

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕОФИЛЛИНА И ТЕОБРОМИНА В ЧЕРНОМ ЧАЕ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЗОННОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА С ПРИМЕНЕНИЕМ СТЭКИНГА С БОЛЬШИМ ОБЪЕМОМ ОБРАЗЦА

***Е.А. Тищенко, Т.Г. Цюпко, И.Э. Журавлева**

*Кубанский государственный университет,
Российская Федерация, 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, 149*

**Адрес для переписки: Тищенко Екатерина Александровна, e-mail: ekaterina-pydyk@mail.ru*

Поступила в редакцию 19 августа 2022, после доработки - 17 ноября 2022

В работе обсуждаются некоторые особенности формирования метилксантинов в процессе роста и развития чайного листа, обобщена информация о содержании минорных метилксантинов – теобромину (ТБ) и теофиллину (ТФ) в чайной продукции. Обоснована целесообразность применения ТБ и ТФ в качестве веществ - маркеров, характеризующих качество чая. В работе изучены возможности и ограничения электрофоретических методов определения ТБ и ТФ в чайной продукции. Проведены экспериментальные исследования по разработке методики определения ТБ и ТФ в черном чае методом капиллярного зонного электрофореза с применением процедуры он-лайн концентрирования аналитов – стэкинга с большим объемом образца (LVSS-КЗЭ-УФ). Оптимизированными условиями разделения аналитов являются: электролит - боратный буферный раствор с pH 9.8 и концентрацией 90 мМ, напряжение в системе – 20 кВ. Для концентрирования аналитов предложены: время ввода разбавленного в 40 раз экстракта чая (1.00 г на 100 мл воды) – 200 с при 50 мбар; время обращения полярности 1.5-1.7 мин при напряжении -10 кВ. В выбранных условиях факторы эффективности концентрирования ТБ и ТФ составили 28 и 38, соответственно. Время анализа не превышало 22 мин. Для разработанной методики оценены повторяемость, внутрилабораторная прецизионность, правильность и точность результатов определения аналитов в образцах черного чая. Установлено, что при определении ТБ (в диапазоне 0.04 – 4.0 мг/г чая) и ТФ (в диапазоне 0.04 – 1.0 мг/г) в чае относительное стандартное отклонение результатов определения аналитов $\sigma(\Delta)$ составляет 7 и 12 %, соответственно. Содержания аналитов в различных образцах черного чая, полученные по разработанной методике, варьируются в диапазонах от 0.14 до 2.32 мг/г для ТБ и от «< 0.040» до 0.15 мг/г для ТФ.

Ключевые слова: капиллярный зонный электрофорез, он-лайн концентрирование, стэкинг с большим объемом образца (LVSS), теофиллин, теобромин, чай.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2022, vol. 26, no. 4, pp. 265-275

DOI:10.15826/analitika.2022.26.4.003

THEOBROMINE AND THEOPHYLLINE DETERMINATION IN BLACK TEA BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS USING LARGE VOLUME SAMPLE STACKING

E.A. Tishchenko*, T.G. Tsiupko, I. E. Zhuravleva

*Kuban State University, 149 Stavropolskaia St., Krasnodar, 350040,
Russia Federation*

**Corresponding author: Ekaterina A. Tishchenko, e-mail: ekaterina-pydyk@mail.ru*

Submitted 19 August 2022, received in revised form - 17 November 2022

Some features of the formation of methylxanthines during growth and development of tea leaves are discussed, and the information about the content of minor methylxanthines, theobromine (TB) and theophylline (TF), in tea products is summarized. The expediency of using TB and TF as marker substances characterizing

the quality of tea is substantiated. Possibility and limitations of using electrophoretic methods for TB and TF determination in tea products were investigated. Experimental studies were carried out to develop a method for TB and TF determination in black tea by capillary zone electrophoresis using the procedure of analytes online concentration – large volume sample stacking (LVSS-CZE-UV). Optimized conditions for the analytes separation were using the borate buffer solution (pH = 9.8, 90 mM concentration) and 20 kV voltage in the system. The following conditions for the analytes concentrating were proposed: time for introducing a 40-fold diluted tea extract (1.0 g per 100 ml of water) was 200 s at 50 mbar; the polarity reversal time was 1.5–1.7 min at a voltage of –10 kV. Under the selected conditions, the TB and TF concentration efficiency factors were 28 and 38, respectively. The analysis time did not exceed 22 min. For the developed method, the repeatability, intralaboratory precision, trueness and accuracy of the results of analytes determination in black tea samples were evaluated.

Determining TB (0.04–4.0 mg/g concentration range) and TF (0.04–1.0 mg/g concentration range) in tea showed that the relative standard deviation of the results of the analytes determination $\sigma(\Delta)$ did not exceed 7 and 12 %, respectively. Analysis of various samples of black tea using the developed method showed that TB content ranged from 0.14 to 2.32 mg/g and TF content ranged from “< 0.040” to 0.15 mg/g.

Keywords: capillary zone electrophoresis, on-line concentration, large volume sample stacking (LVSS), theobromine, theophylline, tea

ВВЕДЕНИЕ

Основными этапами, влияющими на конечный состав и качество чая, являются выращивание сырья и его технологическая обработка. С увеличением возраста чайного куста меняется содержание некоторых компонентов в отдельных частях чайной ветки. Верхушечные молодые листья содержат большее количество фенольных соединений, аминокислот и кофеина по сравнению с более старыми листьями нижнего яруса ветки [1, 2]. Эти соединения, сохраняющиеся в готовом продукте, в совокупности с другими экстрактивными веществами формируют органолептические характеристики чая, а также оказывают положительные физиологические эффекты на организм человека [3, 4]. Для получения высококачественного чая предпочтительно использование почек с одним или двумя молодыми листьями, которые содержат высокие концентрации биологически активных веществ.

Особенности роста и развития чайного листа, знание информации о его компонентном составе и технологии производства могут быть полезны для выявления потенциальных веществ - маркеров, характеризующих качество чая. Основным предшественником биосинтеза кофеина (КФ) в листьях чая является теобромин (ТБ) [5]. Наиболее интенсивное образование КФ наблюдается в молодых листьях. Скорость катаболизма (разложения) КФ достаточно низка, он накапливается в чайных листьях как основной пуриновый алкалоид. Процесс образования теофиллина (ТФ) в чайных листьях не столь интенсивен. Более того, разрушение этого минорного компонента протекает быстро в зрелых и старых листьях, однако молодые листья катаболизируют его медленнее [5]. Содержание ТБ снижается с увеличением зрелости листа [6], а ТФ обнаруживается только в почке и первом верхушечном листе [7]. Учитывая вышеперечисленные физиологические процессы трансформации ТБ и ТФ в растении, представляется интересным изучить их в качестве потенциальных веществ - маркеров, характеризующих качество чая.

