



УДК 543.545.2

Факторы, влияющие на разделение полифенолов, стероидных гормонов и витаминов в режиме микроэмульсионной электрокинетической хроматографии

Карцова Л.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Ганжа О.В., Хмельницкий И.К.

ООО ЦКП «Аналитическая Спектрометрия», Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 11.01.2009 г

Аннотация

Установлены факторы, влияющие на образование и стабильность микроэмульсионной системы: природа «масла», поверхностно-активного вещества и спирта, стабилизирующего микроэмульсию. Изучено влияние рН буферного электролита (рН 2,0 и 9,2), добавок (мочевина, ацетонитрил и β -циклодекстрин) в микроэмульсионную систему и температуры на эффективность и селективность разделения водо- и жирорастворимых витаминов, стероидных гормонов и полифенольных антиоксидантов зеленого чая. Проведена сравнительная оценка эффективности при разделении водо- и жирорастворимых витаминов методами мицеллярной (МЭКХ) и микроэмульсионной электрокинетической хроматографии (МЭЭКХ).

Ключевые слова: Микроэмульсионная электрокинетическая хроматография, катехины, полифенолы, стероидные гормоны, водорастворимые витамины, жирорастворимые витамины, МЭЭКХ с обращенной полярностью, β -циклодекстрин, сульфо- β -циклодекстрин, витамины В1, В2, В3, В6, С, А, Е, D3.

Factors influencing to formation and stability of microemulsion system: nature of oil, surface-active substance and alcohol stabilizing of microemulsion were determined. Influencing of buffer electrolyte pH (2,0 and 9,2), additives (urea, acetonitrile, β -cyclodextrine) to microemulsion system and temperature to efficiency and selectivity of separation of, steroid hormones and polyphenolic antioxidants of green tea was studied. Comparative assessment of efficiency water and fat-soluble vitamins by methods of micellar and microemulsion electrokinetic chromatography was carried out.

Key words: Microemulsion electrokinetic chromatography, catechins, polyphenols, steroid hormones, water-soluble vitamins, fat-soluble vitamins, MEEKC in suppressed electroosmotic flow environment, β -cyclodextrin, sulfo- β -cyclodextrin vitamins B1, B2, B3, B6, C, A, E, D3

Введение

Микроэмульсионная электрокинетическая хроматография (МЭЭКХ) – электромиграционный высокоэффективный метод разделения многокомпонентной

смеси ионогенных и нейтральных соединений [1] (рис.1). Впервые МЭЭКХ была предложена в качестве метода разделения в 1991 г. Х. Ватараи [2]. Принцип разделения в микроэмульсионной электрокинетической хроматографии (МЭЭКХ) подобен разделению в мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ), которое осуществляется за счет распределения аналитов в гидрофобной отрицательно заряженной капле микроэмульсии или взаимодействия с ней [3].

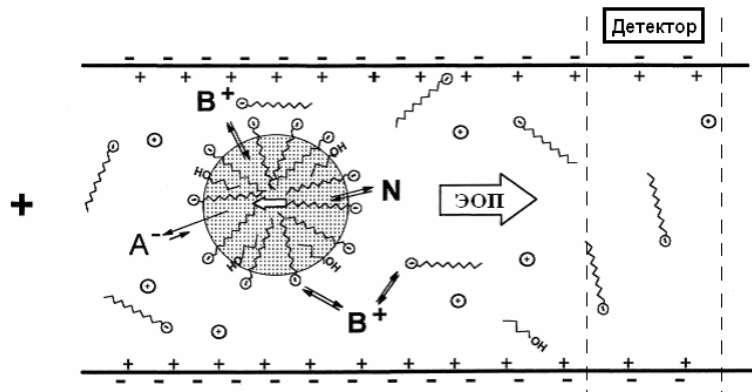


Рис.1. Механизм разделения в МЭЭКХ [4]
N – нейтральные аналиты, A⁻ - анионные компоненты, B⁺ - катионные компоненты

Сложность состава микроэмульсии и механизма микроэмульсионного разделения дают возможность манипулировать большим количеством параметров при разработке данного метода: типом и концентрацией поверхностно-активного вещества (ПАВ), pH буферной системы и типом «масла», а также природой вспомогательного стабилизатора (спирта), характером комплексообразующих и ион-парных агентов, а также самим процессом получения микроэмульсии [5].

