

## Применение дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции с использованием в качестве экстрагента 3-метил-1-октил-имидазолий тетрафторбората для электрофоретического определения стероидных гормонов в образцах мочи

\*Е.А. Колобова<sup>1</sup>, Л.А. Карцова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский Центр Экстренной и Радиационной Медицины им. А.М. Никифорова, Российская Федерация, 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Оптиков, 54

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 198504, г. Санкт-Петербург, Петродворец, Университетский пр., 26

\*Адрес для переписки: Колобова Екатерина Алексеевна, E-mail: [Ekaterina.A.Kolobova@mail.ru](mailto:Ekaterina.A.Kolobova@mail.ru)

Поступила в редакцию 31 июля 2018 г., после доработки – 27 августа 2018 г.

В работе предложен вариант электрофоретического определения стероидных гормонов в образцах мочи с использованием на стадии пробоподготовки дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции в имидазолиевую ионную жидкость (ИЖ). В качестве экстрагента были апробированы ИЖ  $C_6MImNTf_2$ ,  $C_6MImBF_4$ ,  $C_8MImBF_4$ , а в роли диспергатора испытаны метанол, ацетонитрил, ацетон. Показано, что природа ИЖ влияет на полноту экстракции стероидных гормонов: степени извлечения аналитов возрастают при использовании ИЖ с анионом  $BF_4^-$  вместо  $NTf_2^-$  и увеличении длины алкильного радикала в имидазолиевом катионе. Установлено, что pH водной фазы не влияет на экстракцию стероидных гормонов. Наибольшие значения степеней извлечения аналитов (69-93 %) получены при добавлении к 5 мл водного образца 150 мкл ионной жидкости  $C_8MImBF_4$ , растворенной в 0.5 мл ацетона. Разработанный вариант пробоподготовки был успешно применен при электрофоретическом определении кортикостероидов в образцах мочи. Установлено, что высокая концентрация солевых компонентов в матрице пробы благоприятствуют массопереносу аналитов в органическую фазу и степени извлечения в ИЖ увеличиваются. Факторы концентрирования в процессе пробоподготовки составили 23-30; достигнутые пределы количественного определения - 8-12 нг/мл.

**Ключевые слова:** имидазолиевые ионные жидкости, жидкостно-жидкостная экстракция, дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция, стероидные гормоны, капиллярный электрофорез.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2018, vol. 22, no. 3, pp. 284-291

DOI: 10.15826/analitika.2018.22.3.011

## Application of dispersive liquid-liquid microextraction with 3-methyl-1-octyl imidazolium tetrafluoroborate as an extractant for the electrophoretic determination of steroid hormones in urine sample

\*Е.А. Колобова<sup>1</sup>, Л.А. Карцова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, 54 Optikov st., St. Petersburg, 199034, Russian Federation

<sup>2</sup>Saint-Petersburg State University, Institute of Chemistry, 26 Universitetskii prospect, St. Petersburg, Petergof 198504, Russian Federation

\*Corresponding author: Ekaterina A. Kolobova, E-mail: [Ekaterina.A.Kolobova@mail.ru](mailto:Ekaterina.A.Kolobova@mail.ru)

Submitted 31 July 2018, received in revised form 27 August 2018

In the current research, a method of electrophoretic determination of steroid hormones in urine sample with the use of dispersive liquid-liquid microextraction in imidazolium ionic liquid (IL)  $C_8MImBF_4$  during the sample preparation step was proposed. Ionic liquids  $C_6MImNTf_2$ ,  $C_6MImBF_4$ ,  $C_8MImBF_4$  were examined as extractants while acetone, methanol and acetonitrile were tested as dispersants. It was found that the IL nature influences the extraction of steroid hormones, i.e. the extraction degrees were raised when IL with  $BF_4^-$  anion was used instead of  $NTf_2^-$ , and when the length of alkyl radical in imidazolium cation was increased. It was also established that pH of water phase did not affect the steroid hormones extraction. The highest extraction degree values of analytes (69-93%) were obtained under the following condition: addition of 150  $\mu$ l of IL  $C_8MImBF_4$  dissolved in 0.5 ml of acetone to 5 ml aqueous sample. The developed sample preparation technique was successfully applied to the determination of corticosteroid in urine. It was found that the high concentration of salt in the sample matrix favors the mass transfer of analyte to organic phase, and the extraction degrees in IL were increased. The preconcentration factors in sample preparation were 23-30; the achieved limits of quantification were 8-12 ng/ml.

**Keywords:** imidazolium ionic liquids, liquid-liquid microextraction, dispersive liquid-liquid microextraction, steroid hormones, capillary electrophoresis.

## ВВЕДЕНИЕ

Среди наиболее применяемых способов пробоподготовки биологических жидкостей к хроматографическому или электрофоретическому анализу является твердофазная экстракция (ТФЭ), или сорбционное концентрирование. При этом длительная многоступенчатая процедура в сочетании с дорогостоящей картриджной делает иногда этот вариант менее привлекательным. С этой точки зрения, применение жидкостно-жидкостной экстракции (ЖЖЭ) представляется наиболее востребованным. Однако достаточно большие объемы летучих органических растворителей ограничивают использование ЖЖЭ при рутинных анализах.

Перспективным направлением в современной аналитической химии является миниатюризация химического анализа с реализацией различных вариантов микроэкстракции, что позволяет значительно снизить расход экстрагентов (до сотен мкл) и достичь высоких коэффициентов концентрирования. Наибольшее распространение при пробоподготовке получили экстракция в точку помутнения (Cloud Point Extraction, CPE) [1, 2], микроэкстракция в одну каплю (Single Drop Microextraction, SDME) [3, 4], дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME) [5, 6], впервые предложенная в 2006 г. Резаи и др. [7]. Она проста в реализации, а именно: смешивают водный образец, содержащий определяемый аналит, с экстрагентом (несколько микролитров), не растворимым в воде, с помощью диспергатора (0.5-1 мл). Последний, в свою очередь, хорошо смешивается как с экстрагентом, так и с водой (рис. 1). Далее фазы разделяют центрифугированием, и экстрагент подвергают ВЭЖХ анализу. Высокие значения степеней извлечения целевых компонентов достигаются за счет большой площади контакта экстрагента и водного образца, что способствует лучшему массопереносу аналита в органическую фазу.

В качестве экстрагентов используют четыреххлористый углерод, хлороформ, этилацетат, простые эфиры; а диспергаторами обычно служат метанол, этанол, ацетонитрил или ацетон. Так, в [8] методом УФ ВЭЖХ с использованием диспер-

сионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции и последующей дериватизацией определяли холестерин и 6 стероидных гормонов (прегненолон,  $17\alpha$ -гидроксипрегненолон, дегидроэпиандростерон, 5-андростендиол, тестостерон, эстрадиол) в плазме и сыворотке крови и моче. Пробоподготовка заключалась в смешивании водного образца и бромциклогексана (экстрагента) с помощью этанола (диспергатора), осаждения, отбора органической фазы и дериватизации извлеченных компонентов производным родамина.

В [9] выявлены возможности дихлорметана, хлороформа и четыреххлористого углерода в качестве экстрагентов стероидных гормонов из мочи и плазмы крови человека, а в роли диспергатора апробированы ацетонитрил, метанол, ацетон, этанол и растворы поверхностно-активных веществ (Тергитол® ТМН-6 и Тритон X-100). Наибольшие значения степеней извлечения (74-78 %) достигнуты при использовании  $CCl_4$  и Тритона X-100, а применение ультразвука позволило дополнительно эти значения повысить.

Другим направлением в области жидкостной экстракции явился поиск новых «зеленых» растворителей. Активный интерес в методах разделения и концентрирования проявляется к ионным жид-

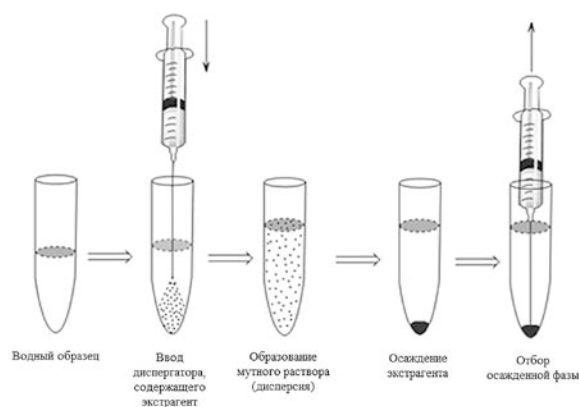


Рис. 1. Общая схема дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции [7]

Fig. 1. The general scheme of dispersive liquid-liquid microextraction [7]

костям (ИЖ) [10-14], нашедшим применение в различных вариантах микроэкстракции: экстракция в каплю [15-17], гомогенная жидкостно-жидкостная микроэкстракция (Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction, **HLLME**) [18,19], в которой в качестве экстрагентов могут применяться и гидрофильные ионные жидкости. В [20] для извлечения сульфонамидов из образцов крови применяли две ИЖ ( $C_6MImPF_6$ ,  $C_4MImBF_4$ ) с реализацией гомогенной бессолевой экстракции с последующей ИЖ/ИЖ микроэкстракцией. Применялись ИЖ и в дисперсионной жидкостно-жидкостной экстракции [21-25].

Данное исследование посвящено разработке дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции стероидных гормонов из образцов мочи с применением в качестве экстрагента гидрофобной ионной жидкости.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Оборудование.** Определение стероидных гормонов в образцах мочи выполняли на системе капиллярного электрофореза «Капель-105М», оснащенной спектрофотометрическим детектором, с использованием кварцевого капилляра (50/60 см, внутренний диаметр 50 мкм). Серию экспериментов по оценке степеней извлечения стероидных гормонов из водной фазы проводили на жидкостном хроматографе «LC-30 Nexera» фирмы «Shimadzu», колонка Luna C18 (2) (3.0·150 мм, 3 мкм) с соответствующей предколонкой.

**Реактивы.** В работе использовались: соляная кислота («ос.ч.»), гидроксид натрия («ч.д.а.»), хлорид натрия («ч.д.а.»), дигидрофосфат натрия двухводный («ч.ч.»), борная кислота («реахим», «ос.ч.»), додецилсульфат натрия (более 98 %, «Sigma-Aldrich»), мочевины (более 98 %, «Sigma-Aldrich»), (1-гексил-3-метилимидазолий бис(трифторметил)сульфонимид ( $C_6MImNTf_2$ , «Solvent Innovation»), 1-гексил-3-метилимидазолий тетрафторборат ( $C_6MImBF_4$ , Abcr), 3-метил-1-октилимидазолий тетрафторборат ( $C_8MImBF_4$ , Merck), ацетон (более 99.8 %, «Merck»), ацетонитрил («криохром», сорт 0), метанол (gradient HPLC grade, J.T. Baker), кортизол (F), кортизон (E), кортикостерон (B), 11-дезоксикортизол (S),  $\beta$ -циклодекстрин («Fluka»), (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрин («Sigma-Aldrich»).

**Приготовление модельных растворов.** Модельные растворы эндогенных стероидных гормонов (кортизол, кортизон, кортикостерон, 11-дезоксикортизол) с концентрацией 1 мг/мл готовили растворением точных навесок по 1 мг каждого из анализов в 1 мл смеси ацетонитрил : вода = 1 : 3 объемн. во фторопластовых пробирках.

Рабочие и градуировочные растворы готовили разбавлением модельных в необходимое количество раз дистиллированной водой с помощью автоматического дозатора. Полученные модельные растворы хранили в морозильной камере при тем-

пературе  $-20^\circ\text{C}$ , а рабочие и градуировочные – в холодильнике при  $+4-6^\circ\text{C}$ .

**Условия разделения стероидных гормонов методом ОФ ВЭЖХ.** Подвижная фаза: А –  $H_2O$  (65 %), В –  $CH_3CN$  (35 %), изократический режим элюирования; диодно-матричный детектор. Температура колонки и детектора:  $30^\circ\text{C}$ . Скорость потока – 0.3 мл/мин, ввод пробы – 20 мкл, время анализа – 15 минут,  $\lambda = 240$  нм.

**Условия электрофоретического разделения стероидных гормонов в режиме мицеллярной электрокинетической хроматографии.** Фоновый электролит: 25 мМ раствор  $NaH_2PO_4$  (рН = 2.0, доведенный до требуемого значения 0.1 М раствором соляной кислоты); 25 мМ раствор ДДСН, 5 М раствор мочевины. Напряжение: -20 кВ. Температура термостатирования капилляра:  $20^\circ\text{C}$ . Время ввода пробы: 5 с, давление: 50 мбар.

**Жидкостно-жидкостная экстракция кортикостероидов в ионные жидкости  $C_6MImNTf_2$ ,  $C_6MImBF_4$ ,  $C_8MImBF_4$ .** В пробирки типа Эппендорф вносили 5 мкл тестовых растворов кортикостероидов, 980 мкл дистиллированной воды и тщательно перемешивали. Затем добавляли 100, 250, 500, 1000 мкл ионной жидкости и ставили на 1 час в шейкер при температуре  $30^\circ\text{C}$ . Отбирали водную фазу и анализировали методом ОФ ВЭЖХ.

Степени извлечения анализов оценивали по формуле (1):

$$\text{Степень извлечения} = 1 - \frac{C_e}{C_0}, \quad (1)$$

где  $C_e$  – концентрация аналита в водной фазе после экстракции (мкг/мл),  $C_0$  – начальная концентрация аналита (мкг/мл).

**Жидкостно-жидкостная экстракция кортикостероидов в ионную жидкость  $C_8MImBF_4$  с добавкой циклодекстринов в водную фазу.** В пробирки типа Эппендорф вносили 5 мкл стандартных растворов кортикостероидов, добавляли 100, 200, 400, 800 мкл 10 мМ раствора  $\beta$ -циклодекстрина или его производного (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрина, доводили объем до 1 мл дистиллированной водой, тщательно перемешивали. Вносили в виалу 100 мкл ионной жидкости и ставили на 1 час в шейкер при температуре  $30^\circ\text{C}$ . Отбирали водную фазу и анализировали методом ОФ ВЭЖХ. Степени извлечения анализов оценивали по формуле (1).

**Обратная экстракция кортикостероидов из ионной жидкости  $C_8MImBF_4$  в водную фазу с добавкой циклодекстринов.** В пробирки типа Эппендорф вносили 5 мкл тестовых растворов кортикостероидов, 980 мкл дистиллированной воды и тщательно перемешивали. Затем добавляли 1000 мкл ионной жидкости и ставили на 1 час в шейкер при температуре  $30^\circ\text{C}$ . Затем водную фазу отделяли от органической путем декантации.

В стеклянные виалы вносили 250, 500, 750, 1000 мкл 10 мМ раствора  $\beta$ -циклодекстрина или его гидроксипропилпроизводного, доводили объем до 1 мл дистиллированной водой, тщательно переме-

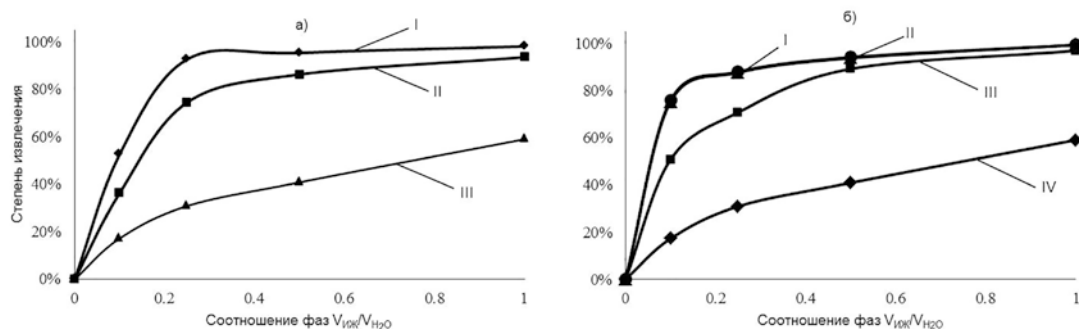


Рис. 2. (а) Зависимость степеней извлечения кортизола (F) в ионные жидкости от соотношения фаз ИЖ : водный раствор. I –  $C_8MlmBF_4$ , II –  $C_6MlmBF_4$ , III –  $C_6MlmNTf_2$ ; (б) Зависимость степеней извлечения стероидных гормонов от соотношения  $C_8MlmBF_4$  : водная фаза. I – 11-дезоксикортизол (S), II – кортикостерон (B), III – кортизон (E), IV – кортизол (F)

Fig. 2. (a) The dependence of cortisol extraction degree in different ionic liquids on the phase ratio IL : aqueous solution. I –  $C_8MlmBF_4$ , II –  $C_6MlmBF_4$ , III –  $C_6MlmNTf_2$ ; (б) The dependence of steroid hormones extraction degree on the phase ratio  $C_8MlmBF_4$  : aqueous solution. I – 11-deoxycortisol (S), II – corticosterone (B), III – cortisone (E), IV – cortisol (F)

шивали. Полученные таким образом растворы вносили в виалу, содержащую органическую фазу, и ставили на 1 час в шейкер при температуре 30 °С. Отбирали водную фазу и анализировали методом ОФ ВЭЖХ. Степени извлечения аналитов оценивали по формуле (1).

**Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция стероидных гормонов с участием ионной жидкости  $C_8MlmBF_4$ .** В мерные пробирки вместимостью 10 мл вносили 5 мкл рабочих растворов (100 мкг/мл) кортикостероидов и доводили дистиллированной водой объем до 5 мл. К пробе шприцем прибавляли 1 мл органического растворителя (метанол, ацетонитрил, ацетон), содержащего 100 мкл ионной жидкости  $C_8MlmBF_4$ . Содержимое пробирки встряхивали 1 минуту и выдерживали 10 минут в ультразвуковой ванне. Разделение дисперсной системы проводили центрифугированием в течение 15 минут при 4000 об/мин. Оценку степеней извлечения проводили по формуле (1) с учетом разбавления. Для оценки влияния объема диспергатора на степени извлечения стероидных гормонов к пробе шприцем прибавляли 100, 250, 500, 1000, 1500 мкл ацетона, содержащего 100 мкл  $C_8MlmBF_4$ . Для оценки влияния объема  $C_8MlmBF_4$  на степень извлечения кортикостероидов к пробе шприцем прибавляли 500 мкл ацетона, содержащего 50, 100, 150, 200, 250 мкл  $C_8MlmBF_4$ . Затем содержимое пробирки подвергали процедурам, описанным выше.

**Пробоподготовка образцов мочи для электрофоретического определения стероидных гормонов.** В мерные пробирки вместимостью 10 мл вносили 5 мл мочи, затем прибавляли 0.5 мл ацетона, содержащего 150 мкл ионной жидкости  $C_8MlmBF_4$ . Содержимое пробирки встряхивали 1 минуту и выдерживали 10 минут в ультразвуковой ванне. Разделение дисперсной системы проводили центрифугированием в течение 15 минут при 4000 об/мин. Затем 50 мкл нижней фазы переносили в пробирки типа Эппендорф и добавляли 50 мкл MeOH.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использование ИЖ в процессах экстракции облегчает процедуру пробоподготовки биологических жидкостей и сокращает время анализа при определении соединений различной полярности. На первом этапе исследования необходимо было выбрать среди имидазольевых ионных жидкостей экстрагент для проведения дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции. С этой целью проведена серия предварительных экспериментов по жидкостно-жидкостной экстракции стероидных гормонов из водной фазы в ионные жидкости состава  $C_6MlmNTf_2$ ,  $C_6MlmBF_4$ ,  $C_8MlmBF_4$ .

Максимальные степени извлечения стероидных гормонов (гидрофобных аналитов) достигались при использовании в качестве экстрагента наиболее гидрофобной ИЖ –  $C_8MlmBF_4$  (рис. 2а). Для кортикостерона (B) и 11-дезоксикортизона (S) наблюдается практически количественная экстракция при соотношении органической и водной фазы = 1 : 10 (объемн.) (рис. 2б). Установлено, что степень извлечения стероидных гормонов практически не зависит от pH среды.

Исследованы экстракционные процессы, включающие комплексообразование стероидных гормонов с макроциклами, имеющими гидрофобную полость ( $\beta$ -циклодекстрин и его гидроксипроизводное). Отмечено снижение степеней извлечения этих аналитов: поверхность образующегося комплекса более гидрофильна по сравнению с полостью макроцикла, и степени извлечения в ионные жидкости снижаются (рис. 3).

Резкое снижение степени извлечения кортизола (F) при увеличении концентрации макроцикла в водной фазе объясняется предпочтительностью процесса включения аналита в полость  $\beta$ -циклодекстрина по сравнению с переходом в фазу ионной жидкости.

**Реэкстракция стероидных гормонов из ИЖ.** Исследована возможность обратного извле-

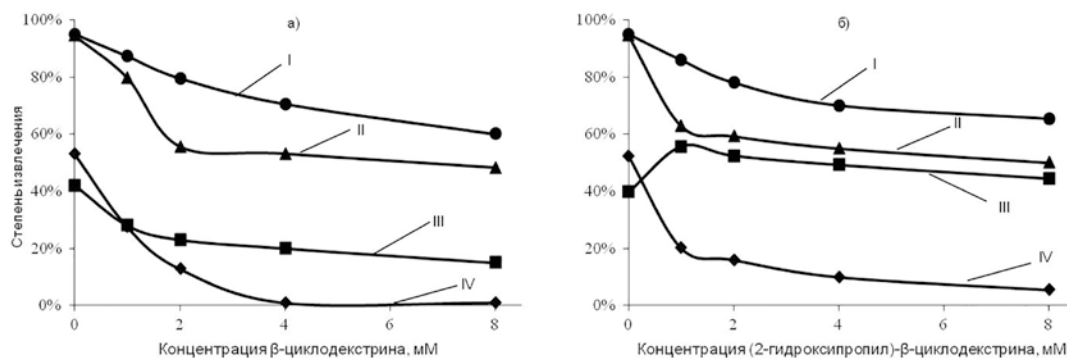


Рис. 3. Зависимость степеней извлечения стероидных гормонов в  $C_8MlmBF_4$  от концентрации макроцикла в водной фазе. Соотношение  $C_8MlmBF_4$  : водная фаза = 1:10 (объемн.): в случае (а)  $\beta$ -циклодекстрина; (б) (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрина. I – 11-дезоксикортизол (S), II – кортикостерон (B), III – кортизон (E), IV – кортизол (F)

Fig. 3. The dependence of steroid hormones extraction degree in  $C_8MlmBF_4$  on the concentration of macrocycles. Phase ratio  $C_8MlmBF_4$  : aqueous solution is 1:10 (v/v): (a)  $\beta$ -cyclodextrine, (б) (2-hydroxypropyl) $\beta$ -cyclodextrine. I – 11-desoxycortisol (S), II – corticosterone (B), III – cortisone (E), IV – cortisol (F)

чения стероидных гормонов из ионных жидкостей. Обычно для извлечения этих аналитов из водной фазы в условиях жидкостно-жидкостной экстракции используют дихлорметан или хлороформ. Однако эти растворители хорошо смешиваются с гидрофобными ионными жидкостями. Использование *n*-гептана в качестве экстрагента для обратной экстракции также не привело к удовлетворительным результатам: степень извлечения не превысила 2 % для всех аналитов.

Выполнена серия экспериментов по выявлению влияния процессов комплексообразования на эффективность обратной экстракции кортикостероидов. С этой целью в водную фазу вводили макроциклы ( $\beta$ -циклодекстрин и его гидроксипроизводное) в различных концентрациях (2.5-10 мМ). Значения степеней извлечения не превысили 9 %.

**Дисперсионная жидкостно-жидкостная экстракция стероидных гормонов.** Принимая во внимание выявленные закономерности экстракции стероидных гормонов в гидрофобные ионные жидкости, в качестве экстрагента был выбран 3-метил-1-октилимидазолий тетрафторборат ( $C_8MlmBF_4$ ). Отработка процедуры микроэкстракции заключалась в варьировании природы диспергатора (мета-

Таблица 1

Степени извлечения (%) стероидных гормонов в ионную жидкость  $C_8MlmBF_4$  в процессе дисперсионной микроэкстракции с использованием различных диспергаторов ( $n = 3, p = 0.95$ )

Table 1

Extraction degree (%) of steroid hormones in ionic liquid  $C_8MlmBF_4$  under the dispersive liquid-liquid microextraction with the use of different dispersants ( $n = 3, p = 0.95$ )

Аналит	Метанол	Ацетонитрил	Ацетон
Кортизол (F)	33 ± 3	50 ± 5	57 ± 6
Кортизон (E)	38 ± 4	44 ± 5	58 ± 6
Кортикостерон (B)	51 ± 6	62 ± 7	82 ± 7
11-Дезоксикортизол (S)	51 ± 6	65 ± 6	84 ± 8

нол, ацетонитрил, ацетон), его объема и объема экстрагента. Большие степени извлечения стероидных гормонов из водной фазы достигались при использовании в качестве диспергатора ацетона (табл. 1).

При варьировании объема диспергатора в диапазоне 0.1-1.5 мл при постоянном объеме ИЖ (100 мкл) наибольшие значения степеней извлечения достигались при использовании 0.5 мл ацетона (рис. 4а). Рост степеней извлечения стероидных

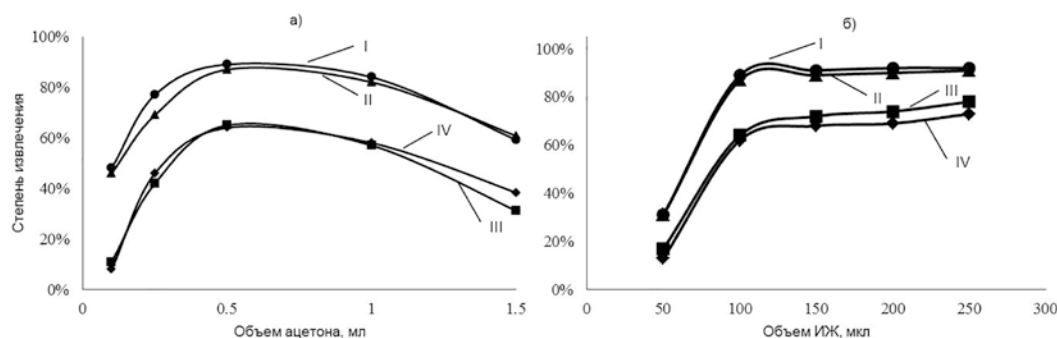


Рис. 4. Зависимость степеней извлечения стероидных гормонов от объема ацетона (а) и ионной жидкости  $C_8MlmBF_4$  (б). I – 11-дезоксикортизол (S), II – кортикостерон (B), III – кортизон (E), IV – кортизол (F)

Fig. 4. The dependence of steroid hormones extraction degree on acetone (a) and ionic liquid  $C_8MlmBF_4$  (б) volume. I – 11-desoxycortisol (S), II – corticosterone (B), III – cortisone (E), IV – cortisol (F)

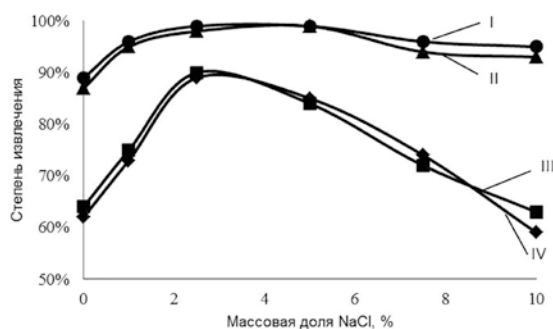


Рис. 5. Зависимость степеней извлечения стероидных гормонов от массовой доли NaCl в водной фазе. I – 11-дезоксикортизол (S), II – кортикостерон (B), III – кортизон (E), IV – кортизол (F)

Fig. 5. The dependence of steroid hormones extraction degree on mass fraction of NaCl in aqueous solution. I – 11-desoxycortisol (S), II – corticosterone (B), III – cortisone (E), IV – cortisol (F)

гормонов на начальном этапе объясняется повышением эффективности «распыления» экстрагента. Однако при увеличении концентрации ацетона в водной фазе выше 20 % (объемн.), наблюдается частичное растворение ИЖ, что приводит к снижению степеней извлечения.

При увеличении объема ИЖ степени извлечения стероидов возрастают (рис. 4б), что согласуется и с результатами жидкостно-жидкостной экстракции. Поэтому микроэкстракцию проводили с использованием 150 мкл  $C_8MImBF_4$ , растворенной в 0.5 мл ацетона.

При анализе реальных биологических образцов необходимо было учесть следующее: моча представляет собой 5 %-ный раствор солей в воде, поэтому важно было оценить влияние ионной силы раствора на степень извлечения стероидных гормонов. Для этого к анализируемой пробе добавляли 0-10 % (масс.) NaCl (рис. 5).

Степени извлечения аналитов увеличивались при повышении концентрации соли от 0 до 2.5 %, а затем снижались. При высоком содержании соли, скорее всего, имеет место ионный обмен между анионами  $BF_4^-$  в ионной жидкости  $C_8MImBF_4$  и анионами  $Cl^-$  в водном растворе. В результате образуется растворимый в воде  $C_8MImCl$ , что и при-

водит к снижению степеней извлечения стероидных гормонов.

Установленные закономерности дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции стероидных гормонов из водной фазы апробированы при определении этих аналитов в образцах мочи. Методом стандартной добавки найдены степени извлечения стероидных гормонов из образцов мочи в процессе дисперсионной микроэкстракции (табл. 2).

Полученные степени извлечения кортикостероидов из образцов мочи оказались выше, чем в случае модельных систем, что обусловлено наличием солевых компонентов в биологической жидкости. Достигнутые пределы количественного определения составили 8-12 нг/мл.

## Заключение

Установлены закономерности извлечения стероидных гормонов в гидрофобные ионные жидкости ряда  $C_6MImNTf_2$ ,  $C_6MImBF_4$ ,  $C_8MImBF_4$ . Показано, что на процессы экстракции влияют природа ионной жидкости, соотношение водной и органической фаз, возможные процессы комплексобразования.

Предложен способ электрофоретического определения кортикостероидов в образцах мочи с использованием на стадии пробоподготовки дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции в ИЖ  $C_8MImBF_4$ . Степени извлечения аналитов в данном варианте составили 69-93 %, а пределы количественного определения снижены до 8-12 нг/мл.

## Благодарности

Данное исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-03-00791-а и № 17-03-01282 с использованием оборудования Ресурсного образовательного центра по направлению «Химия» Санкт-Петербургского государственного университета.

## Acknowledgements

The study was supported by RFFI grant № 16-03-00791-a and № 17-03-01282 with the use of the equipment of Educational Resource Center of SPSU Scientific Park.

Таблица 2

Степени извлечения стероидных гормонов из образцов мочи в процессе дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции в  $C_8MImBF_4$  ( $n = 3$ ,  $p = 0.95$ )

Table 2

Extraction degree of steroid hormones from the urine sample under the dispersive liquid-liquid microextraction in  $C_8MImBF_4$  ( $n = 3$ ,  $p = 0.95$ )

Аналит	Содержание в моче, нг/мл	Добавка, нг/мл	Найдено, нг/мл	Извлечение, %	LOQ, нг/мл
Кортизол (F)	99 ± 6	100	168 ± 9	69 ± 7	12 ± 3
Кортизон (E)	18 ± 4	100	87 ± 8	74 ± 7	11 ± 3
Кортикостерон (B)	-	100	92 ± 5	92 ± 5	8 ± 2
11-Дезоксикортизол (S)	-	100	93 ± 4	93 ± 4	8 ± 2

## Литература

- Paleologos E.K., Giokas D.L., Karayannis .I. Micelle-mediated separation and cloud-point extraction // *Trends Anal. Chem.* 2005. V. 24, № 5. P. 426-436.
- Ultrasonically modified amended – cloud point extraction for simultaneous preconcentration of neonicotinoid insecticide residues / R. Kachangoon [et al.] // *Molecules.* 2018. V. 23, № 5. 1165. P. 1-16.
- Chanbasha L.X., Hian B., Lee K. Developments in single-drop microextraction // *J. Chromatogr. A.* 2007. V. 1152, № 1-2. P. 184-192.
- Headspace single drop microextraction with in drop derivatization followed by reversed phase HPLC analysis to determine residual acetaldehyde in polyethylene terephthalate / V.S. Mahesh [et al.] // *Sep. Sci. plus.* 2018. V. 1, № 4. P. 237-243.
- Ten years of dispersive liquid–liquid microextraction and derived techniques / N. Campillo [et al.] // *Applied Spectroscopy Reviews.* 2017. V. 52. P. 267-415.
- Yıldırım S., Çolak N.U., Yaşar A. Application of dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of donepezil in urine by HPLC using a core–shell column // *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 2018. V. 41, № 2. P. 66-72.
- Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction / M. Rezaee [et al.] // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1116, № 1-2. P. 1–9.
- Sensitive determination of cholesterol and its metabolic steroid hormones by UHPLC-MS/MS via derivatization coupled with dual ultrasonic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction / X.E. Zhao [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2016. V. 30. P. 147-154.
- Surfactant-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction determination of corticosteroids followed by HPLC-DAD / H. Qin [et al.] // *Anal. Lett.* 2013. V. 46, № 4. P. 589–604.
- Imidazolium ionic liquids as dynamic and covalent modifiers of electrophoretic systems for determination of catecholamines / E. Kolobova [et al.] // *Talanta.* 2018. V. 188. P. 183–191.
- Shashkov M.V., Sidelnikov V.N. Properties of column with several pyridinium and imidazolium ionic liquid stationary phase // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1309. P. 56-63.
- Kartsova L.A., Bessonova E.A., Kolobova E.A. Ionic Liquids as Modifiers of Chromatographic and Electrophoretic Systems // *J. Anal. Chem.* 2016. V. 71, № 2. P. 147-158.
- Synthesis of ionic liquid-bonded organic silica hybrid monolithic column for capillary electrochromatography / H. Han [et al.] // *J. Sep. Sci.* 2011. V. 34. P. 2323-2328.
- On-line концентрирование биогенных аминов методом капиллярного электрофореза с использованием синтезированных ковалентных покрытий на основе ионных жидкостей / Е.А. Колобова [и др.] // *Аналитика и контроль.* 2017. Т. 21, № 1. С. 57-64.
- Ruiz-Palomero C., Soriano M.L., Valcarcel M. Ternary composites of nanocellulose, carbonanotubes and ionic liquids as new extractants for direct immersion single drop microextraction // *Talanta.* 2014. V. 125. P. 72-77.
- Dynamic ultrasonic nebulisation extraction coupled with headspace ionic liquid-based single-drop microextraction for the analysis of the essential oil in forsythia suspensa / J. Yang [et al.] // *Phytochem. Anal.* 2014. V. 25, № 2. P. 178-184.
- Direct ionic liquid extractant injection for volatile chemical analysis – a gas chromatography sampling technique / S.U. Mokhtar [et al.] // *Green Chem.* 2015. V. 17. P. 573-581.
- Homogeneous liquid–liquid microextraction via flotation assistance for rapid and efficient determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples / M.H. Hosseini [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* 2013. V. 762. P. 54-60.
- Xiao Y., Zhang H. Homogeneous ionic liquid microextraction of the active constituents from fruits of *Schisandra chinensis* and *Schisandra sphenanthera* // *Anal. Chim. Acta.* 2012. V. 712. P. 78-84.
- Salting-out homogenous extraction followed by ionic liquid/ ionic liquid liquid–liquid micro-extraction for determination of sulfonamides in blood by high performance liquid chromatography / Zh. Liu [et al.] // *Talanta.* 2016. V. 161. P. 748-754.
- Ionic liquids dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatographic determination of irbesartan and valsartan in human urine / Z. Li [et al.] // *Biomed. Chromatogr.* 2013. V. 27. P. 254-258.
- Ionic liquid-based microwave-assisted surfactant-improved dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization of aminoglycosides in milk samples / X. Xu [et al.] // *J. Sep. Sci.* 2013. V. 36. P. 585-592.
- Dispersive liquid–liquid microextraction of silver nanoparticles in water using ionic liquid 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate / S. Chen [et al.] // *J. Environ. Sci.* 2016. V. 41 P. 211-217.
- Ionic Liquid-Based Ultrasonic-Assisted Extraction Combined with HPLC–MS/MS for the Determination of Seven Mercapturic Acids in Human Urine / G. Li [et al.] // *Chromatographia.* 2015. V. 78 P. 641-648.
- Application of ionic liquid-based dispersive liquid phase microextraction for highly sensitive simultaneous determination of three endocrine disrupting compounds in food packaging / Wang L. [et al.] // *Food Chem.* 2016. V. 197 P. 754-760.
- Development and validation of a fast ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction procedure combined with LC–MS/MS analysis for the quantification of benzodiazepines and benzodiazepine-like hypnotics in whole blood / M. De Boeck [et al.] // *Forensic Sci. Int.* 2017. V. 274. P. 44-54.

## References

- Paleologos E.K., Giokas D.L., Karayannis I. Micelle-mediated separation and cloud-point extraction. *Trends Anal. Chem.*, 2005, vol. 24, no. 5, pp. 426-436. DOI:10.1016/j.trac.2005.01.013.
- Kachangoon R., Vichapong J., Burakham R., Santaladchaiyakit Y., Srijaranai S. Ultrasonically modified amended – cloud point extraction for simultaneous preconcentration of neonicotinoid insecticide residues. *Molecules*, 2018, vol. 23, no. 5, 1165, pp. 1-16. DOI:10.3390/molecules23051165.
- Chanbasha L.X., Hian B., Lee K. Developments in single-drop microextraction. *J. Chromatogr. A*, 2007, vol. 1152, no. 1-2, pp. 184-192. DOI:10.1016/j.chroma.2006.10.073.
- Mahesh V.S., Narayana R., Kumar A., Mohana Ch. Headspace single drop microextraction with in drop derivatization followed by reversed phase HPLC analysis to determine residual acetaldehyde in polyethylene terephthalate. *Sep. Sci. plus*, 2018, vol. 1, no. 4, pp. 237-243. DOI:10.1002/sscp.201800001.
- Campillo N., Viñas P., Šandrejová J., Andruch V. Ten years of dispersive liquid–liquid microextraction and derived techniques. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2017, vol. 52, pp. 267-415. DOI:10.1080/05704928.2016.1224240.
- Yıldırım S., Çolak N.U., Yaşar A. Application of dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of donepezil in urine by HPLC using a core–shell column. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, 2018, vol. 41, no. 2, pp. 66-72. DOI:10.1080/10826076.2017.1373669.
- M. Rezaee, Y. Assadi, M.R.M. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in

- water using dispersive liquid-liquid microextraction]. *J. Chromatogr. A*, 2006, vol. 1116, no. 1-2, pp. 1–9. DOI:10.1016/j.chroma.2006.03.007.
8. Zhao X.E., Yan P., Wang R., Zhu S., Zhu Sh., Liu H. Sensitive determination of cholesterol and its metabolic steroid hormones by UHPLC-MS/MS via derivatization coupled with dual ultrasonic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2016, vol. 30, pp.147-154. DOI 10.1002/rcm.7634.
  9. Qin H., Yu S., Hu X., Yang Y. Surfactant-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction determination of corticosteroids followed by HPLC-DAD. *Anal. Lett.*, 2013, vol. 46, no. 4, pp. 589–604. DOI 10.1080/00032719.2012.729241.
  10. Kolobova E., Kartsova L., Kravchenko A., Bessonova E. Imidazolium ionic liquids as dynamic and covalent modifiers of electrophoretic systems for determination of catecholamines. *Talanta*, 2018, vol. 188, pp. 183–191.
  11. Shashkov M.V., Sidelnikov V.N. Properties of column with several pyridinium and imidazolium ionic liquid stationary phase. *J. Chromatogr. A*, 2013, vol. 1309, pp. 56-63. DOI:10.1016/j.chroma.2013.08.030.
  12. Kartsova L.A., Bessonova E.A., Kolobova E.A. Ionic Liquids as Modifiers of Chromatographic and Electrophoretic Systems. *Journal of Analytical Chemistry*, 2016, vol. 71, no. 2, pp. 147-158. DOI:10.1134/S1061934816020064.
  13. Han H., Li J., Wang X., Liu X., Jiang S. Synthesis of ionic liquid-bonded organic silica hybrid monolithic column for capillary electrochromatography. *Journal of Separation Science*, 2011, vol. 34, pp. 2323-2328. DOI 10.1002/jssc.201100050.
  14. Kolobova E.A., Kartsova L.A., Bessonova E.A., Kravchenko A.V. [On-line concentration of biogenic amines by capillary electrophoresis with usage of synthesized covalent coatings based on ionic liquids]. *Analitika i kontrol'* [Analytcs and Control], 2017, vol. 21, no. 1, pp. 57-64 (in Russian). DOI: 10.15826/analitika.2017.21.1.006.
  15. Ruiz-Palomero C., Soriano M.L., Valcarcel M. Ternary composites of nanocellulose, carbonanotubes and ionic liquids as new extractants for direct immersion single drop microextraction. *Talanta*, 2014, vol. 125, pp. 72-77. DOI:10.1016/j.talanta.2014.02.055.
  16. Yang J., Wei H., Teng X., Zhang H., Shi Y. Dynamic ultrasonic nebulisation extraction coupled with headspace ionic liquid-based single-drop microextraction for the analysis of the essential oil in forsythia suspensa. *Phytochem. Anal.*, 2014, vol. 25, pp. 178-184. DOI:10.1002/pca.2490.
  17. Mokhtar S.U., Chin S., Vijayaraghavan R., Macfarlane D.R., Drummer O.H., Marriott P.J. Direct ionic liquid extractant injection for volatile chemical analysis – a gas chromatography sampling technique. *Green Chem.*, 2015, vol. 17, pp. 573-581. DOI:10.1039/C4GC01364F.
  18. Hosseini M.H., Rezaee M., Akbarian S., Mizani F., Pourjavid M.R., Arabieh M. Homogeneous liquid-liquid microextraction via flotation assistance for rapid and efficient determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Anal. Chim. Acta*, 2013, vol. 762, pp. 54-60. DOI:10.1016/j.aca.2012.10.030.
  19. Xiao Y., Zhang H. Homogeneous ionic liquid microextraction of the active constituents from fruits of *Schisandra chinensis* and *Schisandra sphenanthera*. *Anal. Chim. Acta*, 2012, vol. 712, pp. 78-84. DOI:10.1016/j.aca.2011.11.033.
  20. Liu Zh., Yu W., Zhan H., Gu F., Jin X. Salting-out homogenous extraction followed by ionic liquid/ionic liquid liquid-liquid micro-extraction for determination of sulfonamides in blood by high performance liquid chromatography. *Talanta*, 2016, vol. 161, pp. 748-754. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.09.006.
  21. Li Z., Chen F., Wang X., Wang C. Ionic liquids dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatographic determination of irbesartan and valsartan in human urine. *Biomed. Chromatogr.*, 2013, vol. 27, pp. 254-258. DOI:10.1002/bmc.2784.
  22. Xu X., Liu Z., Zhao X., Su R., Zhang Y., Shi J., Zhao Y., Wu L., Ma Q., Zhou X., Zhang H., Wang Z. Ionic liquid-based microwave-assisted surfactant-improved dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization of aminoglycosides in milk samples. *J. Sep. Sci.*, 2013, vol. 36, is. 3, pp. 585-592. DOI:10.1002/jssc.201200801.
  23. Chen S., Sun Y., Chao J., Cheng L., Chen Y., Liu J. Dispersive liquid-liquid microextraction of silver nanoparticles in water using ionic liquid 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate. *J. Environ. Sci.*, 2016, vol. 41, pp. 211-217. DOI:10.1016/j.jes.2015.04.015.
  24. Li G., Wang L., Fei T., Liu H., Wu D., Zheng S. Ionic Liquid-Based Ultrasonic-Assisted Extraction Combined with HPLC-MS/MS for the Determination of Seven Mercapturic Acids in Human Urine. *Chromatographia*, 2015, vol. 78, pp. 641-648. DOI:10.1007/s10337-015-2878-y.
  25. Wang L., Zhang D., Xu X., Zhang L. Application of ionic liquid-based dispersive liquid phase microextraction for highly sensitive simultaneous determination of three endocrine disrupting compounds in food packaging. *Food Chem.*, 2016, vol. 197, pp. 754-760. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.11.042.
  26. De Boeck M., Missotten S., Dehaem W., Tytgan J., Cuyper E. Development and validation of a fast ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction procedure combined with LC-MS/MS analysis for the quantification of benzodiazepines and benzodiazepine-like hypnotics in whole blood. *Forensic Sci. Int.*, 2017, vol. 274, pp. 44-54. DOI:10.1016/j.forsciint.2016.12.026.