УДК 543.544 Вестник СПбГУ. Сер. 4. Т. 2 (60). 2015. Вып. 2

Е. А. Колобова, Л. А. Карцова, Е. А. Бессонова

ИОННЫЕ ЖИДКОСТИ НА ОСНОВЕ ИМИДАЗОЛА В КАЧЕСТВЕ МОДИФИКАТОРОВ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ СИСТЕМ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ БИОГЕННЫХ АМИНОВ И СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ*

Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

Выявлено влияние ионных жидкостей (ИЖ) в качестве псевдостационарной фазы на параметры миграции гидрофильных (катехоламины) и гидрофобных (стероидные гормоны) аналитов в условиях капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) и мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ). Установлено, что введение ИЖ на основе имидазола (C_{12}MImCl, C_{16}MImCl) в буферный электролит (фосфатный буфер (pH = 2,0)) приводит к росту эффективности в 2–3 раза при определении катехоламинов в условиях КЗЭ и селективности разделения в режиме МЭКХ. Показано, что применение внутрикапиллярного концентрирования — стэкинга с усилением поля — с использованием ионной жидкости C_{16}MImCl в составе рабочего буфера позволило сконцентрировать адреналин, норадреналин, дофамин, норметанефрин в 10–14 раз. Предложен способ электрофоретического разделения кортикостероидов с применением C_{16}MImCl в качестве псевдостационарной фазы. Библиогр. 8 назв. Ил. 2. Табл. 2.

Ключевые слова: ионные жидкости, капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ), мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЭКХ), псевдостационарная фаза, экстракция, стероидные гормоны, биогенные амины.

E. A. Kolobova, L. A. Kartsova, E. A. Bessonova

IONIC LIQUIDS BASED ON IMIDAZOLE AS MODIFIERS OF ELECTROPHORETIC SYSTEMS DURING DETERMINATION OF BIOGENIC AMINS AND STEROID HORMONS

St. Petersburg State University, 7–9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation

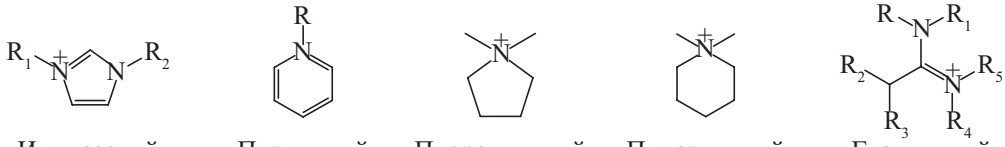
The influence of ionic liquids (ILs) as pseudo-stationary phase (PSP) on migration parameters of hydrophilic (catecholamines) and hydrophobic (steroid hormones) analytes in capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) was determined. It was established that the addition of IL based on imidazole (C_{12}MImCl, C_{16}MImCl) to the buffer electrolyte (phosphate buffer, pH = 2.0) resulted in efficiency increasing by a factor of 2–3 in the determination of catecholamines in CZE and separation selectivity in MEKC mode. It was shown that the use of on-line preconcentration — field amplified sample stacking — with the use of ionic liquid C_{16}MImCl as a component of buffer electrolyte allowed to increase the concentration of epinephrine, norepinephrine, dopamine, normetanephrine up to 10–14 times. Therefore, a method for electrophoretic separation of corticosteroids using C_{16}MImCl as the pseudo-stationary phase has been proposed. Refs 8. Figs 2. Tables 2.

Keywords: ionic liquids, capillary zone electrophoresis (CZE), micellar electrokinetic chromatography (MEKC), the pseudo-stationary phase, extraction, steroid hormones, biogenic amines.

Введение. Ионные жидкости (ИЖ) — это соли, температура плавления которых ниже 100°C [1–3]. Однако существуют соединения, состоящие из ионов, жидкие при комнатной температуре или обладающие температурой плавления ниже температуры

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект ННИО 14-03-00735-а.

кипения воды — «room temperature — ionic liquids» (RTILs) [1–3]. Как правило, их молекулы состоят из объёмного органического катиона (имидазолиевый (Im), пиридиниевый (Pyr) или пирролидиниевый, аммониевый или фосфониевый) и органического (трифторацетат, трифлат ($CF_3SO_3^-$), ацетат ($CH_3CO_2^-$)) или неорганического (бромид, хлорид, нитрат, перхлорат, тетрафторборат, гексафторфосфат, тиоцианат (NCS^-)) аниона [1].



Имидазолий Пиридиний Пирролидиний Пиперидиний Гуанидиний

В последние годы отмечен активный интерес к использованию ИЖ в методах разделения [4–8]. Возможность варьировать природу составляющих ионов позволяет регулировать свойства ИЖ [2, 3], что открывает перспективы их использования в качестве добавок в составе подвижных фаз в жидкостной хроматографии [4, 5] и рабочих буферов в капиллярном электрофорезе (КЭ) [6, 7]. Особый интерес представляют ИЖ с длинным углеводородным радикалом. Они, подобно поверхностно-активным веществам (ПАВ), при определённой концентрации могут образовывать мицеллы [8], что обеспечивает одновременное определение гидрофобных и гидрофильных аналитов [6, 7].

В качестве модельных нами выбраны гидрофобные (кортикостероиды) и гидрофильные соединения (катехоламины). Предполагалось изучить влияние ИЖ на основе имидазола на электрофоретические параметры миграции выбранных аналитов в условиях КЗЭ и МЭКХ.

Экспериментальная часть. Материалы и реагенты. Соляная кислота (ос.ч.), гидроксид натрия (ч.д.а.), ортофосфорная кислота (х.ч.), дигидрофосфат натрия двухводный (х.ч.), 1-додецил-3-метилимидазолий хлорид (C_{12}MImCl) (Acros organics), борная кислота («реахим», ос.ч), 3-метил-1-цетилимидазолий хлорид (C_{16}MImCl), цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ) (Acros organics), ацетонитрил («криохром», сорт 0), дистиллированная вода, кортизол (F) («Sigma-Aldrich»), кортизон (E) («Sigma-Aldrich»), кортикостерон (B) («Sigma-Aldrich»), 11-дезоксикортизол (S) («Sigma-Aldrich»), адреналин (AD) («Sigma-Aldrich»), норадреналин (NA) («Sigma-Aldrich»), дофамин (DA) («Sigma-Aldrich»), норметанефрин (NM) («Sigma-Aldrich»).

Оборудование. Системы капиллярного электрофореза «Капель-105М» со спектрофотометрическим детектором («Люмэкс», СПб) и «Agilent 7100» с диодно-матричным детектором («Agilent Technologies», США). Кварцевые капилляры с внешним полиимидным покрытием: общая длина капилляра — 50 см, эффективная длина капилляра — 60 см; внешний диаметр — 360 мкм, внутренний диаметр — 50 мкм. Центрифужный испаритель «Concentrator Plus» («Eppendorf», Германия); шейкер «Multi-vortex V-32» фирмы «Biosan»; pH-метр «HI 2210-2216» («Hanna»).

Микрошприцы на 20, 200, 1000 мкл (Biohite); колбы мерные стеклянные 25, 50, 100 и 250 мл, микропробирки типа эппендорф на 1,5 мл, стеклянные виалы с полипропиленовыми крышками объёмом 1,5 мл, полипропиленовые виалы с полипропиленовыми крышками объёмом 250 мкл.

Приготовление стандартных и рабочих растворов. Навески (0,050 г) стероидных гормонов (F, E, B, S) вносили в мерные колбы объёмом 50 мл, растворяли в 40 мл ацетонитрила и доводили раствор до метки ацетонитрилом.

Навески катехоламинов (0,050 г) (AD, NA, DA, NM) вносили в мерные колбы объёмом 50 мл, растворяли в 40 мл 0,1М раствора соляной кислоты и доводили раствор до метки 0,1М раствором соляной кислоты.

Рабочие растворы готовили разбавлением стандартных в 50 раз дистиллированной водой или буферным электролитом.

Условия электрофоретического разделения аналитов. Температура капилляра: 20°С. Гидродинамический ввод пробы: 60–1000 мбар·с; напряжение: ±20 кВ; УФ-детектирование: 220 нм (для биогенных аминов) и 242 нм (для кортикостероидов). Варьировали pH (2,0; 9,3) и концентрацию (10–75 мМ) буферного электролита, концентрации C_{12}MImCl, C_{16}MImCl, ЦТАБа, β-циклодекстрина (3–150 мМ).

В качестве маркера ЭОП использовался 3%-ный раствор диметилсульфоксида (ДМСО) в соответствующем буферном электролите. Перед началом работы капилляр промывали 0,5М раствором HCl в течение 10 мин, дистиллированной водой 5 мин, 0,5М раствором NaOH 10 мин, снова дистиллированной водой 5 мин и буферным электролитом в течение 15 мин. Между опытами капилляр промывали буферным электролитом в течение 3 мин.

Обсуждение результатов. В сфере наших интересов ионные жидкости на основе имидазола с алкильными радикалами C_{12} и C_{16}. Подобно ПАВ, при определённых концентрациях они могут образовывать мицеллы, формируя псевдостационарную фазу; присутствие положительно заряженной имидазольной группы в составе их молекул могло бы способствовать динамической модификации отрицательно заряженных стенок кварцевого капилляра, предотвращая сорбцию основных аналитов. Это и предполагалось проверить.

В работе исследовано влияние ионных жидкостей C_{12}MImCl и C_{16}MImCl на электрофоретические параметры миграции биогенных аминов при разных значениях pH (2,0; 9,3) буферного электролита.

Введение ионной жидкости C_{12}MImCl в рабочий буфер способствовало динамической модификации стенок кварцевого капилляра, что подтверждалось наличием обращенного электроосмотического потока (ЭОП). До достижения критической концентрации мицеллообразования (ККМ) скорость ЭОП увеличивалась, а затем — уменьшалась за счёт формирования мицелл (рис. 1).

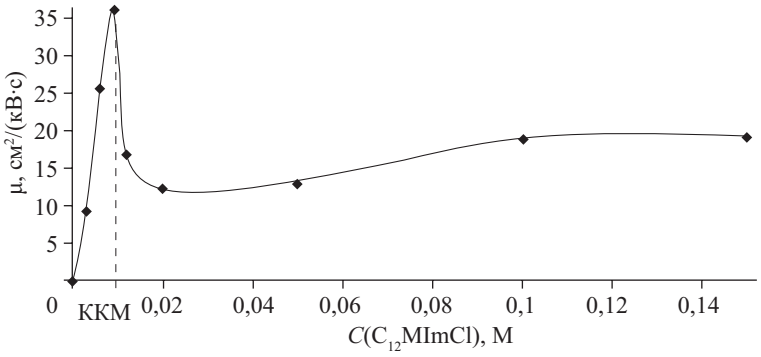


Рис. 1. Зависимость скорости электроосмотического потока от концентрации ИЖ в буферном электролите:

система капиллярного электрофореза «Капель-105»; кварцевый капилляр $L_{общ.}/L_{эфф.}$ = 60/50 см, внутренний диаметр — 50 мкм; ввод пробы — 5 с × 30 мбар; маркер ЭОП—ДМСО; буферный электролит: 10 мМ фосфатный буферный раствор, pH = 2,0

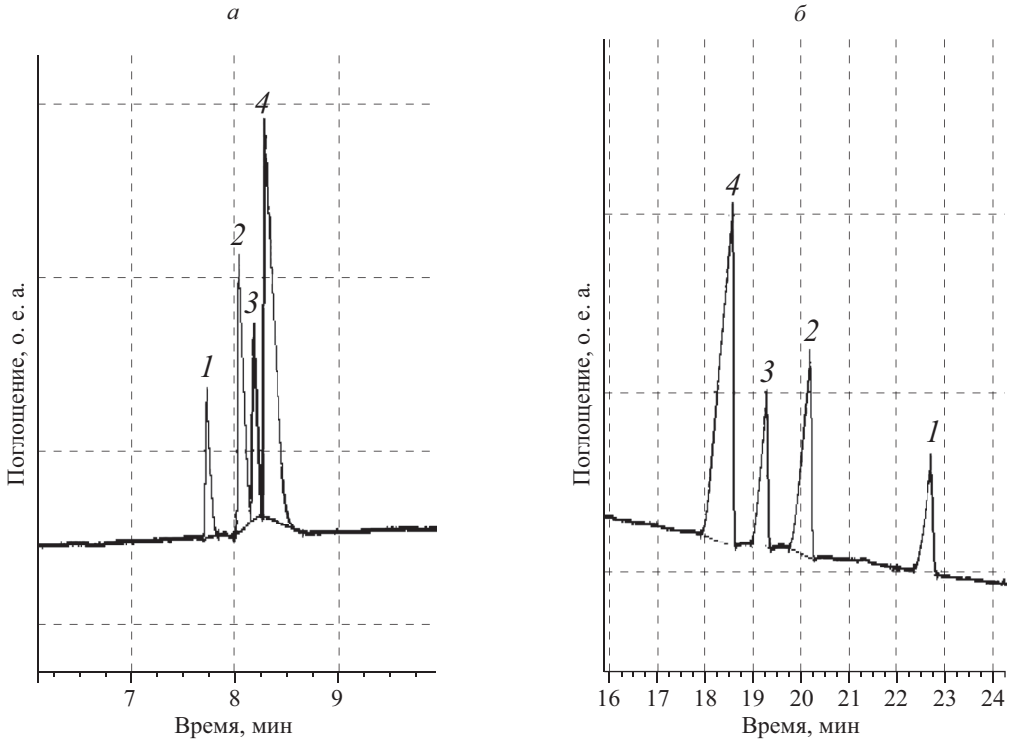


Рис. 2. Электрофореграмма смеси биогенных аминов в отсутствие ионной жидкости при напряжении +20 кВ (*а*), с добавлением 150мМ C_{12}MImCl в состав буферного электролита при напряжении −20 кВ (*б*):

буферный электролит — 10мМ фосфатный буфер, pH = 2,0; УФ-детектирование — 220 нм; *1* — дофамин; *2* — норадреналин; *3* — норметанефрин; *4* — адреналин

Биогенные амины в кислой среде заряжены положительно и в условиях КЗЭ мигрируют по направлению к катоду за счёт собственных электрофоретических подвижностей (рис. 2, *а*).

При введении ионной жидкости C_{12}MImCl в состав рабочего буфера в концентрации, меньшей ККМ, наблюдалась динамическая модификация стенок кварцевого капилляра, сопровождаемая увеличением эффективности в случае катехоламинов в 2–3 раза (табл. 1). При концентрации ионной жидкости, превышающей значение ККМ, реализуется режим мицеллярной электрокинетической хроматографии. В этом случае увеличивается селективность разделения катехоламинов (рис. 2, *б*, табл. 1).

Фактор разрешения (R_s) рассчитывался по формуле

$$R_s = 2\frac{t_{R1} - t_{R2}}{w_2 + w_1},$$

где t_{R1} — время миграции первого компонента; t_{R2} — время миграции второго компонента; w_1 — ширина пика первого компонента у основания; w_2 — ширина пика второго компонента у основания.

Полученные величины сопоставлены с соответствующими значениями традиционно используемого катионного детергента — цетилтриметиламмония бромида (табл. 2).

Таблица 1

Значения эффективности (N) для катехоламинов при различной концентрации ионной жидкости (C_{12}MImCl) в составе рабочего буфера (10мМ фосфатный буфер, pH = 2,0)

Аналиты	Эффективность (N), т. т./м		
	при отсутствии ИЖ	9мМ C_{12}MImCl	150мМ C_{12}MImCl
AD	32 400	109 300	16 300
NM	130 100	212 400	55 600
NA	94 000	125 100	36 100
DA	141 400	329 800	61 100

Таблица 2

Значения факторов разрешения (R_s) разделения аминокислот с использованием разных детергентов в составе фосфатного буфера (10мМ, pH = 2,0)

Аминокислоты	Фактор разрешения (R_s)			
	при отсутствии ИЖ	3мМ C_{16}MImCl	150мМ C_{12}MImCl	6мМ ЦТАБ
AD/NM	1,07	2,16	1,08	1,04
NM/NA	1,03	2,52	1,15	1,03
NA/DA	1,03	7,11	3,26	1,10

Ионные жидкости C_{16}MImCl и C_{12}MImCl могут образовывать мицеллы при концентрации выше 0,8мМ и 12–15мМ соответственно ($ККМ_{ЦТАБ}$ = 1,2мМ). При одинаковой концентрации ИЖ в буферном электролите, количество мицелл, образованных молекулами C_{16}MImCl, больше, поэтому факторы разрешения выше. При введении ЦТАБ в концентрации большей ККМ в состав буферного электролита наблюдалось уширение пиков аналитов и уменьшались факторы разрешения.

Для снижения пределов обнаружения аналитов использовали возможности *on-line* концентрирования — стэкинга с усилением поля (*field-amplified sample stacking*, *FASS*), который основан на различии в электропроводности раствора пробы и буферного электролита. Гидродинамически вводили в кварцевый капилляр больший объём пробы из раствора с меньшей электропроводностью, чем электропроводность буферного электролита. При включении напряжения положительно заряженные биогенные амины электрофоретически мигрируют к катоду с локальной большей скоростью в зоне пробы и концентрируются в конце этой зоны на границе раздела с буферным электролитом. Навстречу им движется отрицательный ЭОП, способствуя дополнительному концентрированию аналитов.

Эффективность концентрирования биогенных аминов оценивали по факторам эффективности концентрирования (*SEF — stacking efficiency factors*) по формуле

$$SEF_h = \frac{H_{\text{stack}}}{H}\,\Delta,$$

где H_{stack} — высота пика при стэкинге; H — высота пика при обычном вводе (2 с, 30 мбар); Δ — фактор разбавления.

Максимальные факторы концентрирования наблюдались при введении пробы в течение 10 с под давлением 50 мбар. Факторы концентрирования биогенных аминов в условиях стэкинга с усилением поля составили: SEF_h (адреналин) — 12,8; SEF_h (норметанефрин) — 11,7; SEF_h (норадреналин) — 11,2; SEF_h (дофамин) — 10,1. При даль-

нейшем увеличении времени ввода пробы наблюдался дестэкинг, вызывающий размывание зоны пробы.

Исследована возможность использования ИЖ C_{12}MImCl и C_{16}MImCl в качестве псевдостационарной фазы при определении нейтральных аналитов — стероидных гормонов, которые в условиях КЗЭ мигрируют вместе с ЭОП.

После серии предварительных электрофоретических экспериментов по варьированию значений pH (2,0; 9,3) и концентрации буферного электролита (от 10мМ до 150мМ фосфатного и боратного буферного раствора), а также концентраций ионной жидкости C_{16}MImCl (3–75мМ) и β-циклодекстрина (1–9,0мМ) в составе буферного электролита найдены оптимальные условия разделения кортикостероидов: 15мМ C_{16}MImCl, 8,5мМ раствор β-циклодекстрина.

Выводы. Таким образом, установлено, что введение ионных жидкостей на основе имидазола (C_{12}MImCl, C_{16}MImCl) в буферный электролит (фосфатный буфер (pH = 2,0)) приводит к росту эффективности в 2–3 раза при определении биогенных аминов в условиях КЗЭ и селективности разделения в режиме МЭКХ. Показано, что применение стэкинга с усилением поля с использованием C_{16}MImCl в составе буферного электролита позволило сконцентрировать адреналин, норадреналин, дофамин, норметанефрин в 10–14 раз. Предложен вариант электрофоретического разделения кортикостероидов в условиях МЭКХ с использованием ионной жидкости C_{16}MImCl в качестве псевдостационарной фазы.

Литература

1. *Berthod A., Ruiz-Angel M. J., Carda-Broch S.* Ionic liquids in separation techniques // J. Chromatogr. (A). 2008. Vol. 1184. N 1–2. P. 6.

2. *Yang Q., Dionysiou D. D.* Photolytic degradation of chlorinated phenols in room temperature ionic liquids // J. Photochem. Photobiol. (A). 2004. Vol. 165. P. 229.

3. *Huddleston J. G., Visser A. E., Reichert W. M.* et al. Characterization and compassion of hydrophilic and hydrophobic RTILs incorporating the imidazolium cation // Green Chem. 2001. Vol. 3. P. 156.

4. *He L., Zhang W., Zhao L.* et al. Effect of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids as the eluent on the separation of ephedrines by liquid chromatography // J. Chromatogr. (A). 2003. Vol. 1007. P. 39.

5. *Zhang W., He L., Gu Y.* et al. Effect of ionic liquids as mobile phase additives on retention of catecholamines in reversed-phase high-performance liquid chromatography // Analytical Lett. 2003. Vol. 36. P. 827.

6. *Yanes E. G., Gratz S. R., Baldwin M. J.* et al. Capillary electrophoretic application of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids // Anal. Chem. 2001. Vol. 73. P. 3838.

7. *Niu J., Qiu H., Li J.* et al. 1-Hexadecyl-3-methylimidazolium ionic liquid as a new cationic surfactant for separation of phenolic compounds by MEKC // J. Chromatogr. (A). 2009. Vol. 69. P. 1093.

8. *Jungnickel C., Łuczak J., Ranke J.* et al. Micelle formation of imidazolium ionic liquids in aqueous solution // Colloids and Surfaces (A). 2008. Vol. 316. P. 278.

References

1. Berthod A., Ruiz-Angel M.J., Carda-Broch S. Ionic liquids in separation techniques. *J. Chromatogr. (A).* 2008. Vol. 1184. N 1–2. pp.6.

2. Yang Q., Dionysiou D.D. Photolytic degradation of chlorinated phenols in room temperature ionic liquids. *J. Photochem. Photobiol. (A).* 2004. Vol. 165. pp.229.

3. Huddleston J.G., Visser A.E., Reichert W.M. et al. Characterization and compassion of hydrophilic and hydrophobic RTILs incorporating the imidazolium cation. *Green Chem.* 2001. Vol. 3. pp.156.

4. He L., Zhang W., Zhao L. et al. Effect of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids as the eluent on the separation of ephedrines by liquid chromatography. *J. Chromatogr. (A).* 2003. Vol. 1007. pp.39.

5. Zhang W., He L., Gu Y. et al. Effect of ionic liquids as mobile phase additives on retention of catecholamines in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical Lett.* 2003. Vol. 36. pp.827.

6. Yanes E.G., Gratz S.R., Baldwin M.J. et al. Capillary electrophoretic application of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids. *Anal. Chem.* 2001. Vol. 73. pp.3838.

7. Niu J., Qiu H., Li J. et al. 1-Hexadecyl-3-methylimidazolium ionic liquid as a new cationic surfactant for separation of phenolic compounds by MEKC. *J. Chromatogr. (A).* 2009. Vol. 69. pp.1093.

8. Jungnickel C., Łuczak J., Ranke J. et al. Micelle formation of imidazolium ionic liquids in aqueous solution. *Colloids and Surfaces (A).* 2008. Vol. 316. pp.278.

Статья поступила в редакцию 17 января 2015 г.

Контактная информация

Колобова Екатерина Алексеевна — аспирантка; e-mail: ekatderyabina@mail.ru
Карцова Людмила Алексеевна — доктор химических наук, профессор; e-mail: kartsova@gmail.com
Бессонова Елена Андреевна - кандидат химических наук, доцент; e-mail: lena_pol@inbox.ru

Kolobova Ekaterina Alekseevna — post-graduate student; e-mail: ekatderyabina@mail.ru
Kartsova Luidmila Alekseevna - Doctor of Chemistry, Professor; e-mail: kartsova@gmail.com
Bessonova Elena Andreevna - Candidate of Chemistry, Associate Professor; e-mail: lena_pol@inbox.ru