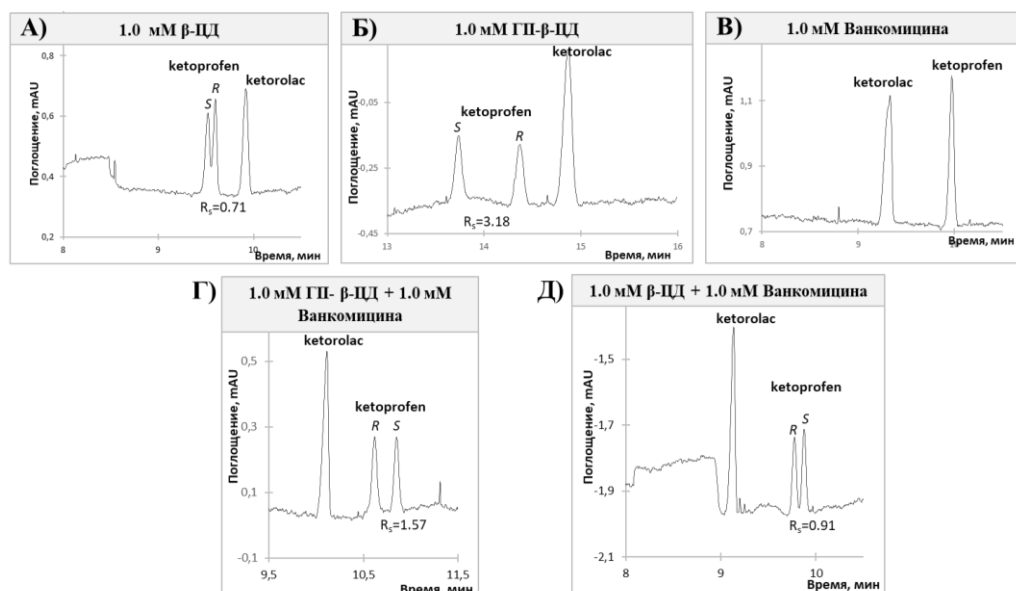


Рисунок 61. Электрофореграммы энантимеров кетопрофена и кеторолака при введении в фоновый электролит одного или двух хиральных селекторов.

Условия: модельная смесь (*rac*-кетопрофен 10мкг/мл и *rac*-кеторолак 50 мкг/мл), ввод 2с 30мбар; 25мМ ФБР (рН 6.4), 1мМ β-ЦД (А) или 1 мМ ГП-β-ЦД (Б), или 1 мМ ванкомицина (В), или 1 мМ β-ЦД+ 1 мМ ванкомицина (Г), или 1 мМ ГП-β-ЦД + 1 мМ ванкомицина (Д), 254нм, 20кВ.

Из полученных электрофореграмм видно, что незаряженные ЦД не позволяют разделить энантимеры кеторолака, в отличие от синтезированного положительно заряженного 1-Ви-3-β-CDImOTs. Следует отметить, что при тщательном изучении имеющихся публикаций нам не удалось найти исследований, посвященным электрофоретическому разделению энантимеров кеторолака с введением ЦД или их производных в состав ФЭ. В двойных хиральных системах наблюдается также обращение миграции энантимеров для кетопрофена.

III.3.4 Разделение и концентрирование индивидуальных энантимеров кетопрофена и кеторолака

Изучены возможности онлайн концентрирования индивидуальных энантимеров кетопрофена и кеторолака для последующего их определения в плазме крови. В области КЭ онлайн концентрирование индивидуальных энантимеров – малоизученная и сложная задача. Во-первых, при увеличении времени ввода пробы наблюдается перекрывание пиков. Во-вторых, механизмы онлайн концентрирования могут включать дополнительные взаимодействия (например, распределение между ФЭ и полостью мицелл в режиме свипинга), конкурирующие со взаимодействиями между аналитами и хиральными селекторами. Нарушение последнего приводит к снижению энантиоселективности.

В ходе проведения экспериментов выявлено ограничение для энантиомеров кетопрофена и кеторолака в применении такого эффективного метода концентрирования как свипинг. Исследовали два типа ПАВ (ДДСН и 1-додецил-3-метилимидазолия хлорид ($C_{12}MImCl$)) в концентрациях выше ККМ. После добавления ПАВ в фоновый электролит энантиоразделения не наблюдали (рисунок 62). Вероятнее всего, свипинг не подходит для концентрирования энантиомеров кетопрофена и кеторолака в таких условиях из-за конкуренции двух процессов: распределение аналитов между ФЭ и гидрофобным ядром мицелл и комплексообразованием аналитов с хиральным селектором (производным β -циклодекстрина). Кроме того, мицеллы могут блокировать гидрофобную полость хирального селектора, как и было в случае онлайн концентрирования на циклодекстринимидазолиевом ковалентном покрытии.

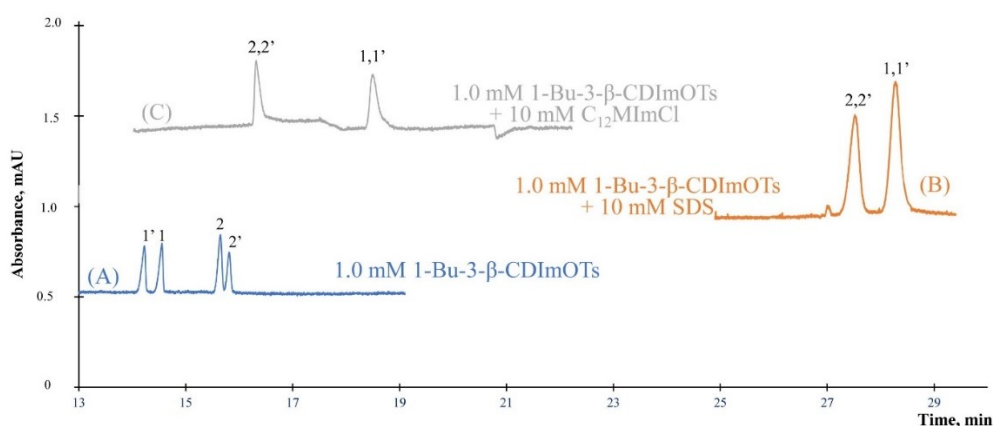


Рисунок 62. Электрофореграммы энантиомеров кеторолака и кетопрофена без концентрирования и при введении ПАВ в состав ФЭ для реализации свипинга.

Условия: 25 мМ ФБР (pH 6.4) + 1 мМ 1-Bu-3- β -CDIm + 10мМ ДДСН или $C_{12}MImCl$, 254 нм, ± 20 кВ; модельная смесь (*R,S*-кетопрофен 10 мкг/мл и *R,S*-кеторолак 50 мкг/мл); ввод 2 с 30 мбар. 1' – *R*-кеторолак, 1 – *S*-кеторолак, 2 – *S*-кетопрофен, 2' – *R*-кетопрофен.

В случае вариантов стэкинга с большим объемом вводимой пробы (LVSS) пики энантиомеров перекрывались, а при увеличении времени ввода пробы селективность разделения снижалась. В режиме стэкинга с усилением поля (FASS), где аналиты ускоряются в зоне образца, удалось сконцентрировать энантиомеры в 14-25 раз, однако дальнейшее увеличение объема ввода пробы приводило также к интерференции пиков (рисунок 63).

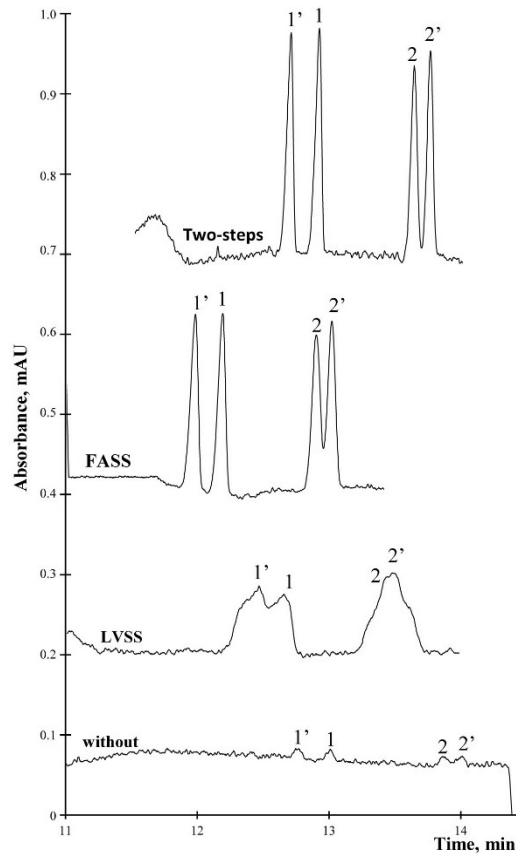


Рисунок 63. Электрофореграммы энантимеров кеторолака и кетопрофена (снизу вверх) без концентрирования и с концентрированием в режиме стэкинга с большим объемом ввода пробы (LVSS), стэкинга с усилением поля (FASS) и в режиме предложенного двухстадийного метода.

Условия: 25 мМ PBS (рН 6,4) + 1 мМ 1-Bu-3-β-CDIm, 254 нм, 20 кВ; модельная смесь (*R,S*-кетопрофен 0,5 мкг/мл и *R,S*-кеторолак 2,5 мкг/мл); ввод 40 с 30 мбар. 1' – *R*-кеторолак, 1 – *S*-кеторолак, 2 – *S*-кетопрофен, 2' – *R*-кетопрофен.

После выявления ограничений традиционных методов онлайн концентрирования был осуществлен поиск гибридных подходов. Нами разработан гибридный вариант онлайн концентрирования, основанный на изменении направления эффективной электрофоретической подвижности аналитов (за счет варьирования диссоциированной и недиссоциированной форм аналита) и свипинга в зоне образца. Предложенный вариант позволил сконцентрировать индивидуальные энантимеры в 290-390 раз, снизив ПО до 12-57 нг/мл (рисунок 63, верхняя электрофореграмма).

Предполагаемый механизм основан на изменении направления эффективной электрофоретической подвижности аналитов и аналогичен описанному в [187], где аналиты накапливались на границе между ФЭ с добавкой органического растворителя и раствора образца. Однако в [187] это изменение было вызвано разрушением мицелл из-за присутствия в ФЭ

органического растворителя, а в предлагаемом нами варианте изменение эффективной электрофоретической подвижности достигается при варьировании ионной формы аналита.

Таким образом, суть алгоритма внутрикапиллярного концентрирования в следующем: в заполненный фоновым электролитом (25мМ ФБР, рН 6.4 + 1 мМ 1-Bu-3-β-CD-ImOTs) капилляр последовательно гидродинамически вводили 10 мМ мицеллярный раствор ДДСН в виде короткой пробки (2-10 с 30 мбар) и модельную смесь энантиомеров кетопрофена и кеторолака (растворены в 25 мМ ФБР, рН 3.2; выбранные аналиты при данном рН находятся преимущественно в недиссоциированной форме) (рисунок 64, линия 1).

Нами предложен и механизм разработанного онлайн концентрирования энантиомеров. При наложении напряжения анионные мицеллы мигрируют в сторону анода через зону образца и концентрируют аналиты в узкую зону. На этом этапе скорость мицелл определяет электрофоретическую подвижность незаряженных энантиомеров (рисунок 64, линия 2). В то же время на границе между образцом (рН 3.2) и ФЭ (рН 6.4) под действием напряжения формируется градиент рН, аналиты, попадая в эту зону, диссоциируют и высвобождаются из мицелл (отрицательно заряженные аналиты имеют меньшее сродство к анионным мицеллам) (рисунок 64, линия 3). В это же время аналиты взаимодействуют с положительно заряженным производным β-ЦД в составе ФЭ, образуя комплексы-включения. Эффективные электрофоретические подвижности аналитов меняются с анодных на катодные, что приводит к дополнительному концентрированию. На последнем этапе происходит разделение сконцентрированных энантиомеров в режиме электрокинетической хроматографии (рисунок 64, строка 4).

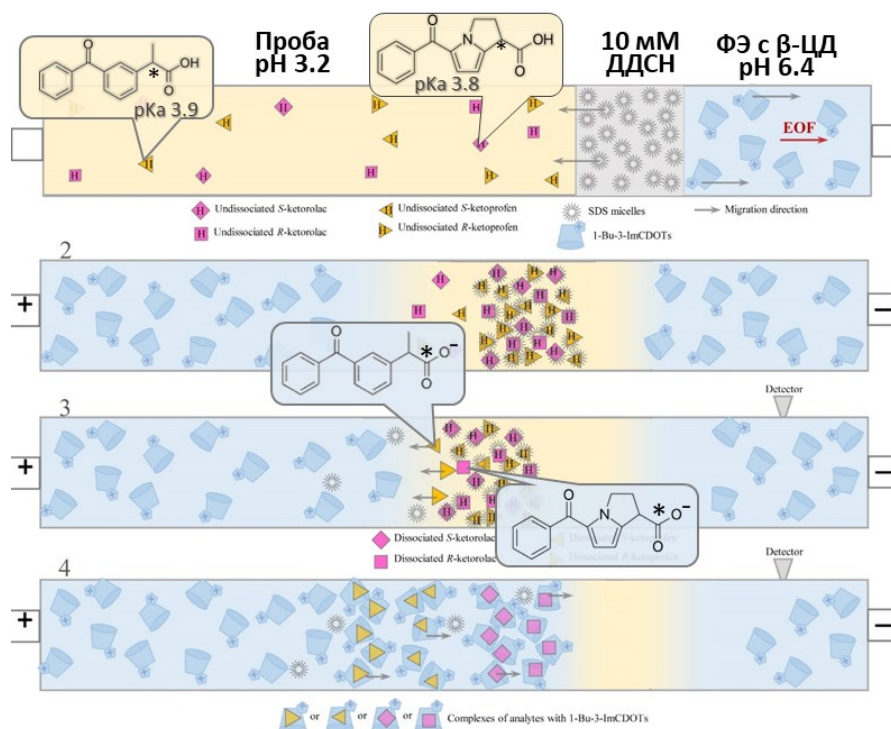


Рисунок 64. Предполагаемый механизм предложенного двухстадийного варианта онлайн концентрирования.