Для выяснения возможностей малоизученного метода МЭЭКХ были выбраны катехины – основные компоненты зеленого чая, стероидные гормоны – маркеры эндокринных патологий; водо- и жирорастворимые витамины (табл.1).

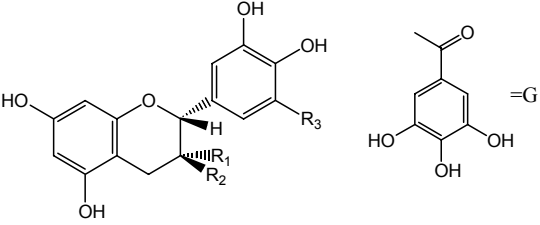
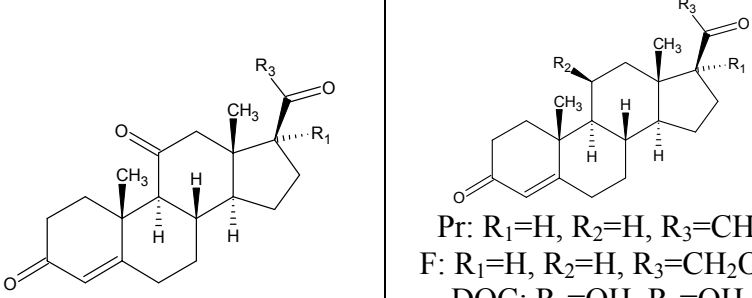
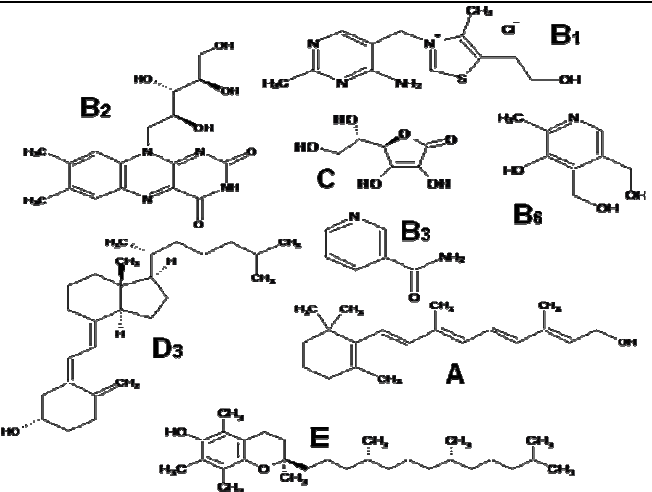
Эксперимент

Аппаратура. Выполнение электрофоретического разделения проводилось на системах капиллярного электрофореза КАПЕЛЬ 103Р и 105Р (НПФ «Люмекс») со спектрофотометрическим детектором, снабженными кварцевыми капиллярами с внешним полиимидным покрытием, внутренним диаметром 50 мкм и эффективной длиной 50 – 55 см (общая длина – 60 – 65 см).

Реагенты. Ацетат натрия (х.ч., Реахим), лимонная кислота моногидрат (GR for analysis, Merck), тетраборат натрия 10-водный Na₂B₂O₄·10H₂O (х.ч.), соляная кислота, конц. (х.ч.), гидроксид натрия NaOH (х.ч.), дистиллированная вода, мочеви́на (х.ч.), ацетонитрил (о.с.ч., Криохром), β-циклодекстрин (Sigma), циклогексанол, бутанол-1, гептан, гептанол-1, додецилсульфат натрия (ч.д.а., Реахим), холат натрия (Acros Organics); (-)-эпикатехин, (-)-эпикатехин галлат, (-)-эпигаллокатехин, (-)-галлокатехин галлат и (-)-эпигаллокатехин галлат производства Fluka и Sigma; кортизон, гидрокортизол, прогестерон, 11-дегидрокортикостерон, 11-дезоксикортикостерон и 17α-гидроксипрогестерон производства Sigma; тиамин, пиридоксин, рибофлавин, флави́нмононуклеотид (витамин B₂), никотинамид

(витамин B₃), никотиновая кислота (витамин B₃), аскорбиновая кислота, ретинол, α-токоферол, холекальциферол (витамин D₃) производства Sigma.

Таблица 1. Структурные формулы определяемых соединений

Катехины	
<p>R₁=R₂: H, OH, OG R₃: H, OH Эпикатехин (ЭК) Эпикатехин галлат (ЭКГ) Эпигаллокатехин (ЭГК) Эпигаллокатехин галлат (ЭГКГ) Галлокатехин галлат (ГКГ)</p>	 <p>ЭК: R₁=OH, R₂=H ЭКГ: R₁=OG, R₂=H ЭГК: R₁=OH, R₂=OH ЭГКГ: R₁=OG, R₂=OH ГКГ: R₁=OG, R₂=OH</p>
Стероидные гормоны	
<p>Прогестерон (Pr) Кортизон (E) Кортизол (F) 11-дегидрокорти- костерон (A) 11- дезоксикортикостерон (DOC) 17α- гидроксипрогестерон (17-OH-Pr)</p>	 <p>Pr: R₁=H, R₂=H, R₃=CH₃ F: R₁=H, R₂=H, R₃=CH₂OH DOC: R₁=OH, R₂=OH, R₃=CH₂OH 17-OH-Pr: R₁=OH, R₂=H, R₃=CH₃</p>
Витамины	
<p>Тиамин хлорид (B₁) Рибофлавин (B₂) Никотинамид (B₃) Пиридоксин (B₆) Аскорбиновая кислота (C) Ретинол (A) α-токоферол (E) Холекальциферол (D₃)</p>	

Результаты и их обсуждение

Поскольку метод микроэмульсионной электрокинетической хроматографии в основном рекомендуется для соединений гидрофобной природы, для изучения его

возможностей были выбраны соединения, существенно отличающиеся по гидрофобности (табл.2).

Таблица 2. Значения критериев гидрофобности стероидных гормонов, полифенолов и витаминов

Стероидные гормоны	Н*	Полифенолы	Н*	Витамины	Н*
Е	12,06	ЭГК	4,42	В ₆	0,0
А	13,00	ЭК	5,20	В ₁	2,2
DOC	14,07	ЭГКГ	9,35	А	16,0
17-ОН0Pr	14,07	ГКГ	9,35	Е	23,0
Pr	15,34	ЭКГ	10,00	Д ₃	25,3

* Критерий гидрофобности рассчитывался по формуле $N=nH-4\sqrt{nf}$, где nH – число атомов углерода и галогенов в молекуле, nf – число функциональных групп

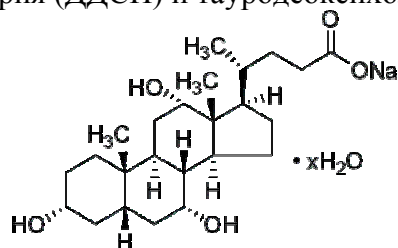
На примере стероидных гормонов изучены аналитические характеристики микроэмульсионной системы (эффективность (N), коэффициент разрешения (Rs) и время анализа (t)) с использованием буферных растворов с pH=2 (ацетат натрия или ацетат аммония и лимонная кислота) и pH=9,2 (тетраборат натрия) (табл. 3). Электрофоретический анализ, проводимый в условиях низких значений pH (< 2,5), требует обращение полярности (т.е. входной конец капилляра катодный), поскольку электроосмотический поток в этих условиях отсутствует, а движущей силой являются отрицательно заряженные капли микроэмульсии подобно мицеллам в мицеллярной электрокинетической хроматографии с обращенной полярностью [6,7].

Таблица 3. Сравнение коэффициентов разрешения (Rs) и эффективности (N) в кислой (pH 2,0) и щелочной (pH 9,2) микроэмульсионной системе (n=3, P=0,95)

Разделяемые соединения	Rs		Стероидные гормоны	N·10 ³ , т.т./м	
	МЭ pH 2,0	МЭ pH 9,2		МЭ pH 2,0	МЭ pH 9,2
17-ОН-Pr/DOC	2,04±0,05	0,84±0,03	Pr	1858±74	763±31
A/F	8,3±0,3	7,3±0,3	DOC	1990±79	1160±24
F/E	9,5±0,4	7,6±0,2	F	1860±75	1310±52
			E	1700±69	1685±67

Эффективность (N) и факторы разрешения (Rs) для стероидных гормонов в режиме МЭЭКХ с нормальной (положительной) полярностью и в присутствии электроосмотического потока заметно снижаются, а общее время анализа увеличивается (при pH рабочего буфера 2,0 оно составило 23 мин, а при pH 9,2 – 40 мин).

По имеющимся в литературе данным известно, что для анализа стероидных гормонов в режиме МЭЭКХ в основном в качестве ПАВ используется додецилсульфат натрия (ДДСН) и тауродеокохлат натрия [8,9].



Гидрат холата натрия

Структура холата натрия близка структуре определяемых стероидных гормонов, поэтому нами проведен ряд экспериментов с его использованием в режиме микроэмульсионной электрокинетической хроматографии с нормальной полярностью и буферными системами со значением рН 8 – 10. Из рис.2 видно, что применение холата натрия как компонента, образующего микроэмульсию вопреки сделанному предположению, не способствует повышению селективности и разделению стероидных гормонов.

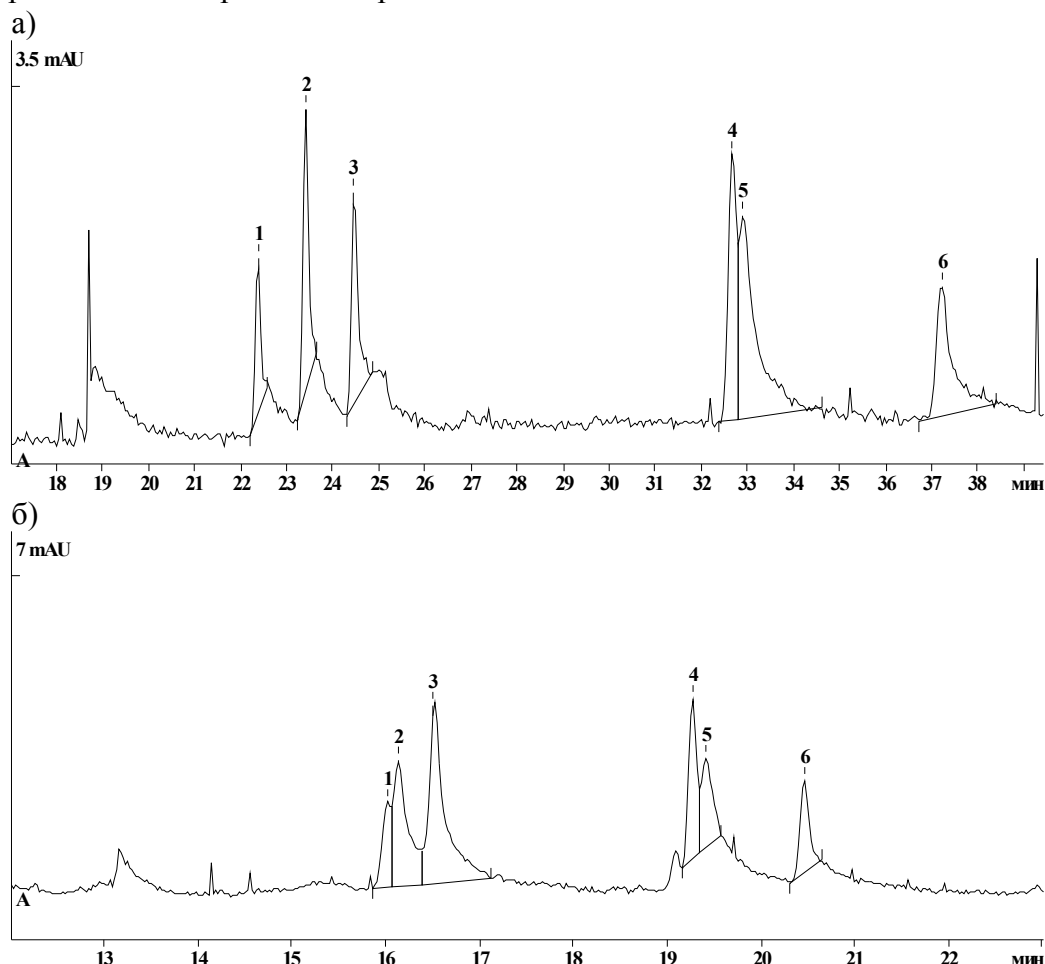


Рис. 2. Электрофореграммы модельной смеси стероидных гормонов в режиме МЭЭКХ с использованием а) ДДСН и б) холата натрия в качестве компонента, образующего микроэмульсию

КАПЕЛЬ103Р; Условия: см. рис. IV.20; напряжение +20 кВ. Микроэмульсия: а) 1,36 % гептана, 3,0 % ДДСН, 9,72 % бутанола-1, 8 % ацетонитрила, 78 % 5 мМ раствора тетрабората натрия, рН 9,2; б) 0,66 % гептан, 4,87 % холат натрия, 6,55 % бутанол-1, 87,93 % 5 мМ раствора тетрабората натрия, рН 9,2. Проба: смесь стероидов разбавлена 5 мМ раствором тетрабората натрия рН 9,2 и содержит 8 % ацетонитрила; 1 – кортизол, 2 – кортизон, 3 – 11-дегидрокортикостерон, 4 – 11-дезоксикортикостерон, 5– 17-гидроксипрогестерон, 6– прогестерон.

Отмечено, что одновременное использование додецилсульфата и холата натрия в качестве системы, образующей микроэмульсию, в кислой среде (рН 2.0), невозможно, поскольку холат натрия образует творожистый осадок, не способствуя стабилизации микроэмульсии.

Природа органического растворителя («масла»), оказывает существенное влияние на эффективность и селективность микроэмульсионной системы [10]. Показано, что микроэмульсия (МЭ), образованная более гидрофобным растворителем (гептан), обладает большей селективностью разделения и эффективностью, чем с гептанолом-1 (табл. 4).

Использование смешанных систем (ДДСН/холат натрия, ДДСН/мочевина, ДДСН/ β -циклодекстрин) не привело к повышению селективности разделения стероидных гормонов и снизило эффективность при увеличении общего времени анализа.

Таким образом, для анализа соединений, нерастворимых в воде, методом МЭЭКХ предпочтительнее использование более гидрофобных растворителей, что обеспечивает лучшее сродство аналитов к разделяющей системе и ускоряет массообмен гидрофобных компонентов пробы между *псевдостационарной* и водной фазами.

Таблица 4. Эффективность микроэмульсионной системы с различной природой «масла» (n=3, P=0,95)

Аналит	N·10 ³ , т.т./м	
	МЭ с гептаном	МЭ с гептанолом-1
Pr	2896±83	1838±49
A	3581±110	1918±63
E	1964±70	1900±59
F	3958±117	2206±55

Селективность разделения стероидных гормонов 17-гидроксипрогестерона и 11-дезоксикортикостерона варьировалась введением органического растворителя (ацетонитрила, 4 – 15 % (объемн/объемн)), комплексообразующих агентов (β -циклодекстрина и сульфоб- β -циклодекстрина (4 – 8 мМ)) и мочевины (2 – 6 М). Отмечено, что использование циклодекстринов в этих условиях незначительно повышает селективность разделения, что в ряде случаев сопровождается снижением эффективности (рис.3).

Показано, что добавка ацетонитрила значительно влияет на селективность разделения (рис.3), но при больших концентрациях (16 %) существенно возрастает время анализа (для 11-дезоксикортикостерон с 18,4 мин до 24,7мин).

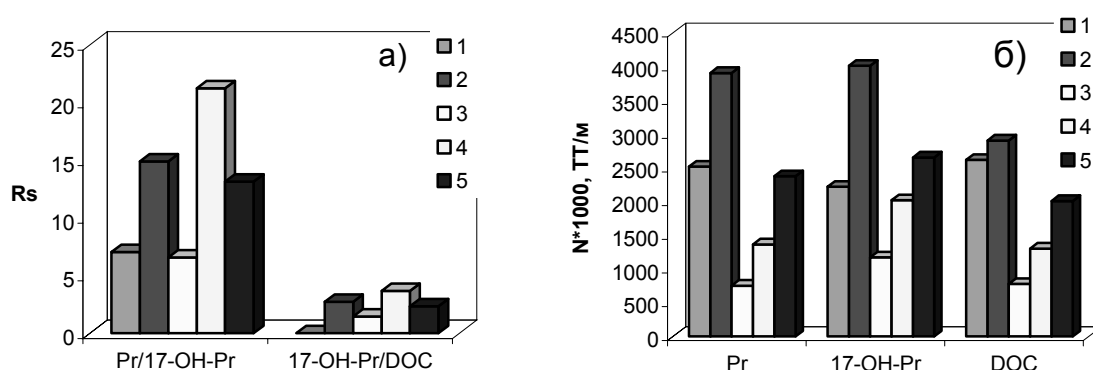


Рис. 3. Влияние различных добавок в микроэмульсионную систему на коэффициенты разрешения (а) и эффективность (б) при разделении стероидных гормонов

1 – МЭ без добавок (1,36 % (масс/объемн) гептана, 3,0 % (масс/объемн) ДДСН, 9,72 %

(масс/объемн) бутанола-1, 86 % (объемн/объемн) рабочего буфера, содержащего ацетат аммония (10 мМ) и лимонную кислоту (50 мМ), рН 2.0); 2 – ацетонитрил (8 %); 3 – 2 М мочевины; 4 – ацетонитрил (16 %); 5 – ацетонитрил (8 %) и β -циклодекстрина (8 мМ)

В специальных экспериментах на примере полифенольных антиоксидантов зеленого чая нами изучено влияние температуры на их электрофоретическое разделение методом МЭЭКХ (рис.4). Изменение температуры оказывает влияние на растворимость аналитов в микроэмульсии. Показано, что с повышением температуры (от 20 до 35°C) электрофоретические подвижности аналитов и общее время анализа уменьшаются (рис.4, а). Это не согласуется с имеющимися публикациями [5, 10] об отсутствии влияния температуры на обсуждаемые процессы. Оптимальной по данным эксперимента оказалось значение температуры 25 °С. При дальнейшем ее увеличении растет сила тока (рис.4, б).

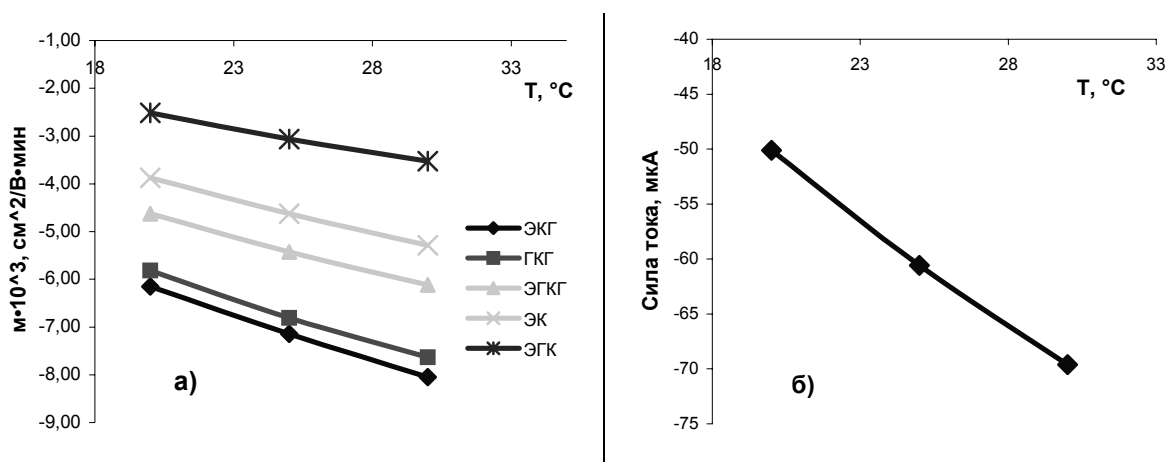


Рис.4. Влияние температуры на электрофоретические подвижности полифенольных соединений (а) и силу тока (б);

Состав МЭ: 1,36 % (масс/объемн) гептан, 3,5 % (масс/объемн) додецилсульфат натрия; 9,72 % (масс/объемн) бутанол-1, 85,5 % (объемн/объемн) 10 мМ буферного раствора, содержащего ацетат натрия и лимонную кислоту, рН 2,0.

Имеются сообщения о перспективности использования метода микроэмульсионной электрокинетической хроматографии (МЭЭКХ) для определения витаминов [11-14].

Нами для разделения водорастворимых витаминов (группы В и С) использовалась эмульсия состава: 1,36 % - гептан, 3,0 % - ДДСН, 9,72 % - бутанол, 86 % - 5 мМ тетраборат, рН 9,2), для жирорастворимых (А, D₃, Е) в качестве буферного электролита был взят раствор 10 мМ фосфата натрия (рН 2.0). Эффективность для водорастворимых витаминов оказалась сопоставимой с МЭКХ, а в случае жирорастворимых – значительно выше, чем в МЭКХ (табл.5).

Таблица 5. Эффективность (N, т.т.м.) разделения водо- и жирорастворимых витаминов в режимах МЭКХ и МЭЭКХ (т.т./м) (n=3, P=0.95, ΔK_{CA} =5 %)

Метод	N · 10 ³ (т.т./м)				
	Водорастворимые витамины				
	В ₃ амид	В ₆	В ₂	С	В ₁
МЭКХ ¹	28,8	138,0	180,0	71,7	187,0
МЭЭКХ	80,0	72,2	401,0	96,8	128,0

	Жирорастворимые витамины		
	D3	E	A
МЭКХ ²	10,9	8,7	11,6
МЭЭКХ	21,3	77,3	24,5

¹Рабочий электролит: 30 мМ тетраборат натрия, рН 9,18, 80 мМ ДДСН

²Рабочий электролит: 70 % - ацетонитрил, 30 % - фосфат 10 мМ, рН 2.0 с 80 мМ ДДСН.

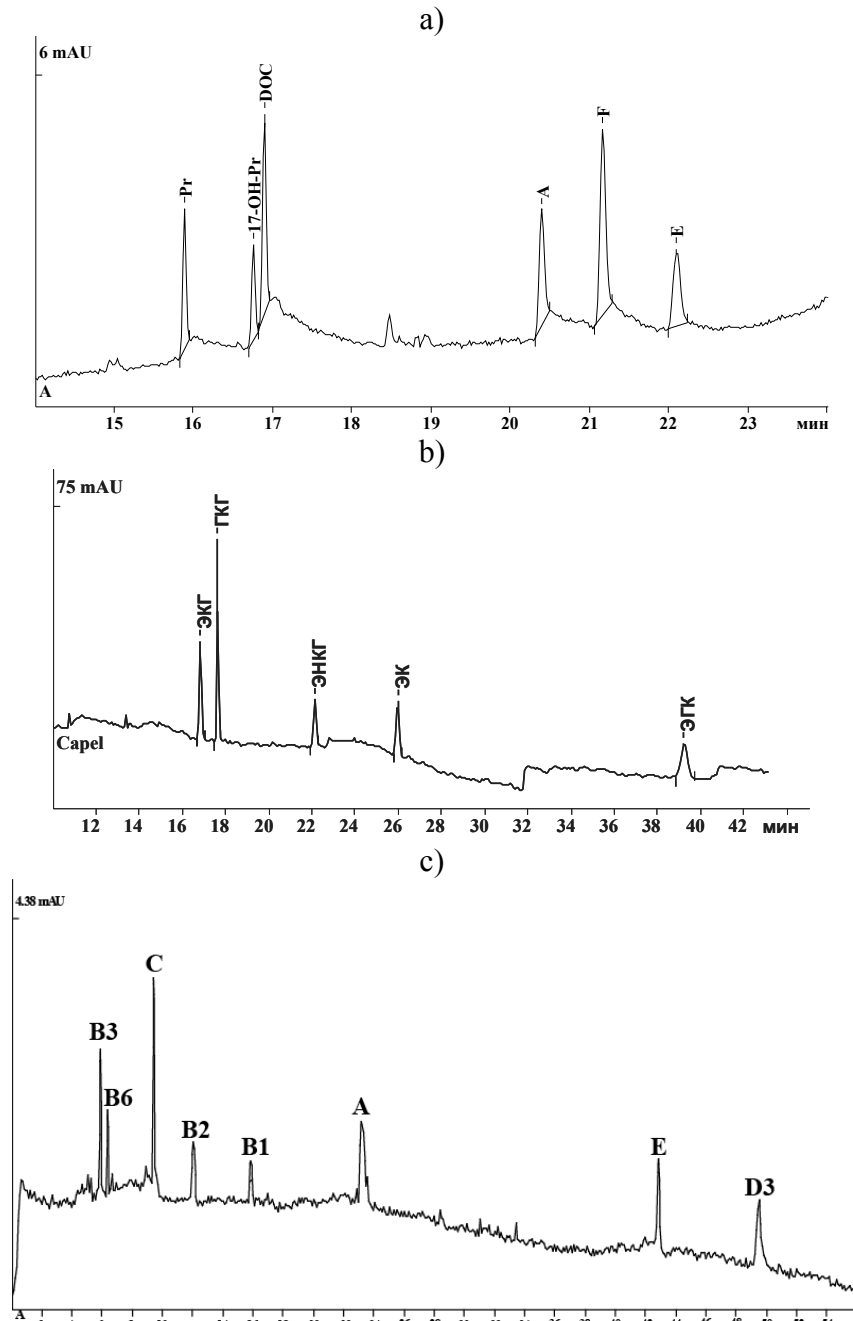


Рис. 5. Электрофореграммы модельных смесей стероидных гормонов (А), полифенольных антиоксидантов (В) и водо- и жирорастворимых витаминов (С) в режиме МЭЭКХ

А, В: КАПЕЛЬ 103Р, $L_{\text{общ}}=65$ см, $L_{\text{эфф}}=55$ см, $d_{\text{внутр}}=50$ мкм, $\lambda=254$ нм; напряжение -20 кВ

Нами были выяснены возможности совместного электрофоретического определения водо- и жирорастворимых витаминов. Сильное различие химических структур затрудняет одновременное определение этих соединений в одной элюирующей системе. Для разделения водо- и жирорастворимых витаминов использовали те же условия что и для водорастворимых (положительная полярность, рН 9,18). Время анализа составило почти 1 ч (рис. 5).

На рис. 5 приведены электрофореграммы стероидных гормонов, полифенольных антиоксидантов зеленого чая и водо- и жирорастворимых витаминов, полученные в условиях микроэмульсионной электрокинетической хроматографии.

Заключение

Таким образом:

- Выявлено влияние природы ПАВ, «масла» и различных добавок в микроэмульсионную систему на эффективность и селективность разделения гидрофобных аналитов.

- Показано, что для гидрофобных соединений предпочтителен вариант микроэмульсионной электрокинетической хроматографии с обращенной полярностью (рН 2,0), в условиях которой аналиты элюируются в порядке снижения гидрофобности.

- Установлено, что увеличение температуры уменьшает общее время анализа, что, однако, сопровождается повышением силы тока.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 07-03-01001-а «Совершенствование методов концентрирования в капиллярном электрофорезе».

Список литературы

1. Watarai H., Ogawa K., Abe M., Monta T., Takahashi I. Capillary electrophoresis with o/w microemulsions water/SDS/1-butanol/heptane // *Analyt. Science*, 1991, V. 7, P. 245-248.
2. March A., Clark B., Broderick M., Power J., Donegan S., Altria K. Recent advances in microemulsion electrokinetic chromatography // *Electrophoresis*. 2004. V.25. P. 3970-3980.
3. Klampfl Ch. W. Solvent effects in microemulsion electrokinetic chromatography // *Electrophoresis* 2003, V. 24, P. 1537-1543.
4. Hancen S.H., Gabel-Jensen C., El-Sherbiny D.T.M., Pedersen-Bjergaard S. Microemulsion electrokinetic chromatography – or solvent modified micellar electrokinetic chromatography // *Trends in Anal. Chem.* – 2001. – V.20. – P. 614-619.
5. Atrai K. D. Background theory and applications of microemulsion electrokinetic chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2000. – V.892. – P.171-186.
6. Gotti R., Fiori J., Mancini F., Carvini V. Modifier micellar electrokinetic chromatography in the analysis of catechins and xanthines in chocolate // *Electrophoresis*. – 2004. – V.25. – P. 3282-3291.
7. Janini G. M., Muschik G.M., Issaq H.J. Micellar electrokinetic chromatography in zero-electroosmotic flow environment // *J. Chromatogr. B.* – 1996. – V.683. – P.29-35.

8. Vomastova L., Mikšik I., