Для цитирования: Аналитика и контроль. 2019. Т. 23, № 2. С. 193-200
УДК 543.545 DOI: 10.15826/analitika.2019.23.2.001

Разделение стероидных гормонов методом микроэмульсионной электрокинетической хроматографии с участием ионных жидкостей

Л.А. Карцова, Е.А. Бессонова,*Д.О. Москвичев

Санкт-Петербургский государственный университет,
Российская Федерация, 198504, г. Санкт-Петербург, Петродворец, Университетский пр., 26,

**Адрес для переписки: Москвичев Данил Олегович, E-mail: moskvichev_dan@mail.ru*

Поступила в редакцию 19 февраля 2019 г., после доработки – 13 марта 2019 г.

В работе выявлены перспективы применения гидрофильных ионных жидкостей (**ИЖ**) на основе имидазола (C_{12}MImCl, C_{16}MImCl) в качестве модификаторов и поверхностно-активных веществ (**ПАВ**), а также гидрофобных ИЖ (C_6MImBF$_4$) как «масла» в составе микроэмульсии при разделении стероидных гормонов методом микроэмульсионной электрокинетической хроматографии (**МЭЭКХ**). Определены факторы (концентрация ионной жидкости, природа и значение pH фонового электролита, соотношение различных компонентов микроэмульсии), влияющие на эффективность и селективность разделения аналитов. Найдены подходящие условия для полного разделения модельной смеси стероидных гормонов: кортизола, кортизона, 11-дезоксикортизола, 11-дезоксикортикостерона, 11-дегидрокортикостерона. Проведено сопоставление аналитических характеристик методов мицеллярной и микроэмульсионной электрокинетической хроматографии при определении стероидов. Обнаружено, что добавка 15 мМ 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина привела к увеличению селективности разделения, и при этом время анализа уменьшилось. Применение методов on-line концентрирования позволило снизить пределы обнаружения аналитов до 50 нг/мл. На основании полученных результатов предложен экспрессный способ определения стероидных гормонов в образцах мочи и сыворотки крови методом МЭЭКХ с введением имидазолиевой ионной жидкости в состав фонового электролита.

***Ключевые слова*:** имидазолиевые ионные жидкости, стероидные гормоны, микроэмульсионная электрокинетическая хроматогрофия, микроэмульсия

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2019, vol. 23, no. 2, pp. 193-200
DOI: 10.15826/analitika.2019.23.2.001

Separation of steroid hormones by microemulsion electrokinetic chromatography involving ionic liquids

L.A. Kartsova, E.A. Bessonova, *D.O. Moskvichev

Saint-Petersburg State University, Institute of Chemistry,
26 Universitetskii prospect, St. Petersburg, Petergof, 198504, Russian Federation

**Corresponding author: Danil O. Moskvichev, E-mail: moskvichev_dan@mail.ru*

Submitted 19 February 2019, received in revised form 13 March 2019

Microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) is a promising method for separating ionic and neutral analytes in the complex matrix, where a microemulsion is used as the background electrolyte. Current work identified the possibility of using hydrophilic ionic liquids (ILs) based on imidazole (C_{12}MImCl, C_{16}MImCl) as modifiers and surfactants, as well as hydrophobic ILs (C_6MImBF$_4$) as an "oil" in the microemulsion for the separation of steroid hormones by MEEKC. The factors such as ILs concentration, nature and pH of the background electrolyte, and the ratio of the components of the microemulsion, that influence the efficiency and separation selectivity of analytes were found. Suitable conditions for the complete separation of a model mixture of steroid hormones: cortisol, cortisone, 11-deoxycortisol, 11-deoxycorticosterone, corticosterone were obtained. The analytical characteristics of methods (optimized conditions) for the determination of steroids by micellar and microemulsion electrokinetic chromatography were compared. It was investigated that the addition of 15 mM 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin increases the separation selectivity and reduces

the analysis time. The application of the on-line concentration methods made it possible to reduce the detection limits of analytes to 50 ng / ml. The mode for electrophoretic determination of steroid hormones in biological fluids (urine, blood serum) by MEEKC with the use of ionic liquids has been proposed using the previously obtained results.

***Keywords*:** imidazolium ionic liquids, steroid hormones, microemulsion electrokinetic chromatography, microemulsion

Введение

Одной из важнейших задач медицинской диагностики является определение биохимических маркеров различных заболеваний и их метаболитов. Метод капиллярного электрофореза (**КЭ**), получивший широкое распространение для определения нейтральных и ионных аналитов, в случае следового анализа биологически активных веществ имеет ряд ограничений. Основные проблемы – сложная матрица реальных объектов и низкие концентрации биологическиактивных веществ в реальных объектах, что требует применения off- или on-line концентрирования. Перспективными в этом направлении являются варианты электрокинетической хроматографии – мицеллярной (МЭКХ) и микроэмульсионной (МЭЭКХ), основанные на сочетании электрофоретического и хроматографического механизмов разделения [1-4]. Достоинствами метода МЭЭКХ являются возможность одновременного разделения заряженных и нейтральных, гидрофобных и гидрофильных аналитов и большие коэффициенты распределения исследуемых веществ [5, 6]. Селективность разделения в МЭЭКХ можно регулировать при варьировании концентрации поверхностно-активного вещества (**ПАВ**), содержания сопутствующего (вспомогательного) ПАВ (**со-ПАВ**) и «масла» – неполярного органического соединения; pH фонового электролита, концентрации органического растворителя.

В последние годы в капиллярном электрофорезе активное применение нашли ионные жидкости (**ИЖ**) благодаря комплексу их уникальных свойств обеспечивающих реализацию дополнительных взаимодействий с аналитами (образование водородных связей, гидрофобные, π-π, электростатические и ион-дипольные взаимодействия), что позволяет регулировать эффективность и селективность разделения [7-11].

Целью данной работы явилось выявление возможностей ионных жидкостей на основе имидазолия выступать в качестве компонентов электрофоретической системы в условиях микроэмульсионной электрокинетической хроматографии при определении стероидных гормонов. Представляло интерес установить способность ионных жидкостей различной природы выполнить роль мицелло- и микроэмульсио-образующего агента, а также – «масла» в составе микроэмульсии типа «масло-в-воде» [12, 13].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реагенты. Гидроксид натрия («ч.д.а.»), соляная кислота («ч.д.а.»), гидрофосфат натрия 12-водный («Вектон», «ч.д.а.»), дигидрофосфат натрия двухводный («Вектон», «ч.д.а.»), борная кислота («Sigma-Aldrich»), метанол («J.T.Baker»), бутанол-1 («Реахим», «ос.ч.»), этилацетат («Вектон», «х.ч.»), гептан («Вектон», «х.ч.»), гексан («Вектон», «х.ч.»), ацетон («Вектон», «х.ч.»), ацетат аммония, цетилтриметиламмоний бромид (**ЦТАБ**), додецилсульфат натрия (**ДДСН**) («AppliChem»), (2-гидроксипропил)-β-циклодекстрин (**ГП-β–ЦД**) («Sigma-Aldrich»), 1-додецил-3-метилимидазолий хлорид (**C_{12}MImCl**) («abcr»), 3-метил-1-цетилимидазолий хлорид (**C_{16}MImCl**) («abcr»), 1-гексил-3-метилимидазолий тетрафторборат (**C_6MImBF_4**) («SoluentInnouation»), кортизол (**F**) («Sigma-Aldrich»), кортизон (**E**) («Sigma-Aldrich»), 11-дезоксикортикостерон (**DOC**) («Sigma-Aldrich»), 11-дегидрокортикостерон (**B**) («Sigma-Aldrich»), 11-дезоксикортизол (**S**) («Sigma-Aldrich»), деионизированная вода (получена на деионизаторе «АКВИЛОН Д 301», (Россия)).

Оборудование. Система капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ®-105/105М» («Люмэкс», СПб) с УФ-детектированием; общая длина кварцевого капилляра 60 см; эффективная – 50 см; внутренний диаметр капилляра 50 мкм. Для обработки полученных результатов использовали программное обеспечение «Эльфоран». Обработку микроэмульсии ультразвуком с целью ее стабилизации проводили в ультразвуковой термостатируемой ванне («САПФИР», Россия).

Приготовление микроэмульсии. Для приготовления микроэмульсии (**МЭ**) точную навеску ПАВ растворяли в деионизированной воде, затем добавляли буферный раствор (фосфатный, боратный или ацетатный) и перемешивали до полного растворения ПАВ. К полученному раствору добавляли точно измеренное количество бутанола-1, а затем «масла» (н-гексан, н-гептан, этилацетат или C_6MImBF_4), и смесь помещали в ультразвуковую ванну на 30 мин для установления равновесия и образования стабильной микроэмульсии. После приготовления микроэмульсию пропускали через фильтр (0.2 мкм) и использовали для дальнейших электрофоретических экспериментов.

Приготовление тестовых растворов. Тестовые растворы аналитов с концентрацией 1 мг/мл получали растворением точной навески каждого из стероидов (0.001 г в 1 мл ацетонитрила) и хранили при –16 °С в морозильной камере. Разбавлением тестовых растворов фоновым электролитом или водой получали требуемые рабочие растворы.

Подготовка кварцевых капилляров для МЭЭКХ. Перед проведением электрофоретических анализов

капилляр промывали 0.5 М раствором HCl (10 мин), далее в течение 10 мин дистиллированной водой; после этого 0.5 М раствором NaOH (10 мин), и снова дистиллированной водой (10 мин). Непосредственно перед выполнением анализа капилляр промывали в течение 10 мин 0.1 М раствором NaOH и далее – по 10 мин дистиллированной водой и микроэмульсией.

Условия электрофоретического разделения стероидов в МЭЭКХ. Состав микроэмульсии: 0.5 % (здесь и далее состав приведен в массовых процентах) этилацетата; 1 % C_{16}MImCl; 1.2 % бутанола-1; 97.7 % 5 мМ фосфатный буферный раствор, pH = 7; УФ детектирование, 242 нм; температура капилляра +20 °С и рабочее напряжение ±20 кВ. Ввод пробы осуществляли гидродинамически при 30-50 мбар, 2-50 с. Между очередными электрофоретическими анализами кварцевый капилляр промывали метанолом (2 минуты), дистиллированной водой (2 минуты) и 2 минуты раствором приготовленной микроэмульсии. В качестве маркера электроосмотического потока (**ЭОП**) применяли водный раствор ацетона с массовой долей 10 %.

Подготовка образцов мочи к анализу. Для определения стероидных гормонов использовали суточную мочу человека, образцы которой предоставленены медицинским учреждением. Экстракцию стероидных гормонов проводили по схеме, разработанной ранее [14].

В стеклянную пробирку помещали 2 мл мочи и 10 мл хлороформа и тщательно перемешивали в течение 2 минут. После этого центрифугировали (3 мин) при скорости 9000 об/мин и отбрасывали верхний водный слой. Два раза промывали экстракт 0.1 М раствором NaOH (по 1 мл) и 2 мл дистиллированной водой. Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 и выпаривали досуха в токе воздуха. Сухой остаток растворяли в 100 мкл воды и анализировали методом КЭ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы при разделении сложных смесей гидрофобных аналитов особое внимание уделяется методу микроэмульсионной электрокинетической хроматографии, где фоновым электролитом является микроэмульсия [5, 6]. Для микроэмульсий, в отличие от их макроаналогов, характерна высокая площадь поверхности, и микроэмульсионные растворы оптически прозрачны. Микроэмульсия типа «масло-в-воде» (**М/В**) представляет собой дисперсию масла в воде, стабилизированную поверхностно-активным веществом и вспомогательным ПАВ. Разделение определяемых веществ методом МЭЭКХ в варианте «масло-в-воде» основано на сочетании электрофоретического и хроматографического механизма, т.е. распределения компонентов смеси между водной фазой и микроэмульсионными каплями. Ионная жидкость, в зависимости от длины алкильного радикала и природы аниона, может выступать в роли любого из трех компонентов микроэмульсии.

В качестве определяемых соединений выбраны стероидные гормоны – биохимические маркеры различных эндокринных патологий (рис. 1). Будучи нейтральными гидрофобными соединениями, стероиды являются подходящими объектами для разделения методами мицеллярной и микроэмульсионной электрокинетической хроматографии.

Имидазолиевые ИЖ с большим алкильным радикалом C_{12}MImCl, C_{16}MImCl могут выполнять роль либо модификатора, либо – ПАВ в составе микроэмульсии. Нами исследованы оба варианта. В первом случае проведена серия предварительных экспериментов по выбору условий электрофоретического разделения стероидов с использованием ДДСН в качестве анионного ПАВ. Приготовлена микроэмульсия следующего состава: 3.3 % ДДСН, 0.8 % гексан, 6.6 % бутанол-1, 89.3 % 5 мМ боратный буферный раствор, pH = 9.2 [15]. В этих условиях

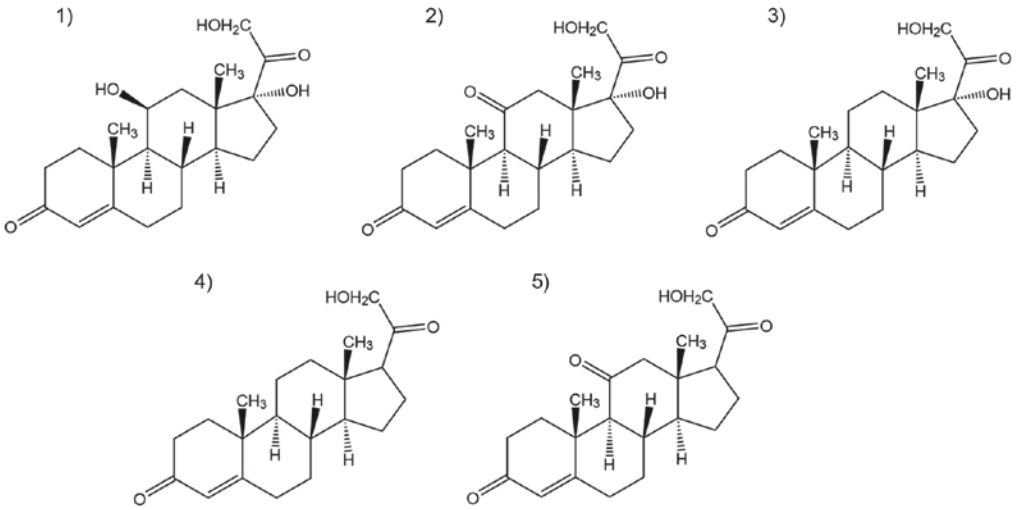

Рис. 1. Структурные формулы стероидных гормонов: 1) кортизол (F), 2) кортизон (E), 3) 11-дезоксикортизол (S), 4) 11-дезоксикортикостерон (DOC), 5) 11-дегидрокортикостерон (B).

Fig. 1. Structural formulas of steroid hormones: 1) cortisol (F), 2) cortisone (E), 3) 11-deoxycortisol (S), 4) 11-deoxycorticosterone (DOC), 5) corticosterone (B).

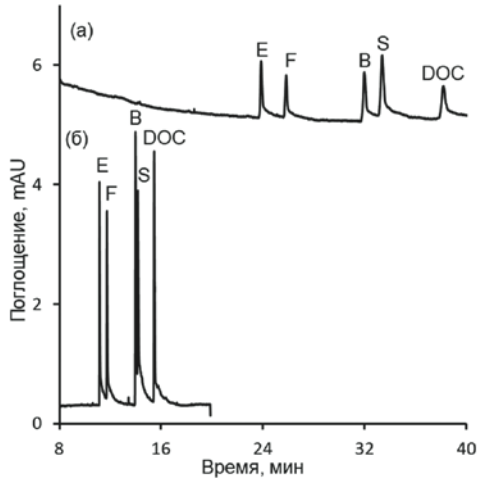

Рис. 2. Электрофореграммы смеси стероидов. Условия: фоновый электролит: (а) 3 % ДДСН, 0.8 % гексан, 8 % бутанол-1, 88.2 % 5 мМ боратный буферный раствор, pH = 9.2. (б) 0.6 % ДДСН, 0.8 % этилацетат, 1.6 % бутанол-1, 97.3 % 5 мМ боратный буферный раствор, pH = 9.2. Напряжение: 20 кВ. Ввод пробы: 2 с, 3 кПа.

Fig. 2. Electrophoregram of steroids mixture. Conditions: background electrolyte: (a) 3 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.8 % hexane, 8 % butanol-1, 88.2 % 5 mM borate buffer solution, pH = 9.2. (b) 0.6% SDS, 0.8 % ethyl acetate, 1.6 % butan-1-ol, 97.3 % 5 mM borate buffer solution, pH = 9.2. Voltage: 20 kV. Sample injection: 2 s, 3 kPa.

стероиды селективно разделяются, однако время анализа и эффективность разделения оказались неудовлетворительными. Для поиска подходящих условий варьировали:

- природу «масла»: *н*-гексан, *н*-гептан, этилацетат;
- соотношение «масло/со-ПАВ»;
- природу и pH буферного раствора (ацетатный pH = 2.0, фосфатный pH = 4.0 и 7.0, боратный pH = 9.2).

Замена гексана на более полярный этилацетат позволила существенно сократить время миграции аналитов и увеличить эффективность (от~120 до ~370 тыс. т.т.), что находится в хорошем соответствии с [16]. Найден следующий состав МЭ: 0.6 % ДДСН, 0.8 % этилацетат, 1.6 % бутанол-1, 97.3 % 5 мМ боратный буферный раствор, pH = 9.2 (рис. 2).

Обнаружено, что введение ИЖ в выбранную систему в концентрации 0.1-3 мМ приводит к незначительному росту селективности разделения и времени анализа (рис. 3), что может быть полезно при анализе сложных матриц за счет увеличения окна миграции. Причина этого явления заключается с одной стороны в модификации стенок кварцевого капилляра ионной жидкостью, предотвращающей нежелательную сорбцию аналитов и снижающей скорость электроосмотического потока. С другой стороны, ИЖ модифицирует капли микроэмульсии, изменяя их поверхностный заряд. В дальнейших экспериментах мы специальное внимание уделили выявлению роли ИЖ в качестве ПАВ.

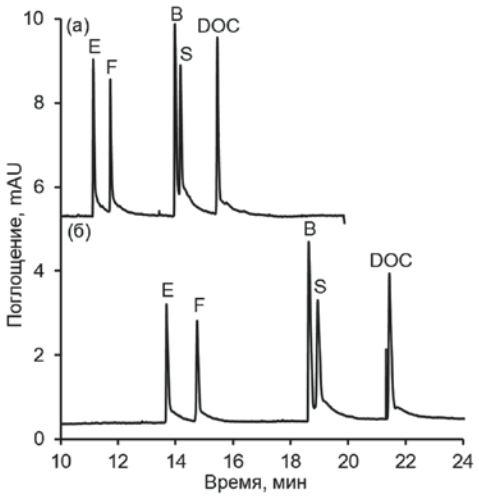

Рис. 3. Электрофореграмма смеси стероидов в условиях МЭЭКХ с введением C_{12}MImCl. Условия: фоновый электролит (а) 0.6 % ДДСН, 0.8 % этилацетат, 1.6 % бутанол-1, 97.3 % 5 мМ боратный буферный раствор, pH = 9.2, (б) 0.6 % ДДСН, 0.8 % этилацетат, 1.6 % бутанол-1, 1мМ C_{12}MImCl, 97.3 % 5 мМ боратный буферный раствор, pH = 9.2. Напряжение: 20 кВ. Ввод пробы: 2 с, 3 кПа.

Fig. 3. Electrophoregram of steroids mixture under MEEKC conditions with the introduction of C_{12}MImCl. Conditions: background electrolyte (a) 0.6 % SDS, 0.8 % ethyl acetate, 1.6 % butan-1-ol, 97.3 % 5 mM borate buffer solution, pH = 9.2, (b) 0.6 % SDS, 0.8 % ethyl acetate, 1.6 % butan-1-ol, 1 mM C_{12}MImCl, 97.3 % 5 mM borate buffer solution, pH = 9.2. Voltage: 20 kV. Sample injection: 2 s, 3 kPa.

Использование ионной жидкости C_{16}MImCl и C_{12}MImCl в качестве ПАВ

Микроэмульсия с имидазолиевой ионной жидкостью в качестве ПАВ заряжена положительно и мигрирует в направлении катода. При этом наличие ИЖ C_{16}MImCl в составе фонового электролита приводит и к модификации стенок кварцевого капилляра, в результате чего возникает обращенный ЭОП. Таким образом, определение стероидов проводили в условиях обращенной полярности (-20 кВ). Варьировали pH фонового электролита (ацетатный pH = 4.0, фосфатный pH = 7.0, боратный pH = 9.2) и длину алкильного радикала ИЖ – C_{12} и C_{16}. Лучшие значения эффективности и селективности разделения стероидных гормонов получены в фосфатном буферном электролите с pH = 7.0 с ИЖ C_{16}MImCl, что находится в хорошем соответствии с полученными нами ранее результатами в МЭКХ [17].

При поиске подходящих условий варьировали концентрацию C_{16}MImCl в диапазоне 0.8-2 %, с увеличением которой наблюдался рост эффективности при разделении стероидных гормонов (рис. 4). Максимальная эффективность (~1000 тыс. т.т.) достигнута при концентрации ИЖ 2 % мас.; остальной состав МЭ оставался неизменным: 0.5 % этилацетата, 1.2 % бутанола-1, 97.7 % 5 мМ фосфатный буферный раствор, pH = 7 (рис. 5). Следует отметить,

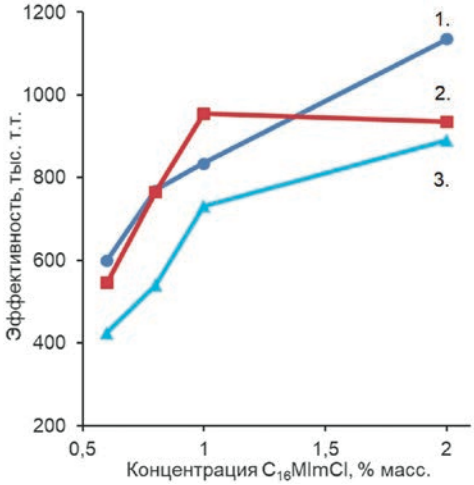

Рис. 4. Зависимость значения эффективности (*N*) от концентрации C_{16}MImCl в составе микроэмульсии при разделении стероидных гормонов. Стероидные гормоны: 1. Кортизон (E), 2. Кортизол (F), 3. 11-дезоксикортикостерон (DOC). Состав МЭ: 0.5 % этилацетата, 0.6-2 % C_{16}MImCl, 1.2 % бутанола-1, 97.7 % 5 мМ фосфатный буферный раствор, pH = 7 (приведены значения только для трех гормонов, так как B и S в данных условиях не разделяются).

Fig. 4. The dependence of the efficiency in the separation of steroids on the concentration of C_{16}MImCl in the composition of the microemulsion. Steroid hormones: 1. cortisol (F), 2. cortisone (E), 3. 11-deoxycorticosterone (DOC). The composition of the ME: 0.5 % ethyl acetate, 0.6-2 % C_{16}MImCl, 1.2 % butan-1-ol, 97.7 % 5 mM phosphate buffer solution, pH = 7 (values for only three hormones are given, since B and S in these conditions are not separated).

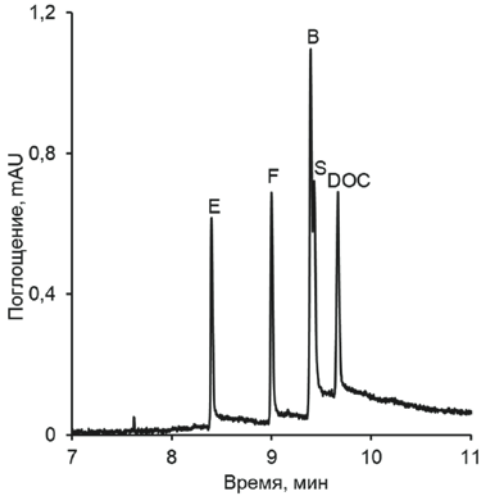

Рис. 5. Электрофореграмма стероидных гормонов при использовании C_{16}MImCl в качестве ПАВ. Условия: фоновый электролит: 2 % C_{16}MImCl, 0.5 % этилацетата, 1.2 % бутанола-1, 97.7 % 5 мМ фосфатный буферный раствор, pH = 7. Напряжение: -20 кВ. Ввод пробы: 2 с, 3 кПа.

Fig. 5. Electrophoregram of steroid hormones using C_{16}MImCl as surfactant. Conditions: background electrolyte: 2 % C_{16}MImCl, 0.5 % ethyl acetate, 1.2 % butan-1-ol, 97.7 % 5 mM phosphate buffer solution, pH = 7. Voltage: -20 kV. Sample injection: 2 s, 3 kPa.

что в этих условиях селективность разделения стероидных гормонов 11-дезоксикортизола (**S**) и 11-дегидрокортикостерона (**B**) недостаточна. Для ее увеличения в состав МЭ добавляли различные органические модификаторы: ацетонитрил, метанол, β-циклодекстрин, 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин. Введение органических растворителей приводило к размыванию пиков. Заметное влияние на селективность разделения обнаружено при введении в состав микроэмульсии 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина. Этот макроцикл способен формировать с молекулами стероидов комплексы по типу «гость-хозяин» [18].

Образование комплексов включения ГП-β-ЦД с кортикостероидами обеспечило полное разделение аналитов. При этом эффективность возросла до 900 тыс т.т., снизилось время анализа и изменился порядок элюирования стероидных гормонов (рис. 6).

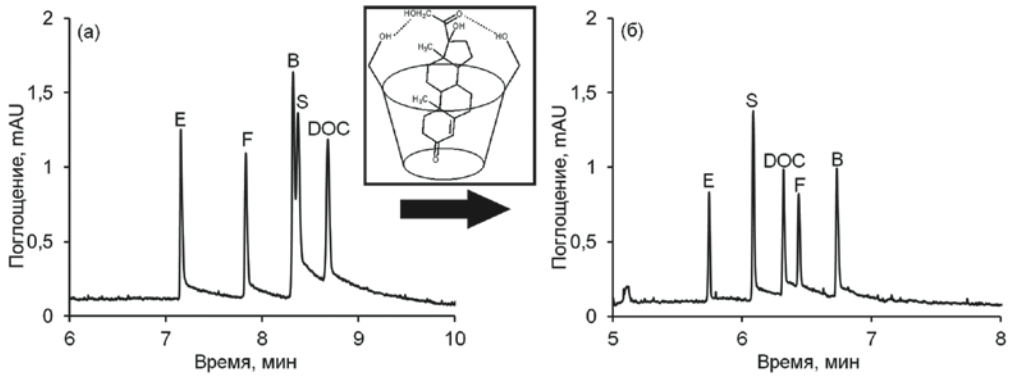

Рис. 6. Влияние 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина на разделение стероидных гормонов с использованием ИЖ C_{16}MImCl. Условия: фоновый электролит: (а) 0.8 % C_{16}MImCl, 0.5 % этилацетата, 1.2 % бутанола-1, 97.7 % 5 мМ фосфатный буферный раствор , pH = 7. (б) 0.8 % C_{16}MImCl, 0.5 % этилацетата, 1.2 % бутанола-1, 97.7 %, 15 мМ ГП-β-ЦД, 5 мМ фосфатный буферный раствор , pH = 7. Напряжение: -20 кВ. Ввод пробы: 2 с, 3 кПа.

Fig. 6. Effect of 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD) on the separation of steroid hormones using the IL C_{16}MImCl. Conditions: background electrolyte: (a) 0.8 % C_{16}MImCl, 0.5 % ethyl acetate, 1.2 % butan-1-ol, 97.7 % 5 mM phosphate buffer solution, pH = 7. (b) 0.8 % C_{16}MImCl, 0.5 % ethyl acetate, 1.2 % butan-1-ol, 97.7 %, 15 mM HP-β-CD, 5 mM phosphate buffer solution, pH = 7. Voltage: -20 kV. Sample injection: 2 s, 3 kPa.

В присутствии ГП-β-ЦД лучшие результаты наблюдались при более низком содержании ИЖ (0.8 %). Пределы обнаружения (**ПО**) стероидных гормонов в найденных условиях составили 0.5-1 мкг/мл, что недостаточно для их определения в биологических жидкостях. Для увеличения чувствительности изучены возможности различных вариантов on-line концентрирования (электростэкинг и свипинг) в МЭЭКХ. Водный раствор пробы гидродинамически вводили при 30 мбар в течение 30 с. Значение ПО стероидных гормонов составило ~50 нг/мл, что достаточно для их обнаружения в образцах мочи.

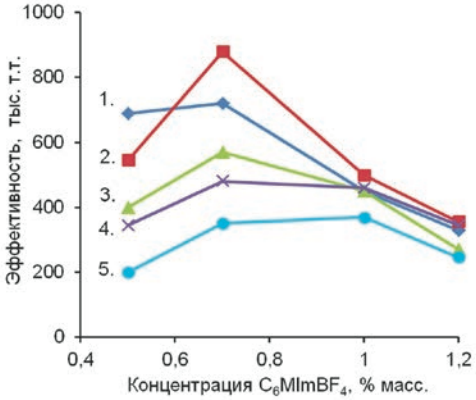

Рис. 7. Зависимость эффективности (*N*) от содержания C_6MImBF_4 в составе микроэмульсии при разделении стероидов. Стероидные гормоны: 1. кортизол (F), 2. кортизон (E), 3. 11-дезоксикортизол (S), 4. 11-дезоксикортикостерон (DOC), 5. 11-дегидрокортикостерон (B). Состав МЭ: 0.6 % ДДСН, 0.5-1.2 % C_6MImBF_4, 1.6 % бутанола-1, 97.7 % 5 мМ фосфатный буферный раствор, pH = 7.

Fig. 7. The dependence of the efficiency in the separation of steroids on the concentration of C_6MImBF_4 in the composition of the microemulsion. Steroid hormones: 1. cortisol (F), 2. cortisone (E), 3. 11-deoxycortisol (S), 4. 11-deoxycorticosterone (DOC), 5. corticosterone (B). The composition of microemulsion (ME): 0.6 % SDS, 0.5-1.2 % C_6MImBF_4, 1.6 % butan-1-ol, 97.7 % 5 mM phosphate buffer solution, pH = 7.

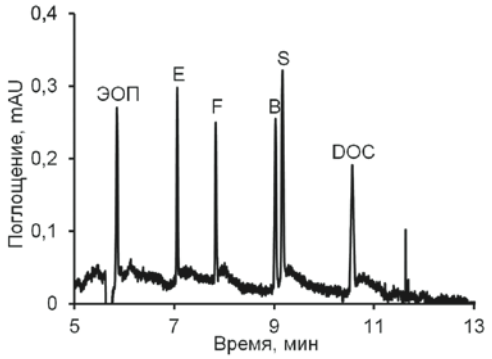

Рис. 8. Электрофореграмма смеси стероидных гормонов. Условия: фоновый электролит: 0.6 % ДДСН, 0.7 % C_6MImBF_4, 1.6 % бутанол-1, фосфатный буферный раствор, pH = 7. Напряжение: -20 кВ. Ввод пробы: 2 с, 3 кПа.

Fig. 8. Electrophoregram of steroid hormones mixture. Conditions: background electrolyte: 0.6 % SDS, 0.7 % C_6MImBF_4, 1.6 % butan-1-ol, phosphate buffer solution, pH = 7. Voltage: -20 kV. Sample injection: 2 s, 3 kPa.

Использование ионной жидкости C_6MImBF_4 в качестве масла

Достигнуто разделение смеси стероидов при варьировании содержания C_6MImBF_4 0.3-1 % мас. Известно, что повышение концентрации масла способствует увеличению времени анализа, что подтвердилось и в наших экспериментах, и росту эффективности разделения. При содержании ИЖ 0.3 % мас. разделения стероидов не происходило, несмотря на оптическую прозрачность и отсутствие расслоения, однако повышение содержания ИЖ до 0.5 % уже приводило к удовлетворительному разделению (рис. 7). Оптимальное содержание ИЖ составило 0.7 %; дальнейшее увеличение концентрации приводило к снижению эффективности разделения (рис. 8.).

Проведено сопоставление аналитических характеристик методов МЭКХ и МЭЭКХ с традиционно используемым ПАВ цетилтриметиламмоний бромидом при разделении стероидных гормонов (табл.). Все варианты обеспечивают достаточно селективное

Таблица

Сравнение аналитических характеристик методов МЭКХ и МЭЭКХ при разделении стероидных гормонов

Table

Comparison of analytical characteristics of the micellar electrokinetic chromatography (MEKC) and microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) methods in the separation of steroid hormones

Определяемый параметр	МЭКХ с $C_{16}MImCl$	МЭЭКХ с $C_{16}MImCl$	МЭКХ с ЦТАБ	МЭЭКХ с ЦТАБ
Эффективность, т.т.	400 000–610 000	630 000–820 000	350 000 – 500 000	300 000 – 400 000
Предел обнаружения, нг/мл	25 - 100	25-100	50 - 120	50-120
Время анализа, минут	15	7	15	7
RSD, %	1.3 – 1.5	0.8	0.5	0.8

разделение аналитов, однако использование ИЖ приводит к значительному росту эффективности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлена возможность применения имидазолиевых ионных жидкостей $C_{16}MImCl$ и C_6MImBF_4 в качестве компонентов микроэмульсии для экспрессного определения стероидных гормонов методом мицеллярной электрокинетической хроматографии. Достигнуты высокие значения эффективности (800 тыс. т.т.) и селективности разделения введением в состав МЭ 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина (15 мМ), что позволило сократить время анализа до 7 мин. Найденные условия использованы для определения стероидных гормонов в образцах мочи.

Благодарности

Выражаем благодарность Ресурсному образовательному центру по направлению химия СПбГУ за предоставленное оборудование.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ проекта № 17-03-01282-а.

Acknowledgements

We express our gratitude to the Resource Educational Center in the direction of chemistry of St. Petersburg State University for the provided equipment.

The current study was supported by RFFI grant № 17-03-01282-a.

ЛИТЕРАТУРА

1.Карцова Л.А., Ганжа О.В., Хмельницкий И.К. Факторы, влияющие на разделение полифенолов, стероидных гормонов и витаминов в режиме микроэмульсионной электрокинетической хроматографии // Сорбционные и хроматографические процессы. 2009. Т. 9, № 1. С. 33–42.
2. Pyell U. Micellar and Microemulsion Electrokinetic Chromatography // Capill. Electromigr. Sep. Methods, Elsevier, 2018. P. 113–142.
3. Monitoring of cefepime in urine by micellar electrokinetic capillary chromatography with ultraviolet detection and liquid chromatography coupled to mass spectrometry / Endimiani A. [et al.] // J. Sep. Sci. 2018. V. 41, № 21. P. 4067–4074.
4. Quantitative assessment of poorly soluble anticoagulant rivaroxaban by microemulsion electrokinetic chromatography / Wingert N.R. [et al.] // J. Chromatogr. Sci. 2018. V. 56, № 7. P. 650–655.
5. Chu B.L., Guo B.Y., Wang Z.H., Lin J.M. Enantioseparation of esbiothrin by cyclodextrin-modified microemulsion and micellar electrokinetic chromatography // J. Sep. Sci. 2008. V. 31. P. 3911-3920.
6. Yin C.N., Cao Y.H., Ding S.D., Wang Y. Rapid determination of water- and fat-soluble vitamins with microemulsion electrokinetic chromatography // J.Chromatogr.A. 2008. V. 1193. P. 172-177.
7. Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Колобова Е.А. Ионные жидкости – модификаторы хроматографических и электрофоретических систем // Журн. аналит. химии. 2016. Т. 71, № 2. С. 147–158.
8. Колобова Е.А., Карцова Л.А., Алопина Е.В., Смирнова Н.А. Разделение энантиомеров тирозина и β-блокаторов методом капиллярного электрофореза с участием аминокислотной ионной жидкости 1-бутил-3-метилимидазолий L-пролинат $[C_4MIm][L\text{-}Pro]$ в качестве хирального селектора // Аналитика и контроль. 2018. Т. 22, № 1. С. 51-60.
9. Kolobova E.A., Kartsova L.A., Kravchenko A.V., Bessonova E.A. Imidazolium ionic liquids as dynamic and covalent modifiers of electrophoretic systems for determination of catecholamines // Talanta. 2018. V. 188. P. 183–191.
10. Колобова Е.А., Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Кравченко А.В. On-line концентрирование биогенных аминов методом капиллярного электрофореза с использованием синтезированных ковалентных покрытий на основе ионных жидкостей // Аналитика и контроль. 2017. Т. 21, № 1. С. 57-64.
11. Колобова Е.А., Карцова Л.А., Бессонова Е.А. Применение ионных жидкостей на основе имидазола при электрофоретическом определении аминокислот в моче // Журн. аналит. химии. 2015. Т. 70. С. 1179-1185.
12. Determination of three curcuminoids in Curcuma longa by microemulsion electrokinetic chromatography with protective effects on the analytes / F. Li [et al.] // Anal. Methods. 2014. V.6. P. 2566–2571.
13. Simultaneous determination of α-, β- And γ-asarone in Acorus tatarinowii by microemulsion electrokinetic chromatography with [BMIM]PF6 as oil phase / Y. Wang [et al.] // Talanta. 2012. V.101. P. 510–515.
14. Карцова Л. А., Великанова Л. И., Павлова Е. Г., Бессонова Е. А. Изучение особенностей стероидогенеза больных с различными заболеваниями коры надпочечников методами обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журн. аналит. химии. 2004. Т. 59. С. 1081–1085.
15. Vomastová L., Mikšík I., Deyl Z. Microemulsion and micellar electrokinetic chromatography of steroids // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 1996. V.681. P. 107–113.
16. Silva C.A., Aurora-Prado M.S., Altria K.D., Tavares M.F.M. Separation of steroids and the determination of estradiol content in transdermic patches by microemulsion electrokinetic chromatography // Chromatographia. 2011. V.73. P. 373–378.
17. Бессонова Е.А., Карцова Л.А., Галлямова В.Ф. Влияние ионной жидкости хлорид 3-метил-1-цетилимидазолия на процессы электрофоретического концентрирования стероидных гормонов // Журн. аналит. химии. 2016. Т. 71. С. 724-730.
18. Flood K.G., Reynolds E.R., Snow N.H. Characterization of inclusion complexes of betamethasone-related steroids with cyclodextrins using high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A 2000. V.903. P. 49.

REFERENCES

1.Kartsova L.A., Ganzha O.V., Khmel'nitskii I.K. [Factors influencing to separation of steroid hormones, polyphenols and vitamins by method of microemulsion electrokinetic chromatography]. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy* [Sorption and chromatographic processes], 2009, vol. 9, no. 1, pp. 33-42. (in Russian)
2. Pyell U. Micellar and Microemulsion Electrokinetic Chromatography. *Capill. Electromigr. Sep. Methods*, Elsevier, 2018. pp. 113-142. doi: 10.1016/B978-0-12-809375-7.00005-8
3. Endimiani A., Sendi P., Šestáková N., Theurillat R., Kummer M., Huynh-Do U., Thormann W. Monitoring of cefepime in urine by micellar electrokinetic capillary chromatography with ultraviolet detection and liquid chromatography coupled

to mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, 2018, vol. 41, no. 21, pp. 4067-4074. doi: 10.1093/chromsci/bmy036
4.Wingert N.R., Dos Santos N.O., Campanharo S.C., Jablonski A., Steppe M. Quantitative assessment of poorly soluble anticoagulant rivaroxaban by microemulsion electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, 2018, vol. 56, no. 7, pp. 650-655. doi: 10.1002/jssc.201800763
5. Chu B.L., Guo B.Y., Wang Z.H., Lin J.M. Enantioseparation of esbiothrin by cyclodextrin-modified microemulsion and micellar electrokinetic chromatography. *J.Sep.Sci.*, 2008, vol. 31, pp. 3911-3920. doi: 10.1002/jssc.200800378
6. Yin C.N., Cao Y.H., Ding S.D., Wang Y. Rapid determination of water- and fat-soluble vitamins with microemulsion electrokinetic chromatography. *J.Chromatogr.A*, 2008, vol. 1193, pp. 172-177. doi: 10.1016/j.chroma.2008.04.016
7. Kartsova L.A., Bessonova E.A., Kolobova E.A. Ionic Liquids as modifiers of chromatographic and electrophoretic systems. *J. Anal. Chem*, 2016, vol. 71, pp. 141-152. doi: 10.7868/S0044450216020079
8. Kolobova E.A., Kartsova L.A., Alopina E.V., Smirnova N.A. [Separation of amino acids and β-blockers enantiomers by capillary electrophoresis with 1-butyl-3-methylimidazolium L-prolinate [C_4MIm][L-Pro] as a chiral selector]. *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2018, vol. 22, pp. 51-60. doi: 10.15826/analitika.2018.22.1.004 (in Russian)
9. Kolobova E.A., Kartsova L.A., Kravchenko A.V., Bessonova E.A. Imidazolium ionic liquids as dynamic and covalent modifiers of electrophoretic systems for determination of catecholamines. *Talanta*, 2018, vol. 188, pp. 183-191. doi: 10.1016/j.talanta.2018.05.057
10. 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]. *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2017, vol. 21, pp. 57-64. doi: 10.15826/analitika.2017.21.1.006 (in Russian)
11. Kolobova E.A, Kartsova. L.A., Bessonova E.A. Application of Ionic Liquids Based on Imidazole to the Electrophoretic Determination of Amino Acids in Urine. *J. Anal. Chem*, 2015, vol. 70, pp. 1354-1359. doi: 10.1134/S1061934815110076
12. Li F., Liu R., Yang F., Xiao W., Chen C., Xia Z. Determination of three curcuminoids in Curcuma longa by microemulsion electrokinetic chromatography with protective effects on the analytes. *Anal. Methods*, 2014, vol. 6, pp. 2566-2571. doi: 10.1039/C3AY42106F
13. Wang Y., Li F., Yang F., Zuo H., Xia Z. Simultaneous determination of α-, β- And γ-asarone in Acorus tatarinowii by microemulsion electrokinetic chromatography with [BMIM] PF6 as oil phase. *Talanta*, 2012, vol. 101, pp. 510-515. doi: 10.1016/j.talanta.2012.10.015
14. Kartsova L.A., Velikanova L.I., Pavlova E.G., Bessonova E.A. Steroidogenesis in patients with various adrenal cortex diseases as studied by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Anal. Chem*, 2004, vol. 59, pp. 976-982. doi: 10.1023/B:JANC.0000043915.76485.e0
15. Vomastová L., Mikšík I., Deyl Z. Microemulsion and micellar electrokinetic chromatography of steroids. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl*, 1996, vol. 681, pp. 107-113. doi: 10.1016/0378-4347(95)00502-1
16. Silva C.A., Aurora-Prado M.S., Altria K.D., Tavares M.F.M. Separation of steroids and the determination of estradiol content in transdermic patches by microemulsion electrokinetic chromatography. *Chromatographia*, 2011, vol. 73, pp. 373-378. doi: 10.1007/s10337-010-1899-9
17. Bessonova E.A., Kartsova L.A., Gallyamova V.F. Effect of 3-methyl-1-cetylimidazolium chloride ionic liquid on the electrophoretic preconcentration of steroid hormones. *J. Anal. Chem*, 2016, vol. 71, pp. 696-702. doi: 10.1134/S1061934816070042
18. Flood K.G., Reynolds E.R., Snow N.H. Characterization of inclusion complexes of betamethasone-related steroids with cyclodextrins using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2000, vol. 903, pp. 49. doi: 10.1016/S0021-9673(00)00867-0