Достигнутые факторы концентрирования (*SEF*) и ПО при использовании различных вариантов онлайн концентрирования представлены в таблице 18.

Таблица 18. Условия, факторы концентрирования и достигнутые ПО для различных вариантов онлайн концентрирования.

	Без концентрирования		Стэкинг с усилением поля		Двухстадийный метод	
	<i>R,S</i> -кеторолак	<i>R,S</i> -кетопрофен	<i>R,S</i> -кеторолак	<i>R,S</i> -кетопрофен	<i>R,S</i> -кеторолак	<i>R,S</i> -кетопрофен
Проба	5 мкг/мл в 25 мМ NaH ₂ PO ₄ (pH 6.4)	1 мкг/мл	1.0 мкг/мл в 2.5 мМ NaH ₂ PO ₄ (pH 6.4)	0.20 мкг/мл	250 нг/мл в 25 мМ NaH ₂ PO ₄ (pH 3.2)	100 нг/мл
Ввод	2 с 30 мбар		40 с 30 мбар		60 с 30 мбар + 6 с 50 мбар 10 мМ ДДСН	
SEF	-	-	24-25	14-15	290-320	380-390
$N \times 10^{-3}$, т.т.	210-250	250-300	140-190	160-220	450-460	390-400
ПО (для индивидуальных энантиомеров)	2.13-2.15 мкг/мл	0.48-0.52 мкг/мл	300-320 нг/мл	110-130 нг/мл	45-57 нг/мл	11-12 нг/мл

III.4 Апробация разработанных подходов при анализе реальных объектов

III.4.1 Определение биогенных аминов в образцах мочи с использованием ковалентных покрытий

На алкилимидазолиевых ковалентных покрытия с применением гибридного внутрикапиллярного метода концентрирования (электростэкинг + свипинг) достигнутые ПО биогенных аминов позволяют анализировать образцы мочи без предварительного (оффлайн) концентрирования. Однако матричное влияние присутствующих в биологической жидкости компонентов (креатинин, мочевины, пигменты) в достаточно высоких концентрациях (мкг/мл) затрудняет определение аналитов, поэтому предварительно выполнялась пробоподготовка с сорбционным концентрированием биогенных аминов на активированном оксиде алюминия с последующим электрофоретическим анализом в найденных условиях (рисунок 65).

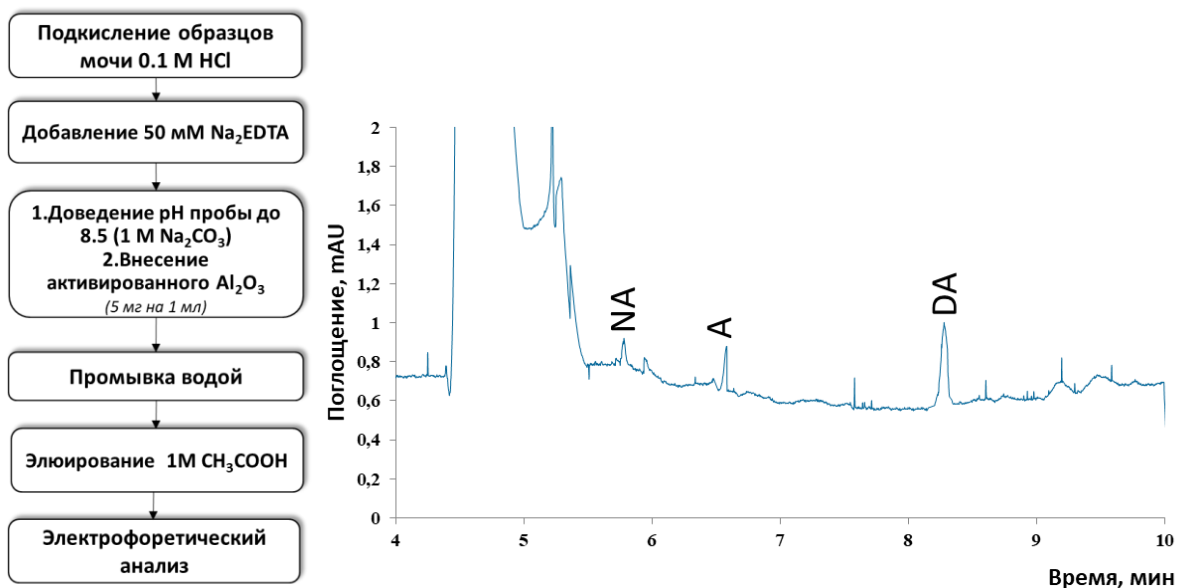


Рисунок 65. Краткая схема пробоподготовки образцов мочи для определения биогенных аминов (слева) и электрофореграмма биогенных аминов в образцах мочи (справа).

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 10 мМ NaH₂PO₄ (доведенный до требуемого значения pH 1 М раствором HCl) и 50 мМ ДДСН; -20кВ, 220нм, ввод пробы 50 с 50 мб.

Для количественного определения содержания биогенных аминов в образцах мочи построены градуировочные зависимости с концентрацией индивидуальных аналитов в диапазоне 10-100 нг/мл (рисунок 66).

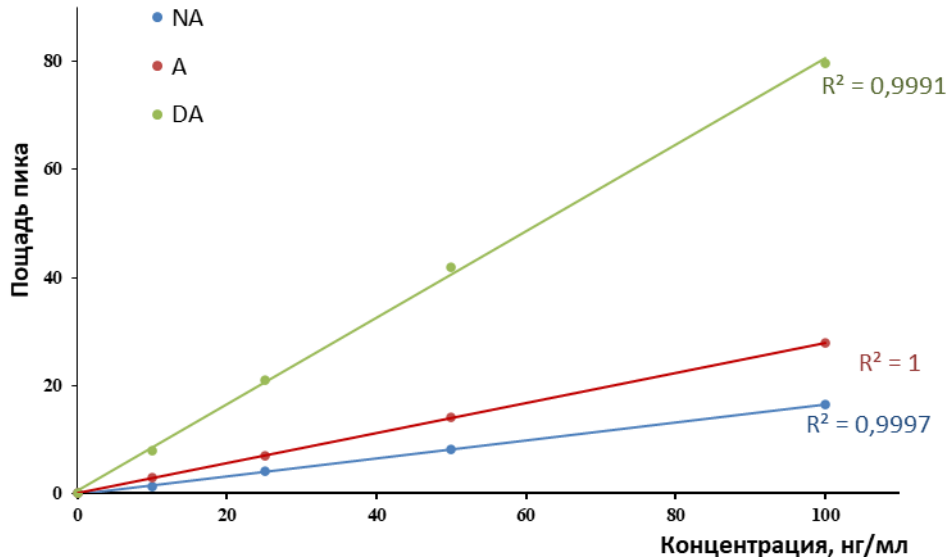


Рисунок 66. Градуировочные зависимости для определения содержания биогенных аминов в образцах мочи.

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 10 мМ NaH_2PO_4 (доведенный до требуемого значения pH 1 М раствором HCl) и 50 мМ ДДСН; -20кВ, 220нм, ввод пробы 50с 50мб.

Найденные концентрации биогенных аминов представлены в таблице 19.

Таблица 19. Концентрации катехоламинов в образцах мочи.

Биогенные амины	Концентрация, нг/мл
NA	15 ± 4
A	29 ± 4
DA	62 ± 8

III.4.2 Определение стероидных гормонов в плазме крови человека

Чтобы продемонстрировать применимость предложенного подхода электрофоретического определения кортикостероидных гормонов с использованием 3-Me-1- β -CD-ImOTs, содержание пяти стероидных гормонов контролировали в плазме крови человека. Предварительно кортикостероиды извлекали из образцов плазмы методом жидкостно-жидкостной экстракции с концентрированием в 5 раз: 10 мкл внутреннего стандарта (преднизолон) добавляли к 1.0 мл плазмы; затем добавляли хлороформ (5.0 мл), тщательно перемешивали и центрифугировали; нижний органический слой промывали 0.5 мл 0.10 М раствором NaOH (дважды) и 1.0 мл H_2O . От остатков воды избавлялись путем добавления сульфата натрия, после чего хлороформ упаривали досуха, а остаток растворяли в 200 мкл воды

с добавлением 0.05 мМ 3-Ме-1-β-CD-ImOT и анализировали методом КЭ в предложенных условиях.

Определение содержания кортизона и гидрокортизона проводили методом внутреннего стандарта (в качестве внутреннего стандарта – преднизолон ацетат (Pr)). Обнаружено: кортизона и гидрокортизона в плазме – 9.20 ± 0.5 и 192.8 ± 0.7 нг/мл соответственно (рисунок 67). Остальные стероидные гормоны находились в концентрациях ниже ПО, как и полагается в вариантах *нормы*.

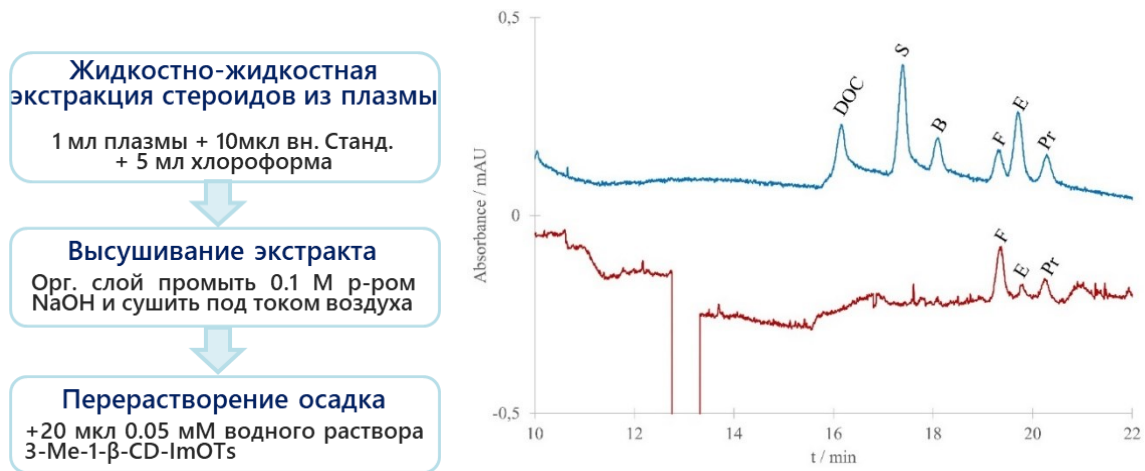


Рисунок 67. Схема пробоподготовки образцов плазмы для определения кортикостероидных гормонов (слева) и электрофореграммы смеси стандартов стероидов (100 нг/мл) в фосфатно-солевом буферном растворе (справа сверху) и в плазме (справа снизу).

Условия: 5 мМ фосфатный буферный раствор, 0.7 мМ 3-Ме-1-β-CD-ImOTs, 10 (объемн.) % ACN. Ввод пробы - 60 с 20 кВ; напряжение 20 кВ, длина волны 254 нм.

III.4.3 Определение энантиомеров кеторолака в плазме крови человека

Для анализа индивидуальных энантиомеров кеторолака в плазме крови человека определена линейность в диапазоне концентраций 0.25-2.5 мкг/мл, пределы обнаружения, пределы количественного определения, а также прецизионность (таблица 20) согласно рекомендациям Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration)¹.

¹ Номер документа ORA-LAB.5.4.5

Таблица 20. Параметры валидации для индивидуальных энантиомеров кеторолака при использовании двухстадийного метода онлайн концентрирования.

	Анализ плазмы крови человека (с двухстадийным онлайн концентрированием)	
	<i>R</i> -кеторолак	<i>S</i> - кеторолак
Диапазон концентраций (мкг/мл)	0.25-2.50	0.25-2.50
Коэффициент детерминации (R^2)	0.9905	0.9921
ПО (мкг/мл)	0.04	0.06
НПКО (мкг/мл, относительная погрешность 20%)	0.170	0.190
Повторяемость (n=5), %RSD	5-8	5-8
Внутрилабораторная прецизионность (n=10), %RSD	7-13	7-13
Относительное смещение (n=5), %	10	10

Предложенный подход апробирован при анализе энантиомеров кеторолака в плазме крови человека через 45 мин после приема таблетки «Кеторол экспресс», представляющей собой рацемат (рисунок 68А). После пробоподготовки, которая заключалась в осаждении белков, электрофоретический анализ супернатанта проводили в найденных условиях с применением предложенного двухстадийного метода онлайн концентрирования. Для снижения влияния высокосолевого матрицы проба разбавлялась в два раза, а концентрация ДДСН в мицеллярной пробке была увеличена до 20 мМ (ввод 15 с 50 мбар) с целью сохранения достигнутых факторов концентрирования. Для определения концентраций использовали метод абсолютной градуировки. Найденные значения – 610-660 нг/мл для *R*-энантиомера и 280-380 нг/мл для *S* энантиомера кеторолака (рисунок 68В).