Наибольшее применение для определения пуриновых алкалоидов в чае имеют хроматографические, в меньшей степени – электрофоретические методы [8 - 10]. Электрофоретические методы активно развиваются в последние годы и являются весьма перспективными для многокомпонентного анализа образцов со сложной матрицей. Преимуществами метода капиллярного электрофореза (КЭ) являются высокая эффективность разделения аналитов, возможность проведения анализа в широком диапазоне pH, низкий расход реагентов, а также экспрессность определения. Для электрофоретического определения ТБ и ТФ в чайной продукции применяют методики, в которых разделение метилксантинов проводят в среде боратного буферного раствора со значением pH, превышающем показатель константы диссоциации (pK_a) соответствующих аналитов (табл. 1). Для этих целей используют электролиты с невысокой концентрацией борат-ионов (15 - 30 мМ) [11, 12]. В случае одновременного определения ТБ, ТФ и других анионных или нейтральных компонентов чая (фенольных соединений и кофеина) необходимо применять в составе буферного раствора высокие концентрации борат-ионов (100-150 мМ) [13, 14], вводить в электролит соли фосфорной кислоты, додецилсульфат натрия [15 - 18] и/или циклодикстрин [19, 20].

Приведенные в табл. 2 электрофоретические методики определения ТБ и ТФ в различной чайной продукции в большинстве случаев не позволяют обнаружить теофиллин, содержание которого в экстрактах составляет сотые доли мкг/мл. Принимая во внимание, что этот компонент может служить маркером качества чая, необходимо разрабатывать и использовать в практике производственных и аналитических лабораторий методики, обеспечивающие низкие пределы его обнаружения. Для этих целей в методе КЭ целесообразно применить более высокочувствительные способы детектирования и процедуры *он-лайн* концентрирования аналитов в капилляре.

Таблица 1

Примеры электрофоретического определения ТБ и ТФ в чае

Table 1

Examples of electrophoretic determination TB and TF in tea

Метод	Объект анализа	Аналит	Фоновый электролит	Капилляр $d \times l_{об} (l_{эф})$	Ввод образца	U, T	Детектирование ¹	Источник
КЗЭ	Чайные листья	ТБ, ТФ , КФ	15 мМ ББР, рН 9.2	75 мкм × 72 (50) см	ИС, 20 нл	15 кВ	УФ, 274 нм	11
	Чайные листья, чай	ТФ, ТБ , КФ	30 мМ ББР, рН 10.0	75 мкм × 35 (25) см	ИС, силой ЭОП 10 с	12 кВ	УФ, 274 нм	12
	Зеленый чай	ТФ , АД, ГН, ГК, К, МК	100 мМ ББР, рН 10.0	25 мкм × 40 см	ЭК, 10 кВ × 6 с	10 кВ	ЭХ, +0,95 В	13
	Зеленый, черный чай	ТФ , КФ, АД, КТ, КВ, КК, ГК	150 мМ ББР, рН 8.5	75 мкм × 57 см	ИС, ГД 10 с	20 кВ, 20 °С	УФ, 210 нм	14
МЭКХ	Зеленый, черный чай	ТФ, ТБ , КФ, КТ, ГК, ТН, ТФ, в.С	10 мМ PO ₄ ³⁻ , 4 мМ Na ₂ B ₄ O ₇ , 45 мМ ДДСН, 0.5 % MeOH, рН 7.0	50 мкм × 47 (38.5) см	ГД, 30 мбар × 5 с	20 кВ, 30 °С	УФ, 205 нм	15
	Зеленый чай	ТФ, ТБ , КФ, ПК	20 мМ ФБР, 40 мМ ДДСН, рН 11.0	50 мкм × 60 (25) см	ГД, 2 нл	29.5 кВ	УФ, 274 нм	16
	Зеленый, черный чай	ТФ, ТБ , КФ, КТ, ГК	8.3 мМ Na ₂ B ₄ O ₇ , 10 мМ K ₂ PO ₄ , 66.7 мМ ДДСН, рН 7.0	50 мкм × 47 (40) см	ГД, ~34 мбар × 1 с	30 кВ, 29 °С	УФ, 200 нм	17
МЭКХ, свипинг	Напиток зеленого чая	ТФ, ТБ , КФ	100 мМ ББР, 100 мМ ДДСН, рН 10.55	50 мкм	СИ, 25В × 24 мкс	10 кВ	УФ, 274 нм	18
ЦД-КЗЭ	Разные типы чая	ТФ , КФ, АД, КТ, ТФ КК, ГК	200 мМ H ₃ BO ₃ (рН 7.2), 10 мМ K ₂ PO ₄ (рН 4.2), 4.5 мМ β-ЦД, 27.5% АЦН	50 мкм × 40 см (у.св.ч)	ГД, 25 мбар × 3 с	25 кВ, 30 °С	УФ, 205 нм	19
ЦД-МЭ-КХ	Зеленый чай	ТФ, ТБ , КФ, КТ	25 мМ БФБР, 90 мМ ДДСН, 25 мМ β-ЦД, рН 2.5	50 мкм × 30 (8.5) см	ГД, 25 мбар × 2 с	15 кВ, 25 °С	УФ, 200 нм	20

*КФ – кофеин, ТБ – теобромин, ТФ – теofilлин, АД-аденин, ГН- гуанин, ГК - гипоксантин, ПК - параксантин, К-ксантин, МК- мочева кислота, ГК- галловая кислота, КВ- кверцетин, ТН - теанин, КК- кофейная кислота, КТ- катехины, ТФН- теафлавины, в.С – витамин С, ББР – боратный буферный раствор, ФБР – фосфатный буферный раствор, БФБР - борат-фосфатный буферный раствор, ДДСН додецилсульфат натрия, MeOH- метанол, АЦН- ацетонитрил, β-ЦД - гидроксипропил-бета-циклодекстрин, у.св.ч – уширенная световая часть, ИС- инъекционная система, ЭК-электрокинетический, ГД- гидродинамический, ЭХ- электрохимический, СИ – система струйной инъекции.

Целью настоящей работы являлась разработка методики определения минорных компонентов чая – теобромина и теofilлина, методом капиллярного зонного электрофореза с применением процедуры он-лайн концентрирования – стэкинга с большим объемом образца.-

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования. Объектами исследования являлись образцы листового черного чая разных коммерческих наименований: «365 дней»,

«Краснодарский», «Цейлонский» (Россия); «Сапау» (Япония); «Да Хун Пао», «Черный бархат» (Китай); «Сокровища Кении» (Кения); «Асаи» (Индия).

Реактивы и материалы. Исследования проводили с использованием следующих реактивов (Sigma-Aldrich): борная кислота (≥ 99.5 %), гидроксид натрия (≥ 98 %), теобромин (≥ 98 %), теofilлин безводный (≥ 99 %).

Оборудование. Для проведения исследований использовали систему капиллярного электрофореза Agilent^{3D} CE G1600A («Agilent Technologies», США) с диодно-матричным детектированием. Разделение

Таблица 2

Содержание теофиллина и теобромина в чайных листьях и различных типах чая

Table 2

Theophylline and theobromine content of in tea leaves and different types of tea

Аналит	Образец	Содержание, мг/г	Метод	Предел обнаружения, мкг/мл	Предел определения, мкг/мл	Источник			
ТФ	Бутон листа	1.3	КЗЭ	-	-	7			
	1 лист	1.8							
	2-12 лист	не н.							
	Чайные листья	0.068	КЗЭ	-	-	12			
		2.64							
	Зеленый чай	2.077	КЗЭ	-	0.077	13			
		не н.					0.12	0.03	14
							-	-	19
		МЭКХ	-	0.011	17				
			2	1	21				
	Зеленый бутиллир. чай	не н.	МЭКХ	-	0.18	18			
	Лун-цзин, улун, пуэр	не н.	КЗЭ	-	-	19			
	Черный чай	не н.	КЗЭ	-	-	19			
			МЭКХ	2	1	21			
	Чай	4.7	КЗЭ	-	-	12			
не н.			КЭХ	0.39	1.31	22			
		МЭКХ	2	1	21				
0.7			-	16					
Чай матэ	не н.	МЭКХ	< 1	-	23				
ТБ	Чайные листья	0.095	КЗЭ	-	-	12			
		2.28					2.1	7	11
	Зеленый чай	9.6	МЭКХ	-	0.017	17			
	Зеленый бутиллир. чай	не н.	МЭКХ	-	0.18	18			
	Чай	не н.	МЭКХ	0.7	-	16			
			КЗЭ	-	-	12			
	Матэ	не н.	МЭКХ	< 1	-	23			

Примечание: не н. – не найдено

проводили в немодифицированном кварцевом капилляре с эффективной длиной 50 см (общая длина 56 см), внутренним диаметром 50 мкм и с уширенной световой частью ($\times 3$). Сбор и обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Chemstation.

Для центрифугирования образцов использовали центрифугу MiniSpin, Eppendorf (Германия). Для контроля pH растворов использовали анализатор жидкости «Эксперт-001» (НПП «Эконикс-Эксперт, Россия, г. Москва).

Методы исследования. Определение теобромина и теофиллина в модельных растворах и экстрактах образцов чая проводили методом капиллярного зонного электрофореза с ультрафиолетовым детектированием (КЗЭ - УФ).

Приготовление стандартных растворов теофиллина и теобромина, фонового электролита и образцов чая. Стандартные растворы ТФ (100 мкг/мл) и ТБ (100 мкг/мл) готовили растворением

соответствующих навесок в бидистиллированной воде. Рабочие растворы готовили разбавлением стандартных до необходимых концентраций.

Боратные буферные растворы, применяемые в качестве фонового электролита, готовили разбавлением бидистиллированной водой водного раствора борной кислоты (250 мМ) до необходимой концентрации, требуемое значение pH устанавливали добавлением гидроксида натрия (1 М). Все растворы перед вводом в капилляр отфильтровывали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм и дегазировали центрифугированием в течение 3 мин (7000 об/мин).

Пробу чая готовили завариванием 1.00 г чая в кипящей бидистиллированной воде объемом 80-90 мл и выдерживанием на водяной бане в течение 45 мин с последующей фильтрацией охлажденного экстракта и доведением объема экстракта до 100 мл. Полученный экстракт разбавляли в 2 раза при проведении анализа со стандартным вводом пробы (т.е. без концентрирования аналитов) и в

Таблица 3

Основные условия электрофоретического определения теофиллина и теобромина

Table 3

Principal conditions for theophylline and theobromine electrophoretic determination

Этапы анализа	Параметры метода	Значение параметров	
		КЗЭ	LVSS-КЗЭ
Кондиционирование капилляра	Время промывки раствором 0.1 М NaOH, мин	3	
	Время промывки ведущим электролитом, мин	3	
Ввод пробы	Время, с	5	200
	Давление, мбар	50	
Концентрирование аналита	Время обращения $t_{обр}$, мин	-	1.65 ¹ (1.4 ²)
	Напряжение обращение $U_{обр}$, кВ	-	-10
Разделение	Напряжение U, кВ	20	
	Температура, °С	25	
Детектирование	Длина волны, нм	210	
Промывка капилляра	Время промывки водой, мин	3	

¹ - значение параметра для водного экстракта чая, ² – значение параметра для водных растворов теофиллина и теобромина

¹ - The parameter value for an aqueous solution of tea aqueous extract, ² - The parameter value for an aqueous solution of theophylline and theobromine

10 - 100 раз при применении процедуры *он-лайн* концентрирования.

Условия электрофоретического определения теобромина и теофиллина.

Перед началом работы (в начале рабочего дня) капилляр последовательно промывали по 10 мин водой, 1 М NaOH и водой, а перед каждым анализом пробы – водой, 0,1 н NaOH и ведущим электролитом в течение 3 мин. Для разделения компонентов пробы в качестве электролита использовали боратный буферный раствор с pH 9.8 и концентрацией 90 мМ. Анализ модельных растворов ТБ и ТФ, а также проб водного экстракта черного чая (далее по тексту экстракт чая) проводили методом КЗЭ со стандартным вводом пробы (КЗЭ) и в условиях *он-лайн* концентрирования – стэкинга с большим объемом образца (LVSS-КЗЭ) с учетом параметров, представленных в табл. 3. Аналитическим сигналом (АС) служила площадь пика (mAU·s) на электрофореграмме. Идентификацию аналита проводили путем введения добавки стандартного вещества ТФ и/или ТБ в пробу образца. Содержание ТБ и ТФ в образцах водного экстракта чая определяли методом градуировочного графика.

Для количественной оценки степени концентрирования аналита использовали фактор эффективности концентрирования SEF, который рассчитывали как отношение площади пика, полученного при стэкинге с большим объемом образца (LVSS-КЗЭ), к площади пика, полученной при введении пробы в течение 5 с (КЗЭ), умноженное на коэффициент разбавления пробы. В частности, в наших исследованиях этот коэффициент составлял $K_{разб} = 20$.

Организация эксперимента по оценке показателей качества методики анализа. Оценка

показателей прецизионности (повторяемости и внутрилабораторной прецизионности), правильности и точности проводили согласно РМГ 61-2010 [24].

Для оценки показателей прецизионности в качестве образцов для оценивания применяли рабочие пробы чая с разным содержанием аналитов (в работе использованы четыре пробы $W = 4$). Для каждой рабочей пробы получали четыре результата анализа ($N = 4$) в условиях внутрилабораторной прецизионности (разные время, операторы, наборы мерной посуды, градуировка средств измерений). При этом за результат анализа принимали среднее арифметическое значение n результатов единичного анализа (т.е. параллельных определений, мг/г), полученных в условиях повторяемости (одинаковые условия, минимальный промежуток времени, $n = 2$).

Оценку показателя правильности методики проводили с использованием метода добавок. Образцами для оценивания служили экстракты чая и экстракты чая с известной концентрацией добавки. Необходимый для расчета массив данных получен в соответствии с прописью методики в виде серии $L = 15$ результатов анализа исходной пробы и пробы с добавкой, максимально варьируя при этом условия проведения эксперимента.

Показатель точности рассчитан на основе полученных значений показателей прецизионности и правильности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработку методики определения теобромина и теофиллина в чае методом капиллярного зонного электрофореза с применением стэкинга с большим объемом образца (LVSS-КЗЭ-УФ) осуществляли последовательно в несколько этапов:

1. Электрофоретические эксперименты необходимые для выбора условий разделения ТБ и ТФ с компонентами матрицы (тип фонового электролита, его концентрация и рН, напряжение в системе).

2. Выбор условий *он-лайн* концентрирования ТБ и ТФ в капилляре при реализации стэкинга с большим объемом образца (давление и время ввода пробы в капилляр, время и напряжение обращения полярности).

Кроме того, рассматривали условия пробоподготовки образцов чая к анализу (время заваривания чая и степень разбавления экстракта).

В зависимости от этапа исследования выбор оптимальных условий определения ТБ и ТФ в чае осуществляли с применением модельных растворов аналитов и разбавленных в разной степени водных экстрактов черного чая с добавкой и без добавления стандартных веществ. Для повышения чувствительности определения выбрали капилляр с уширенной световой частью.

На первом этапе исследования осуществляли выбор типа фонового электролита с учетом литературных данных [11 - 14]. Анализ табл. 1 показывает, что разделение метилксантинов с другими компонентами чая осуществляют чаще всего в боратном буферном растворе, в котором полифенольные соединения, мешающие определению метилксантинов, связываются в комплексы с борат-ионами. Введение в состав фонового электролита буферных растворов и/или поверхностно-активных веществ,

неионогенных полимеров необходимо для улучшения разделения метилксантинов, катехинов, фенольных кислот при их одновременном определении [25]. Для целей нашего исследования в качестве фонового электролита достаточно применения боратного буферного раствора.

Важным фактором, влияющим на разделение аналитов, является выбор рН и концентрации буферного раствора. Исходя из значений показателей констант диссоциации ТФ ($pK_{a1} = 1.0$, $pK_{a2} = 8.6$) и ТБ ($pK_{a1} = 1.0$, $pK_{a2} = 10.0$) [23], можно ожидать полную ионизацию аналита в среде с рН более 8.8. В этих условиях в методе КЗЭ возможно разделение заряженных частиц ТФ и ТБ от нейтрального кофеина и других компонентов матрицы

Исследования на этом этапе проводили методом КЗЭ со стандартным вводом пробы. Изучено влияние рН боратного буферного раствора в диапазоне от 8.0 до 10.0 и его концентрации от 50 до 110 мМ на время миграции, площадь пиков и их разрешение. Исследование проводили на модельном растворе, содержащем ТБ (5 мкг/мл) и ТФ (2.5 мкг/мл) (модельный раствор 1), а также используя экстракт черного чая (0.5 г на 100 мл дистиллированной воды) с введенными добавками ТБ (2.5 мкг/мл) и ТФ (1.0 мкг/мл) (модельный раствор 2).

Как видно (рис. 1), при рН 8.0 изучаемые аналиты мигрируют практически одновременно, и их время миграции изменяется незначительно при варьировании концентрации буферного раствора (рис. 1; кривые 9 и 10). В диапазоне рН 9.0 – 10.0 влияние концентрации буферного раствора на изучаемый параметр проявляется в большей степени для ТФ, чем для ТБ. В этом диапазоне рН площадь пиков аналитов также практически не зависит от концентрации буферного раствора и имеет приемлемые для регистрации значения. Например, на электрофореграммах зарегистрированных в экстракте черного чая с введенными добавками ТБ и ТФ при варьировании параметров рН (9.0 ÷ 10.0) и концентрации (90 и 110 мМ) буферного раствора площадь пиков находились на уровне 28 mAU·s для ТБ и 8 mAU·s для ТФ.

При анализе реальных образцов повышение концентрации буферного раствора может приводить к ложному завышению сигналов, связанному с уменьшением разрешения пиков R за счет влияния компонентов матрицы. В наших исследованиях, проведенных с использованием модельного раствора 2, показано, что разрешение пиков аналитов незначительно изменялось при варьировании параметров буферного раствора. Так, для пика ТФ разрешение составило в среднем 0.8 при варьировании концентрации буферного раствора в диапазоне 50 ÷ 110 мМ (рН 10.0). Максимальное $R \approx 1.6$ наблюдали в буферных растворах с рН 9.8 и концентрацией 90 мМ.

Рассмотрено влияние напряжения в системе (диапазон варьирования от 10 до 30 кВ) на время

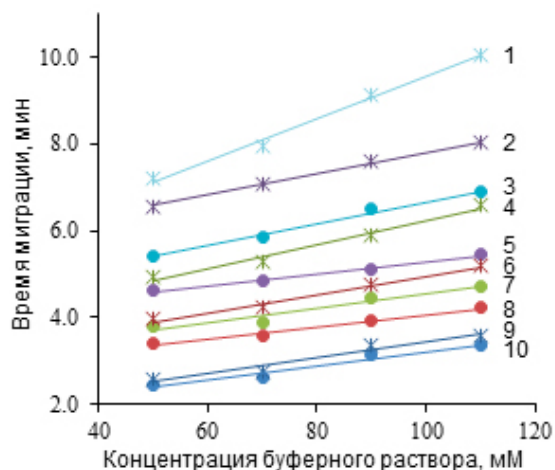


Рис. 1. Влияние концентрации буферного раствора на время миграции ТФ (Ж) и ТБ (●) при рН 10.0 (1, 3), рН 9.5 (2, 5), рН 9.0 (4, 7), рН 8.5 (6, 8) и рН 8.0 (9, 10), изученное на модельном растворе стандартных веществ ТБ (5 мкг/мл) и ТФ (2.5 мкг/мл) методом КЗЭ при стандартном вводе пробы, напряжение в системе 25 кВ

Fig. 1. Effect of buffer solution concentration on the migration time of TF (Ж) and TB (●) at pH of 10.0 (1, 3), 9.5 (2, 5), 9.0 (4, 7), 8.5 (6, 8), and 8.0 (9, 10) studied on a model solution of standard substances TB (5 μg/mL) and TF (2.5 μg/mL) by the CZE method with standard injection, 25 kV system voltage

миграции, площадь и разрешение пиков аналитов. Показано, что с увеличением напряжения в системе время миграции ТБ и ТФ сокращается в 3 и 5 раз, при этом уменьшаются и площади пиков аналитов в 1.5 и 4 раза, соответственно. Так как разрешение ТБ и ТФ незначительно зависело от напряжения в системе в диапазоне от 10 до 25 кВ ($R = 2.7 - 4.5$), то оптимальным выбрали значение напряжения 20 кВ.

Таким образом, после серии предварительных экспериментов для определения ТФ и ТБ в экстракте чая в качестве фонового электролита выбрали боратный буферный раствор с рН 9.8 и концентрацией 90 мМ; напряжение в системе 20 кВ.

На втором этапе нашего исследования варьировали факторы, влияющие на эффективность концентрирования ТБ и ТФ при реализации стэкинга с большим объемом образца.

Изучены изменения аналитических сигналов ТБ и ТФ от времени ввода пробы в капилляр в диапазоне от 50 до 300 с при постоянном давлении 50 мбар. Полученные зависимости (рис. 2) имеют вид близкий к кривой с насыщением. При времени ввода пробы свыше 200 с площадь пиков аналитов практически не изменяется, что, вероятно, обусловлено снижением эффективности концентрирования определяемых компонентов в узкие зоны.

Для достижения эффективного концентрирования аналитов в разбавленной пробе, введенной в капилляр практически до зоны детектирования, требуется установить оптимальное время обращения полярности и значение напряжения обращения, при которых достигается удаление матрицы пробы из капилляра с одновременным сужением зон миграции аналитов. При времени обращения полярности 1.7 мин, когда матрица практически полностью

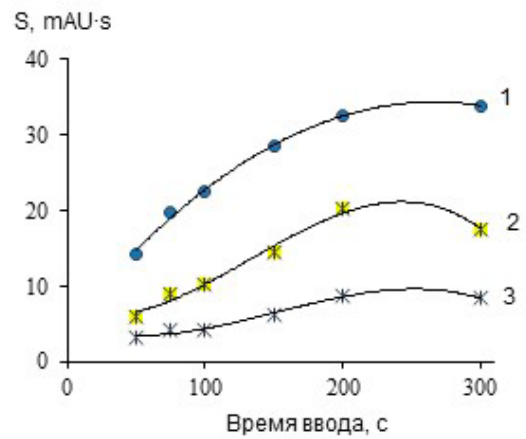


Рис. 2. Зависимости площади пиков ТБ (1) и ТФ (2, 3) от времени ввода разбавленного в 40 раз водного экстракта черного чая (1,0 г на 100 мл воды) (1,3) и того же образца с введенной добавкой ТФ (0.05 мкг/мл) (2)

Fig. 2. Dependences of the peak areas of TB (1) and TF (2, 3) on the injection time of a 40-fold diluted black tea aqueous extract (1.0 g per 100 ml water) (1, 3) and the same sample with the TF additive (0.05 µg/ml) (2)

удалена из капилляра, а ток в системе I достигал 98 - 99 % от характерного для фонового электролита значения I_0 , наблюдали детектирование пиков ТБ и ТФ с максимальными площадями (рис. 3). При меньшем, чем 1.3 мин времени обращения, аналиты не успевают концентрироваться (рис. 3, А), а при 1.8 мин наблюдали удаление аналитов из капилляра (рис. 3, Б). Исходя из этих данных, оптимальным временем обращения полярности выбрали диапазон от 1.5 до 1.7 мин.

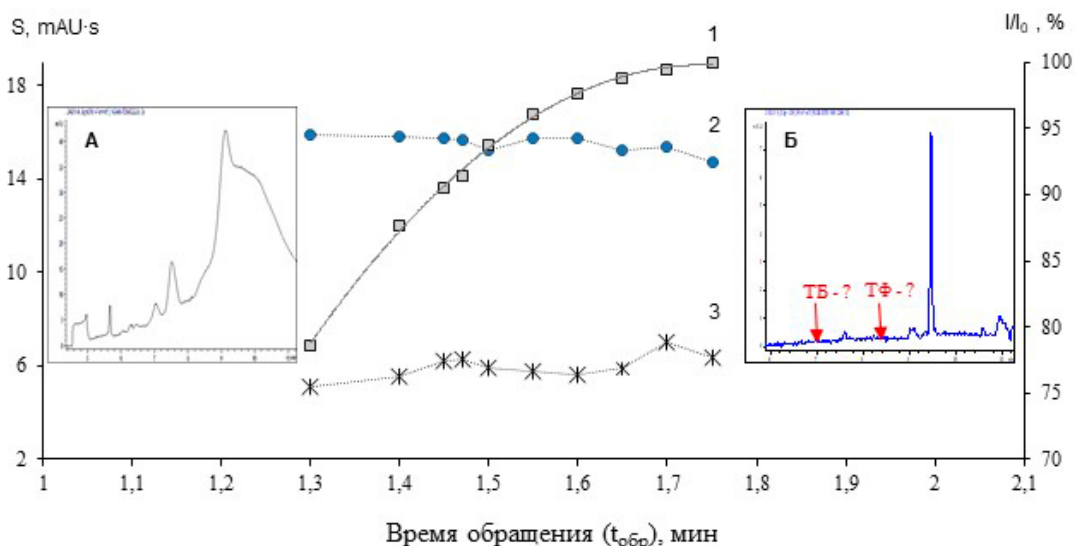


Рис. 3. Зависимости отношения I к I_0 (1) и площади пика ТБ (2) и ТФ (3) от времени обращения полярности при напряжении обращения -10 кВ с представлением электрофореграмм разбавленного экстракта чая, полученных в граничных условиях: $t_{обп} < 1.3$ мин (А) и $t_{обп} > 1.8$ мин (Б)

Fig. 3. Dependences of the ratio of I to I_0 (1), TB peak area (2) and TF peak area (3) on the polarity reversing time at a reversal voltage of -10 kV with the representation of electrophoregrams of a diluted tea extract obtained under the following boundary conditions: $t_{rev} < 1.3$ min (A) and $t_{rev} > 1.8$ min (B)

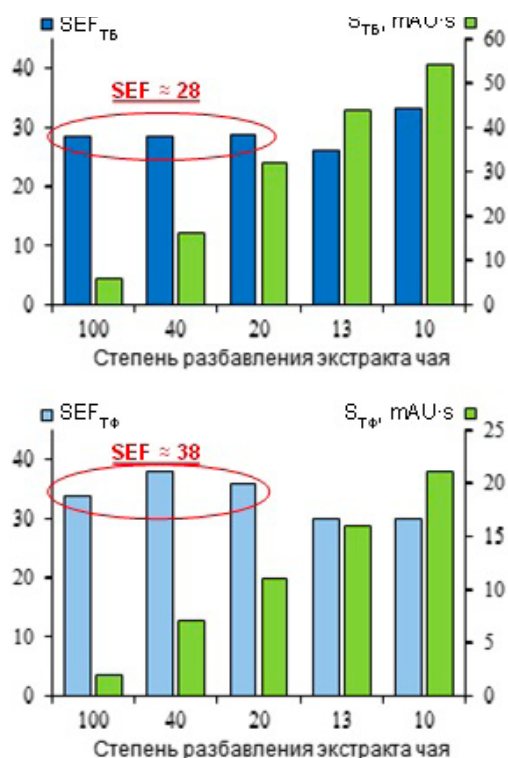


Рис. 4. Зависимости площади пиков ТБ, ТФ и факторов эффективности их концентрирования SEF от степени разбавления экстракта черного чая «Черный бархат» (1.0 г на 100 мл воды)

Fig. 4. Dependences of TB and TF peak area and their concentration efficiency factors SEF on the degree of dilution of the “Black Velvet” black tea extract (1.0 g per 100 ml water)

Варьирование напряжения обращения в диапазоне от -5 до -15 кВ позволило установить, что данный параметр не оказывает существенного влияния на аналитические сигналы аналитов, поэтому дальнейшие исследования проводили при напряжении обращения -10 кВ.

Для выделения метилксантинов из чая в качестве растворителя чаще всего используют горячую воду. Навеску образца чая заливают кипящей водой и заваривают в течение определенного времени. При этом некоторые основные компоненты чайного листа, например катехины, также переходят в экстракт. Эти сопутствующие компоненты могут влиять на электропроводность получаемого экстракта, а, следовательно, на эффективность концентрирования аналита в условиях стэкинга. Время заваривания считали оптимальным при выполнении следующих условий: достижения максимального извлечения ТБ и ТФ из образца чая и отсутствии проявления матричных эффектов при регистрации электрофореграмм в режиме LVSS-K3Э. Показано, что при варьировании времени заваривания чая от 5 до 60 мин, максимальная степень извлечения ТФ и ТБ достигается за 45 мин. При этом на электрофореграммах разбавленного экстракта чая, зарегистрированных

в режиме LVSS-K3Э, не проявляется мешающее влияние матричных компонентов пробы.

Влияние степени разбавления пробы на аналитический сигнал (S, mAU·s) и фактор эффективности концентрирования (SEF) ТБ и ТФ оценивали на разных образцах черного чая. С увеличением степени разбавления экстракта чая наблюдали уменьшение площади пиков аналитов, при этом фактор эффективности концентрирования аналитов был примерно постоянным с несколько большим значением при 100 – 20 - кратном разбавлении (рис. 4). С учетом приемлемых для детектирования значений сигналов ТБ и ТФ в качестве оптимального выбрали 40-кратное разбавление экстракта, полученного завариванием 1 г чая в 100 мл дистиллированной воды. В этих условиях факторы эффективности концентрирования ТБ и ТФ составили 28 и 38, соответственно.

Электрофореграмма разбавленного экстракта черного чая, зарегистрированная в режиме LVSS-K3Э представлена на рис. 5. Времена миграции ТБ и ТФ составили 7.3 и 10.2 мин, соответственно, время анализа не превышало 22 мин.

Проведена оценка возможности определения изучаемых аналитов в экстрактах чая с использованием градуировочных графиков. Показано, что угловые коэффициенты градуировочных графиков, полученных с использованием рабочих растворов стандартных веществ и рабочих растворов стандартных веществ с внесенной добавкой аликвоты разбавленного экстракта чая, отличались незначительно (на 0,3 % для ТБ и 2.4 % для ТФ); коэффициенты аппроксимации (R²) для всех зависимостей близки к 1; диапазоны линейности составляют, мкг/мл: от 0.01 до 1.0 для ТБ и от 0.01 до 0.25 для ТФ. Полученные результаты подтвердили возможность определения ТБ и ТФ в экстрактах чая по градуировочным графикам.

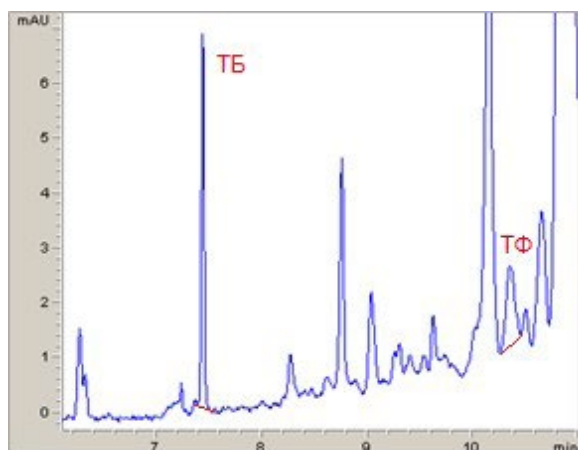


Рис. 5. Электрофореграмма разбавленного в 40 раз экстракта черного чая «Черный бархат» (1.0 г на 100 мл воды), полученная методом LVSS-K3Э в оптимизированных условиях

Fig. 5. Electropherogram of a 40-fold diluted aqueous extract of “Black Velvet” black tea (1.0 g per 100 ml water) obtained by LVSS-CZE method under optimized conditions

Таблица 4

Показатели качества разработанной методики

Table 4

Quality indicators of the developed method

Показатель качества методики анализа	Форма представления показателя качества методики анализа	Оценка показателей качества методики определения	
		теобромин	теофиллин
Показатель повторяемости	Относительное среднее квадратическое отклонение результатов единичного анализа в условиях повторяемости σ_r , %	5	6
Показатель внутрилабораторной прецизионности	Относительное среднее квадратическое отклонение результатов анализа в условиях внутрилабораторной прецизионности $\sigma_{R,л}$, %	6	7
Показатель правильности	Относительное среднее квадратическое отклонение неисключенной систематической погрешности методики анализа $\sigma(\Delta_j)$, %	5	8
Показатель точности	Относительное среднее квадратическое отклонение погрешности методики анализа $\sigma(\Delta)$, %	7	12

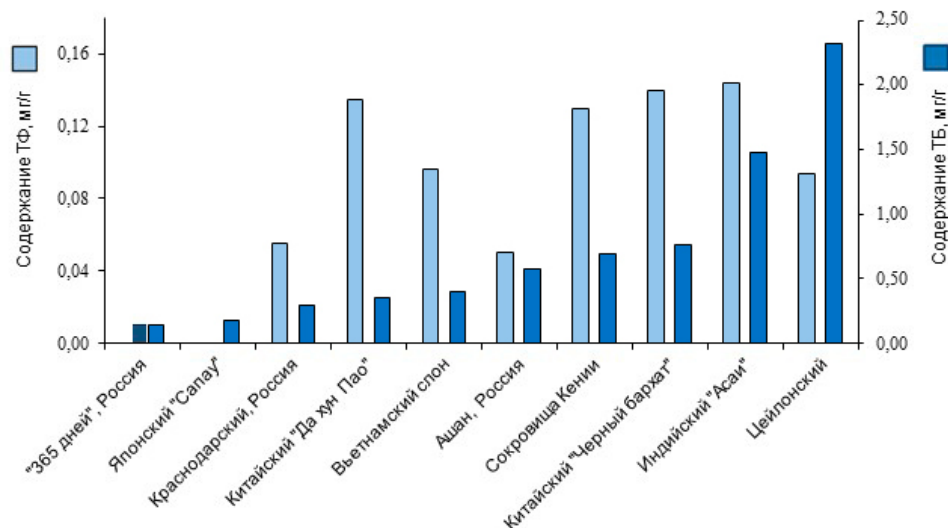


Рис. 6. Содержание теобромина и теофиллина в различных образцах черного чая

Fig. 6. Theobromine and theophylline content in various samples of black tea

Для разработанной методики определения теобромина и теофиллина в чае методом капиллярного зонного электрофореза с применением стэкинга с большим объемом образца оценили показатели качества в соответствии с РМГ 61–2010 [24] (табл. 4). Методика позволяет определять ТБ в диапазоне от 0.04 до 4.0 мг/г и ТФ – от 0.04 до 1.0 мг/г.

Проведено определение теобромина и теофиллина методом LVSS-K3Э в коммерческих образцах черного чая. Как видно (рис. 6), содержание в образцах ТБ варьируется в диапазоне от 0.14 до 2.32 мг/г, а ТФ – от «< 0.040» до 0.15 мг/г. Для большинства образцов наблюдается симбатное увеличение концентраций ТБ и ТФ. В образцах с низким содержанием теобромина («365 дней» и «Сапау») содержание теофиллина определить не

удалось. Самое высокое содержание теофиллина установили в китайских образцах чая «Да Хун Пао» и «Черный бархат», а также индийском «Асаи».

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование проводилось при финансовой поддержке РФФИ (грант № 19-43-230010) с использованием научного оборудования ЦКП «Эколого-аналитический центр» Кубанского госуниверситета, уникальный идентификатор RFMEFI59317X0008.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by RFBR (grant 19-43-230010) with the use of the scientific equipment

of the Center of Collective Use "Environmental Analysis Center" of the Kuban State University, unique identifier RFMEFI59317X0008.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика определения теобромина и теофиллина в черном чае методом капиллярного зонного электрофореза с применением стэкинга с большим объемом образца. Оптимизированы условия разделения аналитов с компонентами матрицы, а также условия их *он-лайн* концентрирования в капилляре. Факторы эффективности концентрирования ТБ и ТФ, рассчитанные для образца черного чая, составили 28 и 38, соответственно.

Получены метрологические характеристики разработанной методики анализа: повторяемость, внутрिलाбораторная прецизионность, правильность и точность результатов определения ТБ и ТФ в образцах черного чая. В пределах диапазонов определения аналитов относительное стандартное отклонение результатов их определения $\sigma(\Delta)$ составило 7 % для ТБ и 12 % для ТФ. Методику апробировали на различных экстрактах черного чая, содержания в них варьировались для ТБ от 0.14 до 2.32 мг/г и для ТФ от «< 0.040» до 0.15 мг/г.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Yan S.Y. Review. Evaluation of the composition and sensory properties of tea using near infrared spectroscopy and principal component analysis // *Near Infrared Spectrosc.* 2005. V. 13, № 6. P.313-325.
- 2 Studies of quality development and major chemical composition of green tea processed from tea with different shoot maturity / C Xu [et al.] // *LWT.* 2021. V. 142, № 111055.
- 3 State-of-the-art review of dark tea: From chemistry to health benefits / F.-J. Lin [et al.] // *Trends in Food Science & Technology.* 2021. V. 109. P. 126-138.
- 4 Samanta S. Review. Potential Bioactive Components and Health Promotional Benefits of Tea (*Camellia sinensis*) // *Journal of the American College of Nutrition.* – 2020.
- 5 Ashihara H., Gillies F.M., Crozier A. Metabolism of caffeine in tea leaves // *Plant and cell physiology.* 1997. V. 38, № 4. P. 413-419.
- 6 Comparative Proteomic Analysis of the Buds and the Young Expanding Leaves of the Tea Plant (*Camellia sinensis* L.) / Q. Li [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16. P. 14007-14038.
- 7 Capillary electrophoretic determination of theanine, caffeine, and catechins in fresh tea leaves and oolong tea and their effects on rat neurosphere adhesion and migration / C.-N. Chen [et al.] // *Journal of agricultural and food chemistry.* 2003. V. 51, № 25. P. 7495-7503.
- 8 Przybylska A., Gackowski M., Koba M. Review. Application of Capillary Electrophoresis to the Analysis of Bioactive Compounds in Herbal Raw Materials Molecules // *Molecules.* 2021. V. 26, № 2135.
- 9 Talik P., Krzek J., Ekiert R. J. Analytical Techniques Used for Determination of Methylxanthines and their Analogues – Recent Advances // *Separation & Purification Reviews.* 2012. V. 41. P. 1-61.

- 10 Horie H., Kohata K. Review. Analysis of tea components by high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis // *Journal of Chromatography A.* 2000. V. 881, № 1-2. P. 425-438.
- 11 Quantitative capillary electrophoresis and its application in analysis of alkaloids in tea, coffee, coca cola, and theophylline tablets / M. Li [et al.] // *Journal of Separation Science.* 2009. V. 32, № 2. P. 267-274.
- 12 Pu Q.-S., Fang Z.-L. Combination of flow injection with capillary electrophoresis. Part 6. A bias-free sample introduction system based on electroosmotic-flow traction // *Analytica Chimica Acta.* 1999. V. 398, № 1. P. 65-74.
- 13 Separation of six purine bases by capillary electrophoresis with electrochemical detection / G. Chen [et al.] // *Analytica Chimica Acta.* 2002. V. 457, № 2. P. 225-233.
- 14 Arce L., Ríos A., Valcárcel M. Determination of anti-carcinogenic polyphenols present in green tea using capillary electrophoresis coupled to a flow injection system // *Journal of Chromatography A.* 1998. V. 827, № 1. P. 113-120.
- 15 Hsiao H.-Y., Chen R.L.C., Cheng T.-J. Determination of tea fermentation degree by a rapid micellar electrokinetic chromatography // *Food Chemistry.* 2010. V. 120, № 2. P. 632-636.
- 16 Zhao Y., Lunte C. E. Determination of caffeine and its metabolites by micellar electrokinetic capillary electrophoresis // *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 1997. V. 688, № 2. P. 265-274.
- 17 Fast determination of catechins and xanthines in tea beverages by micellar electrokinetic chromatography / M. Bonoli [et al.] // *Journal of agricultural and food chemistry.* 2003. V. 51, № 5. P. 1141-1147.
- 18 Quantitative on-line concentration for capillary electrophoresis with inkjet sample introduction technique / Y. Rang [et al.] // *Journal of separation science.* 2015. V. 38, № 15. P. 2722-2728.
- 19 Lee B. L., Ong C. N. Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis // *Journal of chromatography A.* 2000. V. 881, № 1-2. P. 439-447.
- 20 Differentiation of green tea samples by chiral CD-MEKC analysis of catechins content / R. Gotti [et al.] // *Electrophoresis.* 2009. V. 30, № 16. P. 2922-2930.
- 21 Separation of catechins and methylxanthines in tea samples by capillary electrochromatography / U. Dilek [et al.] // *Journal of separation science.* 2009. V. 32, № 7. P. 1002-1010.
- 22 Chen M. L., Zheng M. M., Feng Y. Q. Preparation of organic-inorganic hybrid silica monolith with octyl and sulfonic acid groups for capillary electrochromatography and application in determination of theophylline and caffeine in beverage // *Journal of Chromatography A.* 2010. V. 1217, № 21. P. 3547-3556.
- 23 Pomilio A. B., Trajtemberg S., Vitale A. A. High-Performance Capillary Electrophoresis Analysis of mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using Automated Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography // *Phytochemical Analysis.* 2002. V. 13, № 4. P. 235-241.
- 24 РМГ 61-2010 Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. М., 2013. 58 с.
- 25 Бессонова Е.А., Карцова Л.А. Методы *он-лайн* концентрирования в капиллярном электрофорезе // *Проблемы аналитической химии. Капиллярный электрофорез: под ред. Л.А. Карцовой.* М.: Наука. 2014. Т. 18. С. 76-125.

REFERENCES

1. Yan S.Y. Review. Evaluation of the composition and sensory properties of tea using near infrared spectroscopy and principal component analysis. *Near Infrared Spectrosc.* 2005, vol. 13, no. 6, pp.313-325. doi: org/10.1255/jnirs.562.
2. Xu C., Liang L., Li Y., Yang T., Fan Y., Mao X., Wang Y. Studies of quality development and major chemical composition of green tea processed from tea with different shoot maturity. *LWT*, 2021, vol. 142, article 111055. doi: org/10.1016/j.lwt.2021.111055.
3. Lin F.-J., Wei X.-L., Liu H.-Y., Li H., Xia Y., Wu D.-T., Zhang P.-Z., Gandhi G. R., Li H.-B., Gan R.-Y. State-of-the-art review of dark tea: From chemistry to health benefits. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, vol. 109, pp. 126-138. doi: org/10.1016/j.tifs.2021.01.030.
4. Samanta S. Review. Potential Bioactive Components and Health Promotional Benefits of Tea (*Camellia sinensis*). *J. of the American College of Nutrition*, 2022, vol. 41, no 1. doi: 10.1080/07315724.2020.1827082.
5. Ashihara H., Gillies F.M., Crozier A. Metabolism of caffeine in tea leaves. *Plant and cell physiology*, 1997, vol. 38, no. 4, pp. 413-419. doi: org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029184.
6. Li Q. A., Li J., Liu S., Huang J., Lin H., Wang K., Cheng X., Liu Z. Comparative Proteomic Analysis of the Buds and the Young Expanding Leaves of the Tea Plant (*Camellia sinensis* L.). *Int. J. Mol. Sci.* 2015, vol. 16, pp. 14007-14038. doi:10.3390/ijms160614007.
7. Chen C.- N., Liang C.-M., Lai J.-R., Tsai Y.-J., Tsay J.-S., Lin J.-K. Capillary electrophoretic determination of theanine, caffeine, and catechins in fresh tea leaves and oolong tea and their effects on rat neurosphere adhesion and migration. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2003, vol. 51, no. 25, pp. 7495-7503. doi: org/10.1021/jf034634b.
8. Przybylska A., Gackowski M., Koba M. Review. Application of Capillary Electrophoresis to the Analysis of Bioactive Compounds in Herbal Raw Materials Molecules. *Molecules*, 2021, vol. 26, no. 2135. doi: org/10.3390/molecules26082135.
9. Talik P., Krzek J., Ekiert R. J. Analytical Techniques Used for Determination of Methylxanthines and their Analogues – Recent Advances. *Separation & Purification Reviews*, 2012, vol. 41, pp. 1-61. doi: 10.1080/15422119.2011.569047.
10. Horie H., Kohata K. Review. Analysis of tea components by high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis. *J. of Chromatography A*, 2000, vol. 881, no. 1-2, pp. 425-438. doi: org/10.1016/S0021-9673(99)01345-X.
11. Li M., Zhou J., Gu X., Wang Y., Huang X., Yan C. Quantitative capillary electrophoresis and its application in analysis of alkaloids in tea, coffee, coca cola, and theophylline tablets. *J. of Separation Science*, 2009, vol. 32, no. 2. pp. 267-274. doi: org/10.1002/jssc.200800529.
12. Pu Q.-S., Fang Z.-L. Combination of flow injection with capillary electrophoresis. Part 6. A bias-free sample introduction system based on electroosmotic-flow traction. *Analytica Chimica Acta*, 1999, vol. 398, no. 1, pp. 65-74. doi: org/10.1016/S0003-2670(99)00382-7.
13. Chen G., Chu Q., Zhang L., Ye J. Separation of six purine bases by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta*, 2002, vol. 457, no. 2, pp. 225-233. doi: org/10.1016/S0003-2670(02)00027-2.
14. Arce L., Ríos A., Valcárcel M. Determination of anti-carcinogenic polyphenols present in green tea using capillary electrophoresis coupled to a flow injection system. *J. of Chromatography A*, 1998, vol. 827, no. 1, pp. 113-120. doi: org/10.1016/S0021-9673(98)00737-7.
15. Hsiao H.-Y., Chen R.L.C., Cheng T.-J. Determination of tea fermentation degree by a rapid micellar electrokinetic chromatography. *Food Chem*, 2010. V. 120, no. 2, pp. 632-636. doi: org/10.1016/j.foodchem.2009.10.048.
16. Zhao Y., Lunte C. E. Determination of caffeine and its metabolites by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1997, vol. 688, no. 2, pp. 265-274. doi: org/10.1016/S0378-4347(96)00278-2.
17. Bonoli M., Colabufalo P., Pelillo M., Toschi T. G., Lercker G. Fast determination of catechins and xanthines in tea beverages by micellar electrokinetic chromatography. *J. of agricultural and food chemistry*, 2003, vol. 51, no. 5. pp. 1141-1147. doi: org/10.1021/jf020907b.
18. Rang Y., Zeng H., Nakajima H., Kato S., Uchiyama K. Quantitative on-line concentration for capillary electrophoresis with inkjet sample introduction technique. *J. of separation science*, 2015, vol. 38, no. 15, pp. 2722-2728. doi: org/10.1002/jssc.201500201.
19. Lee B. L., Ong C. N. Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. of chromatography A*, 2000, vol. 881, no 1-2, pp. 439-447. doi: org/10.1016/S0021-9673(00)00215-6.
20. Gotti R., Furlanetto S., Lanteri S., Olmo S., Ragaini A., Cavrini V. Differentiation of green tea samples by chiral CD-MEKC analysis of catechins content. *Electrophoresis*, 2009, vol. 30, no. 16, pp. 2922-2930. doi: org/10.1002/elps.200800795.
21. Dilek U., Aturki Z., Raggi M.A., Fanali S. Separation of catechins and methylxanthines in tea samples by capillary electrochromatography. *Journal of separation science*, 2009, vol. 32, no. 7. pp. 1002-1010. doi: org/10.1002/jssc.200800634.
22. Chen M. L., Zheng M. M., Feng Y. Q. Preparation of organic-inorganic hybrid silica monolith with octyl and sulfonic acid groups for capillary electrochromatography and application in determination of theophylline and caffeine in beverage. *J. of Chromatography A*, 2010, vol. 1217, no. 21. pp. 3547-3556. doi: org/10.1016/j.chroma.2010.03.032.
23. Pomilio A. B., Trajtemberg S., Vitale A. A. High-Performance Capillary Electrophoresis Analysis of mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using Automated Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *Phytochemical Analysis*, 2002, vol. 13, no. 4., pp. 235-241. doi:org/10.1002/pca.647.
24. RMG 61-2010. *Gosudarstvennaia sistema obespecheniia edinstva izmerenii. Pokazateli tochnosti, pravil'nosti, pretsizionnosti metodik kolichestvennogo khimicheskogo analiza. Metody otsenki [State system for ensuring the uniformity of measurements. Accuracy, trueness, precision of quantitative chemical analysis method. Evaluation methods]*. Moscow, Standartinform Publ., 2013. 58 p. (in Russian).
25. Bessonova E.A., Kartsova L.A. [Methods of on-line concentration in capillary electrophoresis] // *Problemy analiticheskoi khimii. Kapilliarnyi elektroforez [Problems of analytical chemistry. Capillary electrophoresis]*: edited by L.A. Kartsova. Moscow, Science, 2014, vol. 18, pp. 76-125 (in Russian).