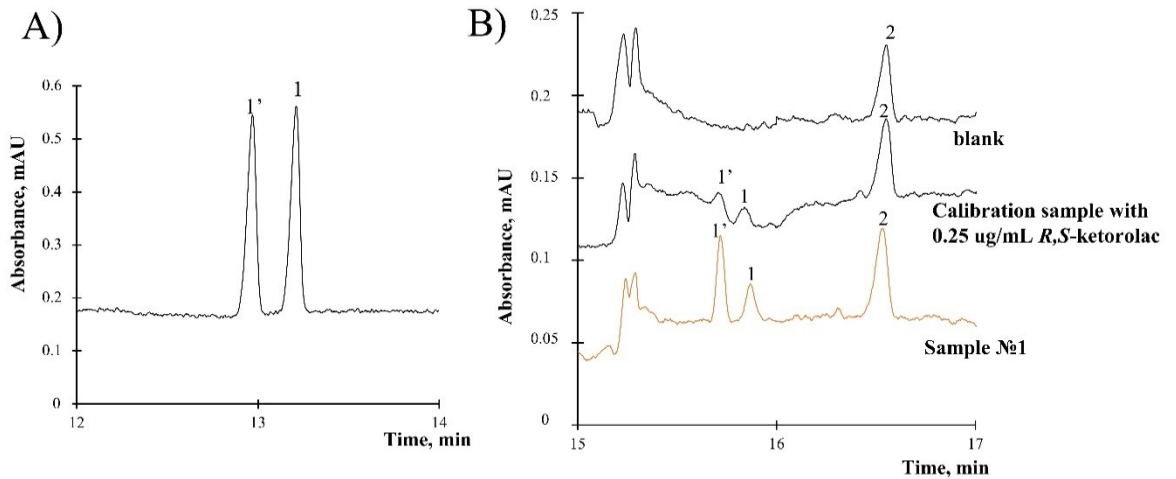


Рисунок 68. Электрофореграммы раствора таблетки «Кеторол экспресс» (А) и электрофореграммы (сверху вниз) образца плазмы, калибровочного образца (1 мкг/мл) *R,S*-кеторолака и образца плазмы через 45 мин после приема «Кеторол экспресс» (В).

Условия: 25 мМ PBS, pH 6,4, 1 мМ 1-Bu-3-β-CD-ImOTs, 20 кВ, 310 нм. Пробка ДДСН перед образцом: 20 мМ ДДСН в 25 мМ ФБР, pH 6,4, ввод 15 с, 50 мбар; ввод пробы 10 с 30 мбар (А) и 80 с 30 мбар (В). 1' – R-кеторолак, 1 – S-кеторолак, 2 – S-кетопрофен.

Для оценки правильности предложенного подхода определения кеторолака те же образцы плазмы анализировали методом ВЭЖХ и найденные значения общей концентрации энантиомеров сравнивали с суммой концентраций энантиомеров, полученной методом КЭ. Хроматограммы, полученные при анализе образцов плазмы и калибровочных образцов, представлены на рисунке 69. Данные КЭ соответствуют значениям, полученным методом ВЭЖХ (таблица 22).

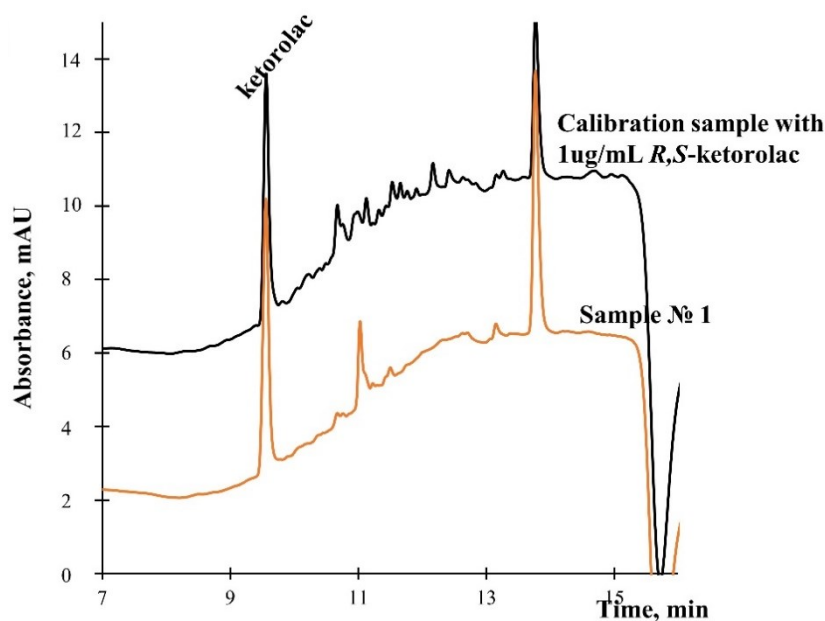


Рисунок 69. Хроматограммы калибровочного образца (1 мкг/мл) *R,S*-кеторолака и образца плазмы.

Условия: Nexera LC-40 (Shimadzu) с диодно-матричным детектированием; колонка Agilent Zorbax SB-C8 2,1 мм × 150 мм, 3,5 мкм; две подвижные фазы: А (Н₂О с 0,1 % (об.) муравьиной кислоты) и В (MeOH); скорость потока 0.3 мл/мин, градиентное элюирование: 0 мин - 40% элюента В, 5 мин - 40% элюента В, 10 мин - 90 % элюента В, 13 мин - 90 % элюента В, 13.50 мин 40% элюента В. Общее время анализа 17 мин. Объем ввода пробы 10 мкл, температура термостата 40 °С, длина волны 315 нм.

Таблица 21. Найденны концентрации кеторолака в плазме методами ВЭЖХ и КЭ.

		Образец 1	Образец 2
КЭ	$C_{R\text{-кеторолак}}$, МКГ/МЛ	0.66±0.03	0.61±0.03
	$C_{S\text{-кеторолак}}$, МКГ/МЛ	0.38±0.02	0.28±0.02
		1.04±0.05	0.89±0.05
ВЭЖХ	$C_{\text{рас-кеторолак}}$, МКГ/МЛ	1.17±0.03	0.99±0.03

В таблице 22 представлены ПО ранее используемых и предложенных в данной работе подходов. Пределы обнаружения сопоставимы, а в ряде случаев в наших условиях достигнуты лучшие результаты.

Таблица 22. Сравнение пределов обнаружения предложенных подходов с имеющимися литературными данными.

Модификация электрофоретической системы	Аналиты	ПО	ссылка
Биогенные амины			
без модификации (КЭ-МС/МС)	NA, A, DA	4.5-140 нг/мл	[188]
N-бутилимидазолиевое ковалентное покрытие		1.4-2.1 нг/мл	
N-октилимидазолиевое ковалентное покрытие		0.3-1.1 нг/мл	
Кортикостероидные гормоны			
25 мМ ДДСН+ 0.5 мМ C ₁₆ MImCl	F, E, B, S, DOC	200 нг/мл	[189]
ковалентное покрытие на основе имидазола и β-ЦД	F, B, S	120-160 нг/мл	
ЭКХ с участием псевдостационарной фазы на основе имидазола и β-ЦД	F, E, B, S, DOC	35-50 нг/мл	
Энантиомеры НПВС			
	кетопрофен	Кеторолак	
0.05 М heptakis 2,3,6-tri-O-methyl-β-cyclodextrin	0.25 мг/мл	-	[190]
ЭКХ с участием псевдостационарной фазы на основе имидазола и β-ЦД	12 (S), 18 (R) нг/мл	44 (R), 55 (S) ng/ нг/мл	
ковалентное покрытие на основе имидазола и β-ЦД	8 (R), 10 (S) мкг/мл	-	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Предложен подход к синтезу ковалентно связанных со стенками кварцевого капилляра покрытий с варьированием природы заместителя при имидазолиевом кольце. Установлено, что сформированные алкилимидазолиевые ковалентные покрытия обеспечивают с высокой эффективностью и селективностью электрофоретическое разделение как основных биогенных аминов, так и фенил- и индолкарбоновых кислот. Введение β -ЦД в структуру покрытия позволяет осуществить совместное определение гидрофобных кортикостероидных гормонов и гидрофильных биогенных аминов, а также выполнить роль хиральной стационарной фазы (режим капиллярной хиральной электрокинетической хроматографии) при разделении энантиомеров кетопрофена.

2. Показано, что сочетание *N*-алкилимидазолиевых ковалентных покрытий с предложенным гибридным методом онлайн-концентрирования (*свипинг* + *электростэкинг*, где в качестве мицеллообразующего агента выбран додецилсульфат натрия), позволяет существенно снизить пределы обнаружения биогенных аминов (до 0.6-2.0 нг/мл). Предложен вариант внутрикапиллярного концентрирования стероидных гормонов с электрокинетическим вводом «пробки» положительного производного ЦД после введения анализируемой пробы, обеспечивший эффективность до 147 тыс. т.т. и снижение предела обнаружения стероидных гормонов на порядок (в 10-16 раз).

3. Синтезирован модификатор на основе алкилимидазола и β -ЦД и выявлены его аналитические возможности в качестве псевдостационарной фазы при разделении кортикостероидных гормонов. Показано, что введение ацетонитрила (10%, объемн.) в составе фонового электролита обеспечивает экспрессное разделение пяти важнейших кортикостероидов.

4. Образование положительно заряженных ассоциатов «ионная жидкость-аналит» легло в основу нового подхода внутрикапиллярного концентрирования нейтральных стероидных гормонов в режиме электростэкинга с факторами концентрирования 16-25 и пределами обнаружения 35-50 нг/мл, что обеспечило их электрофоретическое определение в плазме крови человека.

5. Найдены условия электрофоретического разделения энантиомеров кетопрофена и кеторолака при введении в фоновый электролит хирального селектора на основе бутилимидазола и β -циклодекстрина. Данный вариант позволил впервые провести электрофоретическое разделение энантиомеров кеторолака в режиме электрокинетической хроматографии. Для каждой пары энантиомеров рассчитаны константы комплексообразования с положительно заряженным производным β -ЦД.

6. Разработан гибридный вариант внутрикапиллярного концентрирования (сочетание свипинга и динамического рН скачка) индивидуальных энантиомеров кетопрофена и кеторолака с факторами концентрирования в диапазоне 290-390 с пределами обнаружения индивидуальных энантиомеров кеторолака до 50 нг/мл. Предложенный подход апробирован при определении концентраций энантиомеров кеторолака в плазме крови человека после приема таблетки «Кеторол-экспресс». Найденные значения хорошо согласуются с данными, полученными методом ОФ ВЭЖХ

7. Выявлены аналитические возможности различных двойных хиральных систем. При сочетании 1-Bu-3-β-CDImOTs и ванкомицина обнаружена интересная закономерность: с ростом концентрации ванкомицина в ФЭ наблюдалось нелинейное изменение факторов энантиоселективности кетопрофена с обращением порядка их миграции.

Работа выполнена с использованием оборудования ресурсных центров СПбГУ «Методы анализа состава вещества» и «Нанотехнологии» при финансовой поддержке гранта РФФИ №19-13-00370.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

A – адреналин

AFMC – Analyte focusing by micelle collapse, свипинг незаряженных аналитов с разрушением мицелл

ASEI-sweeping – anion-selective exhaustive injection – sweeping, анион селективный стэкинг – свипинг

B – кортикостерон

3-Bu-1-β-CDImOTs – 1-бутил-3-β-циклодекстринимидазолий тозилат

BMImBF₄ – тетрафторборат 1-бутил-3-метилимидазолия

BNA – 1,1'-би-2-нафтил-2,2'-диамин

BNP – ((±)-1,1'-би-2-нафтил-2,2'-диилгидрофосфат

BOH – (±)-1,1'-би-2-нафтол

C₁₂MImCl – 1-додецил-3-метилимидазолий хлорид

C₁₆MImCl – 1-гексадецил-3-метилимидазолий хлорид

CSEI-sweeping – cation-selective exhaustive injection – sweeping, катион селективный стэкинг – свипинг

DA – дофамин

3,4-DHBA – 3,4-дигидроксибензиламин

Dos – 11-дезоксикортикостерон

DOPA – 3,4-дигидроксифенилаланин

DPPH – 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил

E – кортизон

EMImBF₄ – тетрафторборат 1-этил-3-метилимидазолия

EMImPF₆ – гексафторфосфат 1-этил-3-метилимидазолия

EMImSO₃F₃ – 1-этил-3- трифторметансульфонат метилимидазолия

EtCholNTf₂ – (R)-N,N,N-триметил-2-аминобутанол-бис(трифторметансульфон)имидат

EMIMCl – хлорид 1-этил-3-этилимидазолия

F – гидрокортизон

FASI – *Field amplified stacking injection*, электостэкинг

FASS – *Field amplified sample stacking*, стэкинг с усилением поля

Glu-β-ЦД – глюкозил-β-ЦД

GPTMS – (3-глицидоксипропил)триметоксисилан

HHA – гомогентизиновая кислота

HIAA – 5-гидроксииндолуксусная кислота

5-HT – серотонин

HVA – гомованилиновая кислота

InLacA – 3-индолмолочная кислота

InPrA – 3-индолпропионовая кислота

LVSS – *large volume sample stacking*, стэкинг с большим объемом вводимой пробы

MBuAMCD – моно-6A-(4-метоксибутиламино)- β -ЦД

MEtAMCD – моно-6A-(2-метоксиэтиламино)- β -ЦД

3-Me-1- β -CDImOTs - метил-1- β -циклодекстринимидазолий тозилат

MCDS – *Micelle to cyclodextrin stacking*, свипинг с разрушением мицелл

MN – метанефрин

MSS – *Micelle to solvent stacking*, свипинг заряженных аналитов с разрушением мицелл

3-MTA – 3-метокситирамин

NA – норадреналин

NMN – норметанефрин

S – 11-деоксикортизол

SEF_n – *Sensitivity enhancement factor*, фактор концентрирования

3-PLA – 3-фенилмолочная кислота

Pr – прогестерон

[TBA][L-Arg] – тетрабутиламмоний-L-аргинин

[TBA][L-Glu] – L-глутаминовая кислота тетрабутиламмония

[TBA][L-Ile] – тетрабутиламмоний-L-изолейцин

[TBA][L-Lys] – тетраметиламмоний- L-лизин

[TEA][L-Arg] – тетраэтиламмоний-L-аргинин

TEBAC – бензилтриэтиламмония хлорид

[TMA][L-Arg] – тетраметиламмоний-L-аргинин

[TMA][L-Glu] – тетраметиламмоний -L-глутаминовая кислота

[TMA][L-Hyp] – тетраметиламмоний-L-гидроксипролин

[TMA][L-Ile] – тетраметиламмоний-L-изолейцин

[TMA][L-Lys] – тетраметиламмоний- L-лизин

[TMA][OH] – тетраметиламмоний гидроксид

[TMA][L-Pro] – тетраметиламмоний-L-пролин

Trp – триптофан

Ts-β-ЦД – 6*A-O-p*-толуолсульфонил-β-циклодекстрин

Tyr – тирозин

VMA – ванилилминдальная кислота

PhBuA – 2- фенилмасляная кислота

PhSucA – 3-индолакриловая кислота

PhLacA – 3-фенилмолочная кислота

АК – аминокислота

ББР – боратный буферный раствор

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЭР – глубокие эвтектические растворители

ГП-β-ЦД – гидроксипропил-β-ЦД

ДДСН – додецилсульфат натрия

ДМФА – диметилформамид

ИЖ – ионные жидкости

КГЭ – капиллярный гель электрофорез

КЗЭ – капиллярный зонный электрофорез

ККМ – критическая концентрация мицеллообразования

КЭ – капиллярный электрофорез

КЭХ – капиллярная электрохроматография

ЛОКЭ – лигандообменный капиллярный электрофорез

МИП – молекулярно-импринтированные полимеры

МОК – металлоорганический каркас

МЭКХ – мицеллярная электрохроматография

МЭЭКХ – микроэмульсионная электрокинетическая хроматография

НВКЭ – неводный капиллярный электрофорез

НПВС – нестероидное противовоспалительное средство

НЧ – наночастица

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ПКО – предел количественного обнаружения

ПО – пределы обнаружения

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

УДФГ – уридин-5'-дифосфоглюкуронозилтрансфераза

ФБР – фосфатный буферный раствор

ФЭ – фоновый электролит

ЦТАБ – цетилтриметиламмония бромид

ЦД – циклодекстрин

ЭКХ – электрокинетическая хроматография

ЭОП – электроосмотический поток

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **Kolobova E., Kartsova L., Kravchenko A., Bessonova E.** Imidazolium ionic liquids as dynamic and covalent modifiers of electrophoretic systems for determination of catecholamines. *Talanta*. 2018. V. 188 P. 183–191 DOI: 10.1016/j.talanta.2018.05.057.
2. **Kolobova E.A., Kartsova L.A., Bessonova E.A., Kravchenko A.V.** On-line concentration of biogenic amines by capillary electrophoresis method using the synthesized covalent coating based on the imidazolium ionic liquids. *Analytics and Control*. 2017. V. 21, N. 1, P. 57-64. DOI: 10.15826/analitika.2017.21.1.006.
3. **Kravchenko A, Kolobova E, Kartsova L.** Multifunction covalent coatings for separation of amino acids, biogenic amines, steroid hormones, and ketoprofen enantiomers by capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Sep Sci plus*. 2020. V. 3. P. 102–111. DOI: 10.1002/sscp.201900098.
4. **Kravchenko A.V., Kartsova L.A.,** Effect of Modifiers on the Electrophoretic Separation and Intercapillary Preconcentration of Biologically Active Compounds. *J. Analyt.l Chem.*, 2021, 76, 1043-1050. DOI 10.1134/S1061934821090069.
5. **Kravchenko A.V., Kolobova E.A., Kartsova L.A.** Usage of 3-methyl-1- β -cyclodextrinimidazole tosylate for electrophoretic separation and preconcentration of corticosteroids by capillary electrophoresis. *Monatsh Chem*. 2021. V. 152. 1067–1074 10.1007/s00706-021-02809-4
6. **Kravchenko A.V., Kolobova E.A., Kechin A.A., Kartsova L.A.** Development of a capillary electrophoretic method for determination of ketorolac enantiomers in human plasma using cationic β -cyclodextrin derivative as a chiral selector. *Journal of Separation Science*, doi: 10.1002/jssc.202200601.

Тезисы

1. Kravchenko A.V., Kolobova E.A., Kartsova L.A. Usage of covalent coatings with ionic liquids in determination of catecholamines by capillary electrophoresis. Тезисы «X Международной конференции молодых ученых по химии «Менделеев-2017», 2017. Санкт-Петербург. 3-7 апреля. с 437
2. Кравченко А.В., Колобова Е.А., Карцова Л.А. Синтез и применение ковалентных покрытий на основе имидазолиевых ионных жидкостей для электрофоретического определения катехоламинов. Материалы VIII научной конференции молодых ученых «Инновации в химии: достижения и перспективы-2017», «Ломоносов-2017». 2017. Москва. 10 - 14 апреля. С. 44.
3. Кравченко А.В., Колобова Е.А., Карцова Л.А. Электрофоретическое определение катехоламинов с использованием ковалентных покрытий на основе ионных жидкостей.

Материалы III Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез», 2017. Краснодар. 21 мая – 27 мая С. 40.

4. Kravchenko A., Kolobova E., Kartsova L., Bessonova E. Determination of biogenic amines in urine sample using ionic liquids covalent coated quartz capillaries by capillary electrophoresis. Book of Abstracts. 21st International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques, 2017. St. Petersburg. September 3-8, P. 108.

5. Кравченко А.В., Колобова Е.А., Карцова Л.А. Имидазолиевые ионные жидкости – реагенты для ковалентного покрытия кварцевого капилляра при электрофоретическом определении катехоламинов. Материалы XV международной научно-практической конференции «Физико-химические основы ионообменных и хроматографических процессов «Иониты -2017», 2017. Воронеж. 14-17 сентября, С. 150.

6. Кравченко А.В., Колобова Е.А., Карцова Л.А. Ковалентные покрытия на основе ионных жидкостей для определения катехоламинов методом капиллярного электрофореза. Третий съезд аналитиков. Сборник тезисов докладов России, 2017. Москва. 9-13 октября, С. 399.

7. Кравченко А.В., Колобова Е.А., Карцова Л.А. Ковалентная модификация стенок кварцевого капилляра имидазолиевыми ионными жидкостями для электрофоретического определения биогенных аминов. Тезисы докладов. VI Всероссийский симпозиум «Кинетика и динамика обменных процессов» Роль хроматографии в SEPARATION SCIENCE, 2017. Сочи, 29 октября-6 ноября, С. 226

8. Кравченко А.В., Колобова Е.А., Карцова Л.А. Применение ковалентно модифицированных имидазолиевыми ионными жидкостями капилляров для on-line концентрирования биогенных аминов методом капиллярного электрофореза. Материалы V всероссийского симпозиума с международным участием «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии», 2018. Краснодар, 7-13 октября, С. 32

9. Кравченко А.В., Колобова Е.А., Карцова Л.А. Возможности ковалентных покрытий на основе имидазолиевых ионных жидкостей при электрофоретическом определении аналитов различной природы. Тезисы докладов. VII Всероссийский симпозиум «Кинетика и динамика обменных процессов» Роль хроматографии в SEPARATION SCIENCE, 2018. Сочи. 28 октября-5 ноября. С.113.

10. Kravchenko A. New covalent coatings based on imidazolium ionic liquids for the determination of bioactive compounds by capillary electrophoresis. Conference abstracts. International Student Conference «Science and Progress», 2018. Санкт-Петербург. 12-14 ноября, С. 53.

11. Кравченко А.В., Карцова Л.А., Колобова Е.А. Изучение влияния структуры ковалентных покрытий на основе имидазолиевых ионных жидкостей на электрофоретическое определение биологически активных соединений. Тезисы XXVI Международной научной

конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2019», секция «Химия», 2019. Москва. 8-12 апреля. С. 44.

12. Kravchenko A.V., Kartsova L.A., Kolobova E.A. On-line preconcentration of biologically active compounds by the capillary electrophoresis with the usage of covalent coatings based on imidazolium cation. XXI менделеевский съезд по общей и прикладной химии, сборник тезисов в 6 томах, т. 4, 2019., Санкт-Петербург. 9-13 сентября. С. 280

13. Кравченко А.В., Колобова Е.А., Карцова Л.А. Полифункциональные покрытия на основе имидазола и β -циклодекстрина для электрофоретического определения аналитов различной природы. Тезисы докладов. Восьмой Всероссийский симпозиум с международным участием «Кинетика и динамика обменных процессов» ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ SEPARATION SCIENCE, 2019. Москва. 18–22 ноября. С. 257.

14. Kravchenko A., Kolobova E., Kartsova L. Permanent coatings based on imidazolium cations in the separation of biological active analytes by capillary electrophoresis. 20th European Meeting on Environmental Chemistry. Book of abstract. 2019. Poland. Lodz. 2-5 december. P. 78.

15. Kravchenko A.V., Kolobova E.A., Kartsova L.A. Application of covalent coatings based on imidazolium cations for separation and online preconcentration of basic and neutral analytes in capillary electrophoresis. Proceedings of the 16th International Students Conference “Modern Analytical Chemistry”. 2020. Czech Republic. Prague. 17—18 September. P. 35.

16. Кравченко А.В., Колобова Е.А., Карцова Л.А. Применение ковалентных покрытий на основе имидазолиевого катиона для расширения возможностей метода капиллярного электрофореза. Материалы IV Всероссийской конференции с международным участием «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». 2020. Краснодар. 27 сентября-3 октября. С. 47.

17. Кравченко А.В., Колобова Е.А. Использование соединений на основе имидазолиевого катиона в качестве модификаторов электрофоретических систем. Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2021», секция «Химия». 2021. Москва. 12-23 апреля. С. 44.

18. Kravchenko A.V., Kolobova E.A., Kartsova L.A. Applications of modifiers based on imidazolium cation to electrophoretic separation of biologically active compounds. XII International conference on chemistry for young scientists “Mendeleev 2021”. Book of Abstracts. St. Petersburg. 6-10 September. 2021. P. 80.

19. Kravchenko A., Kolobova E., Kartsova L. The electrophoretic separation of biologically active compounds with using modifiers based on imidazolium cation. 1st International Meeting for Young Analytical Chemists Book of Abstracts. 27-28 September. 2021. P 16.

20. Кравченко А.В., Колобова Е.А. Карцова Л.А. Модификаторы на основе имидазолиевого катиона при он-лайн концентрировании методом капиллярного электрофореза. Материалы VI всероссийского симпозиума с международным участием «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии», 2021. Краснодар, 26 сентября-02 октября, С. 155.

21. Кравченко А.В., Колобова Е.А. Использование модификаторов на основе имидазола и β -циклодекстрина для разделения энантиомеров лекарственных средств. Материалы Международной научной конференции студентов аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022», секция «Химия». Издательство Перо, 2022. ISBN 978-5-00204-190-9, 11-22 апреля, 2022г., С. 60.

22. Кравченко А.В., Колобова Е.А., Карцова Л.А. Катионные модификаторы на основе имидазола для разделения и концентрирования биологически активных соединений методом капиллярного электрофореза. Тезисы докладов, представленных на IV Съезде аналитиков России, (26-30 сентября 2022 г., г. Москва) ISBN 978-5-905049-27-9

23. Кравченко А.В., Колобова Е.А., Карцова Л.А. Модификаторы на основе имидазола в капиллярном электрофорезе: разделение и концентрирование биологически активных соединений. Тезисы девятого всероссийского симпозиума и школы-конференции молодых ученых «кинетика и динамика сорбционных процессов», приуроченные к 150-летию со дня рождения М.С. Цвета, 30 октября – 03 ноября, 2022 г. сочи, с 68.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] P. Kowalski, I. Ole, A. Plenis, A. Roszkowska, and T. Ba, "Trends in Analytical Chemistry Strengths and weaknesses of ionic liquids as efficiency enhancers in capillary electrophoresis" vol. 162, 2023, doi: 10.1016/j.trac.2023.117031.
- [2] Y. H. Boon, M. Raoov, N. N. M. Zain, S. Mohamad, and H. Osman, "Combination of Cyclodextrin and Ionic Liquid in Analytical Chemistry : Current and Future Perspectives" vol. 8347, no. April, pp. 0–59, 2017, doi: 10.1080/10408347.2017.1320936.
- [3] R. Q. Wang, T. T. Ong, and S. C. Ng, "Synthesis of cationic β -cyclodextrin derivatives and their applications as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography" *J. Chromatogr. A*, vol. 1203, no. 2, pp. 185–192, 2008, doi: 10.1016/j.chroma.2008.07.046.
- [4] C. Zhou, J. Deng, G. Shi, and T. Zhou, " β -cyclodextrin-ionic liquid polymer based dynamically coating for simultaneous determination of tetracyclines by capillary electrophoresis" *Electrophoresis*, pp. 1060–1067, 2017, doi: 10.1002/elps.201600229.
- [5] T. T. Ong, W. Tang, W. Muderawan, S. C. Ng, and H. S. O. Chan, "Synthesis and application of single-isomer 6-mono(alkylimidazolium)- β -cyclodextrins as chiral selectors in chiral capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 26, no. 20, pp. 3839–3848, 2005, doi: 10.1002/elps.200500189.
- [6] D. Wu, C. Ma, G. C. Fan, F. Pan, Y. Tao, and Y. Kong, "Recent advances of the ionic chiral selectors for chiral resolution by chromatography, spectroscopy and electrochemistry," *J. Sep. Sci.*, vol. 45, no. 1, pp. 325–337, 2022, doi: 10.1002/jssc.202100334.
- [7] S. L. Simpson, J. P. Quirino, and S. Terabe, "On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis Fundamentals and applications," *J. Chromatogr. A*, vol. 1184, pp. 504–541, 2008, doi: 10.1016/j.chroma.2007.11.001.
- [8] R. Řemínek and F. Foret, "Capillary electrophoretic methods for quality control analyses of pharmaceuticals: A review," *Electrophoresis*, vol. 42, no. 1–2, pp. 19–37, 2021, doi: 10.1002/elps.202000185.
- [9] X. Cui *et al.*, "Screening and quantitation of forty-six drugs of abuse and toxic compounds in human whole blood by capillary electrophoresis: Application to forensic cases," *Microchem. J.*, vol. 144, 2018, pp. 403–410, 2019, doi: 10.1016/j.microc.2018.09.031.
- [10] W. H. Henley, Y. He, J. S. Mellors, N. G. Batz, J. M. Ramsey, and J. W. Jorgenson, "High

resolution separations of charge variants and disulfide isomers of monoclonal antibodies and antibody drug conjugates using ultra-high voltage capillary electrophoresis with high electric field strength,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1523, pp. 72–79, 2017, doi: 10.1016/j.chroma.2017.07.059.

[11] R. Kumar, A. Guttman, and A. S. Rathore, “Applications of capillary electrophoresis for biopharmaceutical product characterization,” *Electrophoresis*, vol. 43, pp. 143-166, 2022, doi: 10.1002/elps.202100182.

[12] B. Nunnally *et al.*, “A Series of Collaborations Between Various Pharmaceutical Companies and Regulatory Authorities Concerning the Analysis of Biomolecules Using Capillary Electrophoresis,” *Chromatographia*, vol. 64, no. 5, pp. 359–368, 2006, doi: 10.1365/s10337-006-0003-y.

[13] S. S. Park *et al.*, “Robustness of iCIEF methodology for the analysis of monoclonal antibodies: An interlaboratory study,” *J. Sep. Sci.*, vol. 35, pp. 3124–3129, 2012, doi: 10.1002/jssc.201200633.

[14] N. M. Vizioli, L. Rusell, and C. N. Carducci, “On-line preconcentration capillary electrophoresis for purity profiling of synthetic peptides,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 514, pp. 167–177, 2004, doi: 10.1016/j.aca.2004.03.058.

[15] J. Otin, A. Benoit, and C. Buisson, “Online large volume sample stacking preconcentration and separation of enantiomeric GHRH analogs by capillary electrophoresis,” *Electrophoresis*, vol. 44, pp. 807-817, 2023 doi: 10.1002/elps.202200278.

[16] M. Pieckowski, P. Kowalski, and T. Bączek, “Combination of large volume sample stacking with polarity switching and cyclodextrin electrokinetic chromatography (LVSS-PS-CDEKC) for the determination of selected preservatives in pharmaceuticals,” *Talanta*, vol. 211, p. 120673, 2020, doi: 10.1016/j.talanta.2019.120673.

[17] “Determination of thermodynamic pKa values of pharmaceuticals from five different groups using capillary electrophoresis,” *J. Sep. Sci.*, vol. 38, 2015, doi: 10.1002/jssc.201401057.

[18] S. El Deeb, D. A. El-hady, and S. Cari, “Recent advances in capillary electrophoretic migration techniques for pharmaceutical analysis (2013–2015),” *Electrophoresis*, vol. 37, pp. 1591-1608, 2016, doi: 10.1002/elps.201600058.

[19] C. Chen, Y. Chao, Y. Lin, and Y. Chen, “Determination of finasteride and its metabolite in urine by dispersive liquid – liquid microextraction combined with field-enhanced sample stacking and sweeping,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1547, pp. 14–20, 2018, doi: 10.1016/j.chroma.2018.03.008.

- [20] L. Yien, M. C. Breadmore, and H. Heng, "Electrokinetic supercharging in nonaqueous capillary electrophoresis for online preconcentration and determination of tamoxifen and its metabolites in human plasma," *J. Chromatogr. A*, vol. 1461, pp. 185–191, 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2016.07.067.
- [21] N. Drouin *et al.*, "Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry at Trial by Metabo-Ring: Effective Electrophoretic Mobility for Reproducible and Robust Compound Annotation," *Anal. Chem.*, vol. 92, pp. 14103–14112, 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.0c03129.
- [22] L. F. Hu, S. J. Yin, H. Zhang, and F. Q. Yang, "Recent developments of monolithic and open-tubular capillary electrochromatography (2017–2019)," *J. Sep. Sci.*, vol. 43, no. 9–10, pp. 1942–1966, 2020, doi: 10.1002/jssc.201901168.
- [23] X. Li, Q. Ma, X. Zheng, Q. Chen, and X. Sun, "Recent applications and chiral separation development based on stationary phases in open tubular capillary electrochromatography (2019 e 2022)," *J. Pharm. Anal.*, vol. 13, pp. 323–339, 2023, doi: 10.1016/j.jpha.2023.01.003.
- [24] L. A. Kartsova, A. V Kravchenko, and E. A. Kolobova, "Covalent Coatings of Quartz Capillaries for the Electrophoretic Determination of Biologically Active Analytes," vol. 74, pp. 729–737, 2019, doi: 10.1134/S1061934819080100.
- [25] L. A. Kartsova, D. V Makeeva, and V. A. Davankov, "Trends in Analytical Chemistry Nano-sized polymer and polymer-coated particles in electrokinetic separations," *Trends Anal. Chem.*, vol. 120, p. 115656, 2019, doi: 10.1016/j.trac.2019.115656.
- [26] S. A. Kitte, T. H. Fereja, M. I. Halawa, B. Lou, H. Li, and G. Xu, "Recent advances in nanomaterial-based capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 40, 2050–2057, 2019, doi: 10.1002/elps.201800534.
- [27] R. Chen, H. Zhou, M. Liu, H. Yan, and X. Qiao, "Trends in Analytical Chemistry Ionic liquids-based monolithic columns: Recent advancements and their applications for high-efficiency separation and enrichment," *Trends Anal. Chem.*, vol. 111, pp. 1–12, 2019, doi: 10.1016/j.trac.2018.11.026.
- [28] X. Wang *et al.*, "Open-tubular capillary electrochromatographic determination of ten sulfonamides in tap water and milk by a metal-organic framework-coated capillary column," *Electrophoresis*, vol. 39, pp. 2236–2245, 2018, doi: 10.1002/elps.201800047.
- [29] G. Lidi, H. Xingfang, Q. Shili, C. Hongtao, Z. Xuan, and W. Bingbing, "L-Cysteine modified metal-organic framework as a chiral stationary phase for enantioseparation by capillary electrochromatography," *RSC Adv.*, vol. 12, 2022, pp. 6063–6075, 2022, doi: 10.1039/d1ra07909c.

- [30] R. Konasova, M Butnariu, V. Solínova, V. Kasicka, D. Koval, “Covalent cationic copolymer coatings allowing tunable electroosmotic flow for optimization of capillary electrophoretic separations,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 1178, pp. 338789, 2021, doi: 10.1016/j.aca.2021.338789.
- [31] M. Koc, T. Petr, B. Sommerov, and M. Siklov, “Sensitive monitoring of 3-hydroxybutyrate as an indicator of human fasting by capillary electrophoresis in a PAMAMPS coated capillary,” *Talanta*, vol. 247, pp. 123582, 2022, doi: 10.1016/j.talanta.2022.123582.
- [32] V. Šolínová, D. Koval, P. Tůma, M. Butnariu, and V. Kašička, “Covalent anionic copolymer coatings with tunable electroosmotic flow for optimization of capillary electrophoretic separations,” *Electrophoresis*, vol. 43, pp. 1953-1962, 2022, doi: 10.1002/elps.202200130.
- [33] J. Xing, F. Wang, H. Cong, S. Wang, Y. Shen, and B. Yu, “Analysis of proteins and chiral drugs based on vancomycin covalent capillary electrophoretic,” *Analyst*, vol. 146, pp. 1320–1325, 2021, doi: 10.1039/d0an02018d.
- [34] N. Treder *et al.*, “The critical evaluation of the effects of imidazolium-based ionic liquids on the separation efficiency of selected biogenic amines and their metabolites during MEKC analysis,” *Talanta* vol. 238, pp. 122997, 2022, doi: 10.1016/j.talanta.2021.122997.
- [35] X. Sun, C. Chen, X. Li, Y. Du, S. Zhao, and Z. Feng, “Gold nanoparticles coated with a tetramethylammonium lactobionate ionic liquid for enhanced chiral differentiation in open tubular capillary electrochromatography : application to enantioseparation of β -blockers,” *Microchim Acta*, vol. 187, pp. 170, 2020, doi: 10.1007/s00604-020-4121-2
- [36] L. Nanoparticle-modi, C. Column, A. Wang, K. Liu, M. Tian, and L. Yang, “Open Tubular Capillary Electrochromatography-Mass Spectrometry for Analysis of Underivatized Amino Acid Enantiomers with a Porous Layer-Gold Nanoparticle-Modified Chiral Column,” 2022, doi: 10.1021/acs.analchem.2c00233.
- [37] X. Zheng, Q. Zhang, Q. Ma, X. Li, L. Zhao, and X. Sun, “A chiral metal-organic framework $\{(HQA)(ZnCl_2)(2.5H_2O)\}_n$ for the enantioseparation of chiral amino acids and drugs,” *J. Pharm. Anal.*, vol. 13, pp. 421-429, 2023, doi: 10.1016/j.jpha.2023.03.003.
- [38] L. Gao and X. Hu, “One-pot synthesis of a novel chiral Zr-based metal-organic framework for capillary electrochromatographic enantioseparation,” vol. 43, pp. 1161-1173, 2022, doi: 10.1002/elps.202200020.
- [39] Z. Li, Z. Mao, and Z. Chen, “In-situ growth of a metal organic framework composed of zinc (II), adeninate and biphenyldicarboxylate as a stationary phase for open-tubular capillary

electrochromatography,” *Microchim Acta*, vol. 186, pp 53, 2019, <https://doi.org/10.1007/s00604-018-3115-9>

[40] X. Sun, Y. Tao, Y. Du, W. Ding, C. Chen, and X. Ma, “Metal organic framework HKUST-1 modified with carboxymethyl- β -cyclodextrin for use in improved open tubular capillary electrochromatographic enantioseparation of five basic drugs, *Microchim Acta*, vol. 186, pp. 462, 2019: <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3584-5>

[41] Z. Mao, T. Bao, Z. Li, and Z. Chen, “Ionic liquid-copolymerized monolith incorporated with zeolitic imidazolate framework-8 as stationary phases for enhancing reversed phase selectivity in capillary electrochromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1578, pp. 99–105, 2018, doi: 10.1016/j.chroma.2018.10.008.

[42] Z. Li, Z. Mao, W. Zhou, and Z. Chen, “Talanta γ -Cyclodextrin metal-organic framework supported by polydopamine as stationary phases for electrochromatographic enantioseparation,” *Talanta*, vol. 218, p. 121160, 2020, doi: 10.1016/j.talanta.2020.121160.

[43] J. Schejbal, Z. Glatz, “Immobilized-enzyme reactors integrated with capillary electrophoresis for pharmaceutical research,” *J Sep Sci.*, vol. 41, pp. 323–335, 2018, doi: 10.1002/jssc.201700905.

[44] J. Qiao *et al.*, “A block copolymer covalent coating acting as surfactants in separation of by capillary electrophoresis,” *Talanta*, vol. 80, pp. 770–776, 2009, doi: 10.1016/j.talanta.2009.07.056.

[45] L. Zhao, J. Qiao, H. Zhang, F. Xie, and L. Qi, “Open tubular capillary electrochromatography with block co-polymer coating for separation of β -lactam antibiotics,” *Chinese Chem. Lett.*, vol. 30, pp. 349–352, 2018, doi: 10.1016/j.ccllet.2018.03.007.

[46] L. Guo, X. Yu, and Y. Mao, “A covalent modified hydrophilic capillary for enhanced capillary electrophoresis of biopolymers,” *Chinese Chem. Lett.*, vol. 20, pp. 1123–1126, 2009, doi: 10.1016/j.ccllet.2009.04.005.

[47] A. Cifuentes, P. Canalejas, and J. C. Diez-masa, “Preparation of linear polyacrylamide-coated capillaries Study of the polymerization process and its effect on capillary,” *J. Chromatogr. A*, vol. 830, pp. 423–438, 1999.

[48] X. Liu, S. Sun, R. Nie, J. Ma, Q. Qu, and L. Yang, “Highly uniform porous silica layer open-tubular capillary columns produced via in-situ biphasic sol-gel processing for open-tubular capillary electrochromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1538, pp. 86–93, 2018, doi: 10.1016/j.chroma.2018.01.024.

- [49] Y. Wang, Z. Zeng, N. Guan, and J. Cheng, "Sol-gel technique for the preparation of β -cyclodextrin derivative stationary phase in open-tubular capillary electrochromatography," *Electrophoresis*, vol. 22, no. 11, pp. 2167–2172, 2001, doi: 10.1002/1522-2683(20017)22:11<2167::AID-ELPS2167>3.0.CO;2-N.
- [50] J. Svobodová, O. Kofroňová, O. Benada, V. Král, and I. Mikšík, "Separation of oligopeptides, nucleobases, nucleosides and nucleotides using capillary electrophoresis/electrochromatography with sol–gel modified inner capillary wall," *J. Chromatogr. A*, vol. 1517, pp. 185–194, 2017, doi: 10.1016/j.chroma.2017.08.014.
- [51] J. L. Chen and H. J. Syu, "Immobilization of chitosan in sol-gel phases for chiral open-tubular capillary electrochromatography," *Anal. Chim. Acta*, vol. 718, pp. 130–137, 2012, doi: 10.1016/j.aca.2012.01.003.
- [52] Q. Qu, C. Gu, Z. Gu, Y. Shen, C. Wang, and X. Hu, "Layer-by-layer assembly of polyelectrolyte and graphene oxide for open-tubular capillary electrochromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1282, pp. 95–101, 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2013.01.055.
- [53] Y. Zhang, W. Wang, X. Xiao, and L. Jia, "Separation of monoclonal antibody charge state variants by open tubular capillary electrochromatography with immobilised protein as stationary phase," *J. Chromatogr. A*, vol. 1466, pp. 180–188, 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2016.09.008.
- [54] C. Pan, W. Wang, H. Zhang, L. Xu, and X. Chen, "In situ synthesis of homochiral metal – organic framework in capillary column for capillary electrochromatography enantioseparation," *J. Chromatogr. A*, vol. 1388, pp. 207–216, 2015, doi: 10.1016/j.chroma.2015.02.034.
- [55] T. Bao, P. Tang, D. Kong, Z. Mao, and Z. Chen, "Polydopamine-supported immobilization of covalent-organic framework-5 in capillary as stationary phase for electrochromatographic separation," *J. Chromatogr. A*, vol. 1445, pp. 140–148, 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2016.03.085.
- [56] F. M. Tarongoy, P. R. Haddad, and J. P. Quirino, "Recent developments in open tubular capillary electrochromatography from 2016 to 2017," *Electrophoresis*, vol. 39, pp. 34–52, 2018, doi: 10.1002/elps.201700280.
- [57] T. Bao, P. Tang, Z. Mao, and Z. Chen, "Talanta An immobilized carboxyl containing metal-organic framework-5 stationary phase for open-tubular capillary electrochromatography," *Talanta*, vol. 154, pp. 360–366, 2016, doi: 10.1016/j.talanta.2016.03.089.
- [58] X. Wang, K. Li, L. Yao, C. Wang, and A. Van Schepdael, "Journal of Pharmaceutical

and Biomedical Analysis Recent advances in vitamins analysis by capillary electrophoresis,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 147, pp. 278–287, 2018, doi: 10.1016/j.jpba.2017.07.030.

[59] E. A. Bessonova, L. A. Kartsova, and V. F. Gallyamova, “Effect of 3-methyl-1-cetylimidazolium chloride ionic liquid on the electrophoretic preconcentration of steroid hormones,” *J. Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 696–702, 2016, doi: 10.1134/S1061934816070042.

[60] Y. Liu and X. Wang, “Enantioseparation of ofloxacin and its four related substances with ligand exchange–micellar electrokinetic chromatography using copper(II)-L-isoleucine complex as chiral selector,” *Chirality*, vol. 29, pp. 422–429, 2017, doi: 10.1002/chir.22705.

[61] E. Farcaş, L. Pochet, J. Crommen, A. C. Servais, and M. Fillet, “Capillary electrophoresis in the context of drug discovery,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 144, pp. 195–212, 2017, doi: 10.1016/j.jpba.2017.02.022.

[62] W. Feng, J. Qiao, J. Jiang, B. Sun, Z. Li, and L. Qi, “Development of alanine aminotransferase reactor based on polymer@Fe₃O₄ nanoparticles for enzyme inhibitors screening by chiral ligand exchange capillary electrophoresis,” *Talanta*, vol. 182, pp. 600–605, 2018, doi: 10.1016/j.talanta.2018.02.029.

[63] K. Sakai-kato, M. Kato, and T. Toyo, “Screening of inhibitors of uridine diphosphate glucuronosyltransferase with a miniaturized on-line drug-metabolism system,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1051, pp. 261–266, 2004, doi: 10.1016/j.chroma.2004.06.058.

[64] Y. Zhao *et al.*, “Talanta Biomimetic cell-cell adhesion capillary electrophoresis for studying Gu-4 antagonistic interaction between cell membrane receptor and ligands,” *Talanta*, vol. 207, no. March 2019, p. 120259, 2020, doi: 10.1016/j.talanta.2019.120259.

[65] S. Bernardo-Bermejo, E. Sánchez-López, M. Castro-Puyana, and M. L. Marina, “Chiral capillary electrophoresis,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 124, pp. 115807, 2020, doi: 10.1016/j.trac.2020.115807.

[66] S. Fanali and B. Chankvetadze, “Some thoughts about enantioseparations in capillary electrophoresis,” *Electrophoresis*, vol. 40, pp. 2420–2437, 2019, doi: 10.1002/elps.201900144.

[67] J. M. Saz and M. L. Marina, “Recent advances on the use of cyclodextrins in the chiral analysis of drugs by capillary electrophoresis,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1467, pp. 79–94, 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2016.08.029.

[68] P. Řezanka, K. Navrátilová, M. Řezanka, V. Král, and D. Sýkora, “Application of cyclodextrins in chiral capillary electrophoresis,” *Electrophoresis*, vol. 35, pp. 2701–2721, 2014, doi:

10.1002/elps.201400145.

[69] I. Fejős, E. Kalydi, M. Malanga, G. Benkovics, and S. Béni, “Single isomer cyclodextrins as chiral selectors in capillary electrophoresis,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1627, pp. 461375, 2020, doi: 10.1016/j.chroma.2020.461375.

[70] P. Peluso and B. Chankvetadze, “Native and substituted cyclodextrins as chiral selectors for capillary electrophoresis enantioseparations: Structures, features, application, and molecular modeling,” *Electrophoresis*, vol. 42, no. 17–18, pp. 1676–1708, 2021, doi: 10.1002/elps.202100053.

[71] R. B. Yu and J. P. Quirino, “Chiral separation using cyclodextrins as mobile phase additives in open-tubular liquid chromatography with a pseudophase coating,” *J. Sep. Sci.*, vol. 45, pp. 1195–1201, 2022, doi: 10.1002/jssc.202100835.

[72] Y. Yao, P. Song, X. Wen, M. Deng, J. Wang, and X. Guo, “Chiral separation of 12 pairs of enantiomers by capillary electrophoresis using heptakis-(2,3-diacetyl-6-sulfato)- β -cyclodextrin as the chiral selector and the elucidation of the chiral recognition mechanism by computational methods,” *J. Sep. Sci.*, vol. 40, pp. 2999–3007, 2017, doi: 10.1002/jssc.201700137.

[73] C. J. Núñez-Agüero, C. M. Escobar-Llanos, D. Díaz, C. Jaime, and R. Garduño-Juárez, “Chiral discrimination of ibuprofen isomers in β -cyclodextrin inclusion complexes: experimental (NMR) and theoretical (MD, MM/GBSA) studies,” *Tetrahedron*, vol. 62, pp. 4162–4172, 2006, doi: 10.1016/j.tet.2006.02.010.

[74] C. Zhang and X. Ma, “Use of chiral ionic liquid as additive for synergistic enantioseparation of basic drugs in capillary electrophoresis,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 225, p. 115204, 2023, doi: 10.1016/j.jpba.2022.115204.

[75] X. Li, X. Yao, Y. Xiao, and Y. Wang, “Enantioseparation of single layer native cyclodextrin chiral stationary phases: Effect of cyclodextrin orientation and a modeling study,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 990, pp. 174–184, 2017, doi: 10.1016/j.aca.2017.07.033.

[76] G. Gübitz and M. G. Schmid, “Chiral separation principles in capillary electrophoresis,” vol. 792, pp. 179–225, 1997, doi: 10.1016/S0021-9673(97)00871-6

[77] Z. Juvancz, R. B. Kendrovics, R. Iványi, and L. Szenté, “The role of cyclodextrins in chiral capillary electrophoresis,” *Electrophoresis*, vol. 29, pp. 1701–1712, 2008, doi: 10.1002/elps.200700657.

[78] T. De Boer, R. A. De Zeeuw, G. J. De Jong, and K. Ensing, “Recent innovations in the use of charged cyclodextrins in capillary electrophoresis for chiral separations in pharmaceutical

analysis,” *Electrophoresis*, vol. 21, pp. 3220–3239, 2000, doi: 10.1002/1522-2683(20000901)21:15<3220::AID-ELPS3220>3.0.CO;2-X.

[79] Y. Dai *et al.*, “Cationic cyclodextrin as versatile chiral selector for enantiomeric separation in capillary electrophoresis,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1246, pp. 98–102, 2012, doi: 10.1016/j.chroma.2012.02.065.

[80] C. E. Evans and A. M. Stalcup, “Comprehensive strategy for chiral separations using sulfated cyclodextrins in capillary electrophoresis,” *Chirality*, vol. 15, pp. 709–723, 2003, doi: 10.1002/chir.10285.

[81] D. Koval, L. Severa, L. Adriaenssens, J. Vávra, F. Teplý, and V. Kašička, “Chiral analysis of helquats by capillary electrophoresis: Resolution of helical N-heteroaromatic dications using randomly sulfated cyclodextrins,” *Electrophoresis*, vol. 32, pp. 2683–2692, 2011, doi: 10.1002/elps.201100173.

[82] G. Hancu, L. A. Papp, G. Tóth, and H. Kelemen, “The use of dual cyclodextrin chiral selector systems in the enantioseparation of pharmaceuticals by capillary electrophoresis: An overview,” *Molecules*, vol. 26, pp. 2261, 2021, doi: 10.3390/molecules26082261.

[83] C. Guo and Y. Xiao, “Negatively charged cyclodextrins: Synthesis and applications in chiral analysis-A review,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 256, p. 117517, 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.117517.

[84] Y. Xiao *et al.*, “Chiral capillary electrophoresis with cationic pyrrolidinium- β -cyclodextrin derivatives as chiral selectors,” *J. Sep. Sci.*, vol. 33, pp. 1797–1805, 2010, doi: 10.1002/jssc.200900732.

[85] Y. Cui *et al.*, “Combined Use of Ionic Liquid and Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin for the Enantioseparation of Ten Drugs by Capillary Electrophoresis,” *CHIRALITY*, vol. 25, pp. 409–414, 2013, doi: 10.1002/chir.22168.

[86] A. Rousseau, P. Chiap, R. Ivanyi, J. Crommen, M. Fillet, and A. C. Servais, “Validation of a nonaqueous capillary electrophoretic method for the enantiomeric purity determination of R-flurbiprofen using a single-isomer amino cyclodextrin derivative,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1204, pp. 219–225, 2008, doi: 10.1016/j.chroma.2008.06.006.

[87] G. Galaverna, M. C. Paganuzzi, R. Corradini, A. Dossena, and R. Marchelli, “Enantiomeric separation of hydroxy acids and carboxylic acids by diamino- β -cyclodextrins (AB, AC, AD) in capillary electrophoresis,” *Electrophoresis*, vol. 22, pp. 3171–3177, 2001, doi: 10.1002/1522-

2683(200109)22:15<3171::AID-ELPS3171>3.0.CO;2-K.

[88] S. Wang, Y. Wang, J. Zhou, Y. Lu, J. Tang, and W. Tang, "Mono-6A-(4-methoxybutylamino)-6A- β -cyclodextrin as a chiral selector for enantiomeric separation," *J. Sep. Sci.*, vol. 37, pp. 2056–2061, 2014, doi: 10.1002/jssc.201400248.

[89] X. Ma, J. Cao, J. Yu, and L. Cai, "Evaluation of an ionic liquid chiral selector based on sulfobutylether- β -cyclodextrin in capillary electrophoresis," *J. Mol. Liq.*, vol. 362, pp. 119782, 2022, doi: 10.1016/j.molliq.2022.119782.

[90] W. Tang, T. T. Ong, and S. C. Ng, "Chiral separation of dansyl amino acids in capillary electrophoresis using mono-(3-methyl-imidazolium)- β cyclodextrin chloride as selector," *J. Sep. Sci.*, vol. 30, no. 9, pp. 1343–1349, 2007, doi: 10.1002/jssc.200600461.

[91] V. Cucinotta, A. Giuffrida, G. Grasso, G. Maccarrone, and G. Vecchio, "Ligand exchange chiral separations by cyclodextrin derivatives in capillary electrophoresis," *Analyst*, vol. 128, pp. 134–136, 2003, doi: 10.1039/b210003g.

[92] Q. Zhang, S. Xue, A. Li, and S. Ren, "Functional materials in chiral capillary electrophoresis," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 445, p. 214108, 2021, doi: 10.1016/j.ccr.2021.214108.

[93] A. H. Rageh and U. Pyell, "Imidazolium-based ionic liquid-type surfactant as pseudostationary phase in micellar electrokinetic chromatography of highly hydrophilic urinary nucleosides," *J. Chromatogr. A*, vol. 1316, pp. 135–146, 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2013.09.079.

[94] N. Treder *et al.*, "The critical evaluation of the effects of imidazolium-based ionic liquids on the separation efficiency of selected biogenic amines and their metabolites during MEKC analysis," *Talanta*, vol. 238, , 2022, doi: 10.1016/j.talanta.2021.122997.

[95] M. Borissova, K. Palk, and M. Koel, "Micellar electrophoresis using ionic liquids," *J. Chromatogr. A*, vol. 1183, pp. 192–195, 2008, doi: 10.1016/j.chroma.2007.12.077.

[96] E. Kolobova, L. Kartsova, A. Kravchenko, and E. Bessonova, "Imidazolium ionic liquids as dynamic and covalent modifiers of electrophoretic systems for determination of catecholamines," *Talanta*, vol. 188, pp. 183–191, 2018, doi: 10.1016/j.talanta.2018.05.057.

[97] C. Branco, C. Morais, and A. Lu, "Electroosmotic flow modulation in capillary electrophoresis by organic cations from," *Electrophoresis*, vol. 33, pp. 1182–1190, 2012, doi: 10.1002/elps.201100486.

[98] M. Greño, M. L. Marina, and M. Castro-Puyana, "Enantioseparation by Capillary

Electrophoresis Using Ionic Liquids as Chiral Selectors,” *Crit. Rev. Anal. Chem.*, vol. 48, pp. 429–446, 2018, doi: 10.1080/10408347.2018.1439365.

[99] H. Xu, Y. Du, Z. Feng, X. Sun, and J. Liu, “Synthesis of a chiral ionic liquid, cholinium-clindamycin phosphate, as sole chiral selector in capillary electrophoresis,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1615, p. 460721, 2020, doi: 10.1016/j.chroma.2019.460721.

[100] I. J. Stavrou and C. P. Kapnissi-Christodoulou, “Use of chiral amino acid ester-based ionic liquids as chiral selectors in CE,” *Electrophoresis*, vol. 34, pp. 524–530, 2013, doi: 10.1002/elps.201200469.

[101] M. Borissova, M. Vaher, M. Koel, and M. Kaljurand, “Capillary zone electrophoresis on chemically bonded imidazolium based salts,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1160, pp. 320–325, 2007, doi: 10.1016/j.chroma.2007.04.032.

[102] Q. Zhang, “Ionic liquids in capillary electrophoresis for enantioseparation,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 100, pp. 145–154, 2018, doi: 10.1016/j.trac.2018.01.001.

[103] S. M. Mwongela, A. Numan, N. L. Gill, R. A. Agbaria, and I. M. Warner, “Separation of Achiral and Chiral Analytes Using Polymeric Surfactants with Ionic Liquids as Modifiers in Micellar Electrokinetic Chromatography,” *Anal. Chem.*, vol. 75, pp. 6089–6096, 2003, doi: 10.1021/ac034386i.

[104] S. Salido-Fortuna, M. Greño, M. Castro-Puyana, M.L. Marina, “Amino acid chiral ionic liquids combined with hydroxypropyl- β -cyclodextrin for drug enantioseparation by capillary electrophoresis,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1607, pp. 460375, 2019, doi: 10.1016/j.chroma.2019.460375.

[105] Y. Franc, A. Varenne, E. Juillerat, D. Villemin, and P. Gareil, “Evaluation of chiral ionic liquids as additives to cyclodextrins for enantiomeric separations by capillary electrophoresis Yannis Franc,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1155, pp. 134–141, 2007, doi: 10.1016/j.chroma.2006.12.076.

[106] Q. Zhang *et al.*, “Enhanced enantioselectivity of native α -cyclodextrins by the synergy of chiral ionic liquids in capillary electrophoresis,” *J. Sep. Sci.*, vol. 41, pp. 4525–4532, 2018, doi: 10.1002/jssc.201800792.

[107] S. Ren, S. Xue, X. Sun, M. Rui, L. Wang, and Q. Zhang, “Investigation of the synergistic effect of chiral ionic liquids as additives in non-aqueous capillary electrophoresis for enantioseparation,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1609, pp. 460519, 2020, doi: 10.1016/j.chroma.2019.460519.

[108] Q. Zhang, X. Qi, C. Feng, S. Tong, and M. Rui, “Three chiral ionic liquids as additives for enantioseparation in capillary electrophoresis and their comparison with conventional modifiers,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1462, pp. 146–152, 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2016.07.066.

- [109] S. Salido-Fortuna, M. L. Marina, and M. Castro-Puyana, "Enantiomeric determination of econazole and sulconazole by electrokinetic chromatography using hydroxypropyl- β -cyclodextrin combined with ionic liquids based on L-lysine and L-glutamic acid," *J. Chromatogr. A*, vol. 1621, pp. 461085, 2020, doi: 10.1016/j.chroma.2020.461085.
- [110] Z. Wang, H. Guo, M. Chen, G. Zhang, R. Chang, and A. Chen, "Separation and determination of corynoxine and corynoxine B using chiral ionic liquid and hydroxypropyl- β -cyclodextrin as additives by field-amplified sample stacking in capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 39, pp. 2195–2201, 2018, doi: 10.1002/elps.201800129.
- [111] X. Ma, Y. Du, X. Sun, J. Liu, and Z. Huang, "Synthesis and application of amino alcohol-derived chiral ionic liquids, as additives for enantioseparation in capillary electrophoresis," *J. Chromatogr. A*, vol. 1601, pp. 340–349, 2019, doi: 10.1016/j.chroma.2019.04.040.
- [112] Y. Zhang, S. Du, Z. Feng, Y. Du, and Z. Yan, "Evaluation of synergistic enantioseparation systems with chiral spirocyclic ionic liquids as additives by capillary electrophoresis," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, pp. 2543–2555, 2016, doi: 10.1007/s00216-016-9356-8.
- [113] M. Greño, M. L. Marina, and M. Castro-Puyana, "Effect of the combined use of γ -cyclodextrin and a chiral ionic liquid on the enantiomeric separation of homocysteine by capillary electrophoresis," *J. Chromatogr. A*, vol. 1568, pp. 222–228, 2018, doi: 10.1016/j.chroma.2018.07.023.
- [114] M. Greño, A. Salgado, M. Castro-Puyana, and M. L. Marina, "Nuclear magnetic resonance to study the interactions acting in the enantiomeric separation of homocysteine by capillary electrophoresis with a dual system of γ -cyclodextrin and the chiral ionic liquid EtChoINTf₂," *Electrophoresis*, vol. 40, pp. 1913–1920, 2019, doi: 10.1002/elps.201800483.
- [115] M. Greño, M. Castro-Puyana, and M. L. Marina, "Enantiomeric separation of homocysteine and cysteine by electrokinetic chromatography using mixtures of γ -cyclodextrin and carnitine-based ionic liquids," *Microchem. J.*, vol. 157, p. 105070, 2020, doi: 10.1016/j.microc.2020.105070.
- [116] S. Salido-Fortuna, M. I. Fernández-Bachiller, M. L. Marina, and M. Castro-Puyana, "Synthesis and characterization of carnitine-based ionic liquids and their evaluation as additives in cyclodextrin-electrokinetic chromatography for the chiral separation of thiol amino acids," *J. Chromatogr. A*, vol. 1670, p. 462955, 2022, doi: 10.1016/j.chroma.2022.462955.
- [117] M. Greño, M. L. Marina, and M. Castro-Puyana, "Use of single and dual systems of γ -cyclodextrin or γ -cyclodextrin/L-Carnitine derived ionic liquid for the enantiomeric determination of cysteine by electrokinetic chromatography. A comparative study," *Microchem. J.*, vol. 169, pp. 106596,

2021, doi: 10.1016/j.microc.2021.106596.

[118] A. Rousseau *et al.*, “Development and validation of a nonaqueous capillary electrophoretic method for the enantiomeric purity determination of a synthetic intermediate of new 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyrans using a single-isomer anionic cyclodextrin derivative and an,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, pp. 7949–7955, 2010, doi: 10.1016/j.chroma.2010.07.005.

[119] X. Yang, Y. Du, Z. Feng, Z. Liu, and J. Li, “Establishment and molecular modeling study of maltodextrin-based synergistic enantioseparation systems with two new hydroxy acid chiral ionic liquids as additives in capillary electrophoresis,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1559, pp. 170–177, 2018, doi: 10.1016/j.chroma.2017.06.007.

[120] N. Casado, A. Salgado, M. Castro-Puyana, M. Á. García, and M. L. Marina, “Enantiomeric separation of ivabradine by cyclodextrin-electrokinetic chromatography. Effect of amino acid chiral ionic liquids,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1608, p. 460407, 2019, doi: 10.1016/j.chroma.2019.460407.

[121] Y. Zhang, Y. Du, T. Yu, Z. Feng, and J. Chen, “Investigation of dextrin-based synergistic system with chiral ionic liquids as additives for enantiomeric separation in capillary electrophoresis,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 164, pp. 413–420, 2019, doi: 10.1016/j.jpba.2018.10.002.

[122] T. Yu *et al.*, “Study on clarithromycin lactobionate based dual selector systems for the enantioseparation of basic drugs in capillary electrophoresis,” *J. Sep. Sci.*, vol. 38, 2015, pp. 2900–2906 doi: 10.1002/jssc.201400677.

[123] Карцова Л.А. Проблемы аналитической химии. Том 18. Капиллярный электрофорез/ Карцова Л.А., - Санкт-Петербург: Наука, 2014.- 444 с. - ISBN:978-5-02-039087-4.

[124] A. T. Aranas, A. M. G. Jr, and J. P. Quirino, “Sweeping and new on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 394, pp. 175–185, 2009, doi: 10.1007/s00216-009-2646-7.

[125] M. Katayama, Y. Matsuda, K. Shimokawa, and S. Kaneko, “Simultaneous determination of 16 estrogens, dehydroepiandrosterone and their glucuronide and sulfate conjugates in serum using sodium cholate micelle capillary electrophoresis,” *Biomed Chromatogr.* vol. 267, pp. 263–267, 2003, doi: 10.1002/bmc.236.

[126] H. Chao, H. Liao, and C. Kuo, “Using water plug-assisted analyte focusing by micelle collapse in combination with microemulsion electrokinetic chromatography for analyzing phthalate esters,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1445, pp. 149–157, 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2016.03.086.

[127] J. P. Quirino, P. Anres, J. S.- Plénet, N. Delaunay, and P. Gareil, "Potential of long chain ionic liquids for on-line sample concentration techniques : Application to micelle to solvent stacking," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, pp. 5718–5724, 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2011.06.071.

[128] J. P. Quirino and W. Grochocki, "Sample Concentration of Charged Small Molecules and Peptides in Capillary Electrophoresis by Micelle to Cyclodextrin Stacking," *Anal. Chem.* vol. 89, pp. 13422–13428 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.7b03700.

[129] C. Chu, C. Liu , F. Yang , L. Lian , J. Li, H. Mao, J. Yan "A dual preconcentration method by combining micro matrix solid-phase dispersion extraction with field-enhanced sample injection and micelle to cyclodextrin stacking for sensitive analysis of neutral coumarins," *Electrophoresis*, vol 42, pp. 1102–1108, 2021, doi: 10.1002/elps.202000273.

[130] G. Jarvas *et al.*, "Practical sample pretreatment techniques coupled with capillary electrophoresis for real samples in complex matrices," *Trends Anal. Chem.*, vol. 122, p. 115702, 2019, doi: 10.1016/j.trac.2019.115702.

[131] H. R. Rabanes, A. T. Aranas, N. L. Benbow, and J. P. Quirino, "Synergistic effect of field enhanced sample injection on micelle to solvent stacking in capillary electrophoresis," *CHROMA*, vol. 1267, pp. 74–79, 2012, doi: 10.1016/j.chroma.2012.08.073.

[132] P. Britz-McKibbin, K. Otsuka, and S. Terabe, "On-line focusing of flavin derivatives using dynamic pH junction-sweeping capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection," *Anal. Chem.*, vol. 74, pp. 3736–3743, 2002, doi: 10.1021/ac025701o.

[133] J. P. Quirino and S. Terabe, "Approaching a Million-Fold Sensitivity Increase in Capillary Electrophoresis with Direct Ultraviolet Detection : Cation-Selective Exhaustive Injection and Sweeping," *Anal. Chem.*, vol. 72, pp. 1023–1030, 2000, doi: 10.1021/ac990344b.

[134] T. Hirokawa and H. Okamoto, "High-sensitive capillary zone electrophoresis analysis by electrokinetic injection with transient isotachophoretic preconcentration: electrokinetic supercharging," *Electrophoresis*, vol. 24, pp. 498–504, 2003, doi: 10.1002/elps.200390058.

[135] J. P. Quirino, "Two-step stacking in capillary zone electrophoresis featuring sweeping and micelle to solvent stacking : I. Organic cations," *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, pp. 7776–7780, 2010, doi: 10.1016/j.chroma.2010.10.020.

[136] W. Grochocki, M. J. Markuszewski, and J. P. Quirino, "Three-step stacking of cationic analytes by field-enhanced sample injection , sweeping , and micelle to solvent stacking in capillary electrophoresis," *J. Chromatogr. A*, vol. 1424, pp. 111–117, 2015, doi: 10.1016/j.chroma.2015.10.089.

[137] M. Hernández-mesa, D. Airado-rodríguez, C. Cruces-blanco, and A. M. García-campa, “Novel cation selective exhaustive injection-sweeping procedure for 5-nitroimidazole determination in waters by micellar electrokinetic chromatography using dispersive liquid – liquid microextraction,” vol. 1341, pp. 65–72, 2014, doi: 10.1016/j.chroma.2014.03.026.

[138] M. Hern, D. Airado-rodr, A. M. Garc, and C. Cruces-blanco, “Short Communication Development of an ultrasensitive stacking technique for 5-nitroimidazole determination in untreated biological fluids by micellar electrokinetic chromatography,” pp. 2538–2542, 2015, doi: 10.1002/elps.201500193.

[139] Y. Yao, L. Zhou, M. Li, and X. Guo, “The cation-selective exhaustive injection and sweeping capillary electrophoresis method for the analysis of chlorpheniramine enantiomers in rat plasma,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 148, pp. 142–148, 2018, doi: 10.1016/j.jpba.2017.09.021.

[140] Y.Liu, L. Yu, H. Zhang, D. Chen, “Dispersive micro-solid-phase extraction combined with online preconcentration by capillary electrophoresis for the determination of glycopyrrolate stereoisomers in rat plasma,” *J Sep Sci.*, vol. 41, pp. 1395–1404, 2018, doi: 10.1002/jssc.201700753.

[141] C. Chu *et al.*, “An efficient matrix solid-phase dispersion extraction combined with online preconcentration by electrokinetic supercharging in capillary electrophoresis for the sensitive determination of two alkaloids in complicated samples matrix,” *Microchem. J.*, vol. 178, p. 107314, 2022, doi: 10.1016/j.microc.2022.107314.

[142] A. Pérez-alcaraz, F. Borrull, C. Aguilar, and M. Calull, “An electrokinetic supercharging approach for the enantiodetermination of cathinones in urine samples by capillary electrophoresis,” *Microchem. J.*, vol. 158, p. 105300, 2020, doi: 10.1016/j.microc.2020.105300.

[143] W. Li, Z. Qian, C. Li, D. Guo, and J. Wei, “On-Line Electrokinetic Supercharging and Sweeping for the Preconcentration and Determination of Nucleosides and Related Compounds by Capillary Electrophoresis,” *Electrophoresis*, vol. 53, pp. 1919–1931, 2020, doi: 10.1080/00032719.2020.1725033

[144] S. S. Wells and R. T. Kennedy, “CE-MS with electrokinetic supercharging and application to determination of,” *Electrophoresis*, vol. 40, pp. 2946-2953, 2019, doi: 10.1002/elps.201900203.

[145] S. Hsu, C. Hu, and T. Chiu, “Online dynamic pH junction – sweeping for the determination of benzoic and sorbic acids in food products by capillary electrophoresis,” *Anal Bioanal Chem.* vol. 406, pp. 635–641, 2014, doi: 10.1007/s00216-013-7481-1.

[146] X. Xu, Z. Jia, Y. Shu, and L. Liu, “Dynamic pH junction – sweeping technique for on-line concentration of acidic amino acids in human serum by capillary electrophoresis with indirect UV detection,” *J. Chromatogr. B*, vol. 980, pp. 20–27, 2015, doi: 10.1016/j.jchromb.2014.12.009.

[147] Y. Chen, L. Zhang, and G. Chen, “Dynamic pH junction – sweeping for on-line focusing of dipeptides in capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection,” *Analyst*, vol. 136, 1852–1858 pp. 1852–1858, 2011, doi: 10.1039/c0an00744g.

[148] P. Britz-mckibbin and S. Terabe, “On-line preconcentration strategies for trace analysis of metabolites by capillary electrophoresis,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1000, pp. 917–934, 2003, doi: 10.1016/s0021-9673(03)00502-8.

[149] X. Yang, S. Zhang, J. Wang, C. Wang, and Z. Wang, “On-line two-step stacking in capillary zone electrophoresis for the preconcentration of strychnine and brucine,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 814, pp. 63–68, 2014, doi: 10.1016/j.aca.2014.01.027.

[150] X. Yang, X. Cheng, Y. Lin, Z. Tan, L. Xie, and M. M. F. Choi, “Determination of three nitroimidazoles in rabbit plasma by two-step stacking in capillary zone electrophoresis featuring sweeping and micelle to solvent stacking,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1325, pp. 227–233, 2014, doi: 10.1016/j.chroma.2013.11.053.

[151] L. Yien, H. Heng, and J. P. Quirino, “Field-enhanced sample injection-micelle to solvent stacking in nonaqueous capillary electrophoresis,” *Talanta*, vol. 161, pp. 165–169, 2016, doi: 10.1016/j.talanta.2016.08.054.

[152] A. Simbut, M. Mizwaruddin, L. Yien, S. Sami, H. Yin, and H. Heng, “Online sample preconcentration techniques in nonaqueous capillary and microchip electrophoresis,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1638, 2021, doi: 10.1016/j.chroma.2020.461868.

[153] C. Chu, M. Wei, C. Liu, H. Li, J. Cao, and J. Yan, “Over 1000-fold improvement in an online preconcentration of trace anionic compounds by capillary electrophoresis with ionic liquid micelle-based three-step stacking,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1044, pp. 191–197, 2018, doi: 10.1016/j.aca.2018.08.027.

[154] C. Chu *et al.*, “A simple and sensitive preconcentration strategy by coupling salting-out assisted liquid-liquid extraction with online three-step stacking for the determination of potent anti-tumour compound vinblastine and its precursor in biological samples by capillar,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1664, p. 462794, 2022, doi: 10.1016/j.chroma.2021.462794.

[155] C. Chu *et al.*, “Online preconcentration and determination of anthraquinones in Cassiae

Semen tea by salting-out assisted liquid – liquid extraction coupled with dynamic pH junction-sweeping-large volume sample stacking in capillary electrophoresis,” *LWT*, vol. 170, p. 114014, 2022, doi: 10.1016/j.lwt.2022.114014.

[156] C. Cheng, H. Kou, S. Wu, and C. Wang, “A chemometric experimental design with three-step stacking capillary electrophoresis for analysis of five tobacco-specific nitrosamines in cigarette products,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1677, p. 463283, 2022, doi: 10.1016/j.chroma.2022.463283.

[157] C. Cheng, W. Feng, W. Tang, and H. Kou, “A three-step stacking capillary electrophoresis of field-amplified sample injection, sweeping, and micellar collapse for determination of dabigatran and its active metabolite in human plasma,” *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 30, pp. 88-103, 2022, doi: 10.38212/2224-6614.3391.

[158] L. Liu, Q. Wan, X. Xu, S. Duan, and C. Yang, “Combination of micelle collapse and field-amplified sample stacking in capillary electrophoresis for determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in animal-originated foodstuffs,” *Food Chem.*, vol. 219, pp. 7–12, 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.118.

[159] T. Mikuma *et al.*, “Approaching over 10 000-fold sensitivity increase in chiral capillary electrophoresis : Cation-selective exhaustive injection and sweeping cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography,” *Electrophoresis*, vol. 37, pp. 2970-2976, 2016, doi: 10.1002/elps.201600324.

[160] W. Wang, H. Zhang, S. Qi, H. Chen, and X. Chen, “Determination of enantiomers by FESI-sweeping with an acid-labile sweeper in nonaqueous capillary electrophoresis,” *Analyst*, vol. 140, pp. 4253–4259, 2015, doi: 10.1039/c5an00283d.

[161] R. Zhou *et al.*, “Stereoselective enrichment and determination of citalopram enantiomers by cation-selective exhaustive injection and sweeping coupled with cyclodextrin modified electrokinetic chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1669, p. 462951, 2022, doi: 10.1016/j.chroma.2022.462951.

[162] Y. Yao, B. Zhang, S. Li, J. Yu, and X. Guo, “Enantioselective analysis of pheniramine in rat using large volume sample stacking or cation-selective exhaustive injection and sweeping coupled with cyclodextrin modified electrokinetic chromatography,” *Talanta*, vol. 192, pp. 226–232, 2019, doi: 10.1016/j.talanta.2018.09.052.

[163] E. Lin, K. Lin, C. Chang, and M. Hsieh, “On-line sample preconcentration by sweeping and poly (ethylene oxide) -mediated stacking for simultaneous analysis of nine pairs of amino acid enantiomers in capillary electrophoresis,” *Talanta*, vol. 114, pp. 297–303, 2013, doi: 10.1016/j.talanta.2013.05.039.

- [164] Z. Wang, C. Liu, and J. Kang, "A highly sensitive method for enantioseparation of fenoprofen and amino acid derivatives by capillary electrophoresis with on-line sample preconcentration," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, pp. 1775–1779, 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2011.01.081.
- [165] Z. R. Wang and M. M. Hsieh, "Ultrasound-assisted dispersive liquid – liquid microextraction coupled with field-amplified capillary electrophoresis for sensitive and quantitative determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in biological fluids," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 412, pp. 5113–5123, 2020, doi: 10.1007/s00216-020-02441-x.
- [166] J. Wen *et al.*, "Enantioselective Separation of Mirtazapine and Its Metabolites by Capillary Electrophoresis with Acetonitrile Field-Amplified Sample Stacking and Its Application," *Molecules*, vol. 19, pp. 4907–4923, 2014, doi: 10.3390/molecules19044907.
- [167] H. R. Rabanes and J. P. Quirino, "Sweeping of alprenolol enantiomers with an organic solvent and sulfated β -cyclodextrin in capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 34, pp. 1319–1326, 2013, doi: 10.1002/elps.201200595.
- [168] Y. Yu, S. Zhu, M. Shi, F. Liu, and J. Cao, "Two-step micelle-to-solvent stacking of arsenic species from foods in permanently coated tubing for capillary electrophoresis," *J. Chromatogr. A*, vol. 1673, p. 463112, 2022, doi: 10.1016/j.chroma.2022.463112.
- [169] L. Lian, Y. Zang, F. Yang, E. Liu, J. Yan, and S. Tong, "Online preconcentration methodology that realizes over 2000-fold enhancement by integrating the free liquid membrane into electrokinetic supercharging in capillary electrophoresis for the determination of trace anionic analytes in complex samples," *Microchem. J.*, vol. 174, p. 107033, 2022, doi: 10.1016/j.microc.2021.107033.
- [170] D. A. El-hady and H. M. Albishri, "Simultaneous determination of acrylamide, asparagine and glucose in food using short chain methyl imidazolium ionic liquid based ultrasonic assisted extraction coupled with analyte focusing by ionic liquid micelle collapse capillary electrophoresis," *Food Chem.*, vol. 188, pp. 551–558, 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.05.047.
- [171] D. A. El-hady and H. M. Albishri, "Protein / ionic liquid / glassy carbon sensors following analyte focusing by ionic liquid micelle collapse for simultaneous determination of water soluble vitamins in plasma matrices," *Talanta*, vol. 139, pp. 150–158, 2015, doi: 10.1016/j.talanta.2015.02.025.
- [172] S. Hsieh, C. Wang, H. Kou, and S. Wu, "Analysis Dialkyl anionic surfactant in field-amplified sample injection and sweeping-micellar electrokinetic chromatography for determination of eight leanness-promoting β -agonists in animal feeds," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 141, pp. 222–228, 2017, doi: 10.1016/j.jpba.2017.04.013.

[173] Y. Chang, Z. Wang, and M. Hsieh, "Sensitive determination of warfarin and its metabolic enantiomers in body fluids via capillary electrophoresis combined with ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and online sample stacking," *Microchem. J.*, vol. 146, pp. 1276–1284, 2019, doi: 10.1016/j.microc.2019.02.065.

[174] Q. Yan, M. Chen, and M. Hsieh, "Ultrasensitive analysis of mirtazapine and its metabolites enantiomers in body fluids using ultrasound-enhanced and surfactant-assisted dispersive liquid – liquid microextraction followed by polymer-mediated stacking in capillary electrophoresis," *J. Chromatogr. A*, vol. 1678, p. 463328, 2022, doi: 10.1016/j.chroma.2022.463328.

[175] B. Brady, N. Lynam, T. O'Sullivan, C. Ahern, and R. Darcy, "6A-O-p-TOLUENESULFONYL-b-CYCLODEXTRIN," *Org. Synth.*, vol. 77, p. 220, 2000, doi: 10.15227/orgsyn.077.0220.

[176] J. Cai *et al.*, "Corrosion inhibition effect of three imidazolium ionic liquids on carbon steel in chloride contaminated environment," *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 15, pp. 1287–1301, 2020, doi: 10.20964/2020.02.12.

[177] M. M. Mahlambi and T. J. Malefetse, "β -Cyclodextrin-ionic liquid polyurethanes for the removal of organic pollutants and heavy metals from water : synthesis and characterization," *J. Polym. Res.*, vol. 17, pp. 589–600, 2010, doi: 10.1007/s10965-009-9347-y.

[178] C. Lancioni, S. Keunchkarian, C. B. Castells, and L. G. Gagliardi, "Determination of thermodynamic binding constants by affinity capillary electrophoresis," *Talanta*, vol. 192, pp. 448–454, 2019, doi: 10.1016/j.talanta.2018.09.044.

[179] А. А. Сидорова, Л.А. Карцова, "Хроматографическое и электрофоретическое определение катехоламинов , метанефринов и 3 , 4- дигидроксифенилаланина в моче и плазме крови" *Сорбционные и хроматографические процессы*, Т. 10, Выпуск 4, с. 533–542, 2010.

[180] C. Diez-masa, A. Cifuentes, P. Canalejas, and A. Ortega, "Treatments of fused-silica capillaries and their influence on the electrophoretic characteristics of these columns before and after coating," *J. Chromatogr. A*, vol. 823, pp. 561–571, 1998, doi: 10.1016/S0021-9673(98)00295-7.

[181] E.A.Kolobova, L.A. Kartsova, E.A. Bessonova, A.V. Kravchenko, "On-line concentration of biogenic amines by capillary electrophoresis method using the synthesized covalent coating based on the imidazolium ionic liquids", *Analytics and Control*, vol. 21, pp. 57-64, 2017, doi: 10.15826/analitika.2017.21.1.006.

[182] A. Kravchenko, E. Kolobova, L. Kartsova, "Multifunction covalent coatings for separation

of amino acids, biogenic amines, steroid hormones, and ketoprofen enantiomers by capillary electrophoresis and capillary electrochromatography”. *Sep Sci plus*, vol. 3, pp. 102-111, 2020, doi: 10.1002/sscp.201900098.

[183] H. Zhang, T. Tan, C. Hetényi, Y. Lv, and D. Van Der Spoel, “Cooperative binding of cyclodextrin dimers to isoflavone analogues elucidated by free energy calculations,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 118, pp. 7163–7173, 2014, doi: 10.1021/jp412041d.

[184] S. Fourmentin, G. Crini, E. Lichtfouse. *Cyclodextrin Applications in Medicine , Food , Environment and Liquid Crystals/* - S. Fourmentin, G. Crini, E. Lichtfouse.- 1st Edition. -Springer Cham. - p. 240. - ISBN 978-3-319-76162-6.

[185] A.V. Kravchenko, E.A. Kolobova, L.A. Kartsova, “Usage of 3-methyl-1- β -cyclodextrinimidazole tosylate for electrophoretic separation and preconcentration of corticosteroids by capillary electrophoresis”, *Monatsh Chem.* vol. 152, pp. 1067–1074, 2021, doi: 10.1007/s00706-021-02809-4

[186] A.V. Kravchenko, E.A. Kolobova, A.A. Kechin, L.A. Kartsova, “Development of a capillary electrophoretic method for determination of ketorolac enantiomers in human plasma using cationic β -cyclodextrin derivative as a chiral selector”, *Journal of Separation Science*, vol. 46, pp. 2200601, 2022, doi: 10.1002/jssc.202200601

[187] J. P. Quirino, “Micelle to solvent stacking of organic cations in capillary zone electrophoresis with electrospray ionization mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, pp. 294–299, 2009, doi: 10.1016/j.chroma.2008.11.062.

[188] K. Maráková, J. Piešťanský, Z. Zelinková, P. Mikuš, “Simultaneous Determination of Twelve Biogenic Amines in Human Urine as Potential Biomarkers of Inflammatory Bowel Diseases by Capillary Electrophoresis - Tandem Mass Spectrometry”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, pp. 113294, 2020, doi:10.1016/j.jpba.2020.113294.

[189] E.A. Bessonova, L.A. Kartsova, V.F. Gallyamova, “Effect of 3-methyl-1-cetylimidazolium chloride ionic liquid on the electrophoretic preconcentration of steroid hormones”, *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 71, pp. 696–702, 2016, doi:10.1134/s1061934816070042.

[190] F. K.Główka, M. Karaźniewicz, “High performance capillary electrophoresis for determination of the enantiomers of 2-arylpropionic acid derivatives in human serum”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 35, pp. 807–816, 2004, doi:10.1016/j.jpba.2004.01.030.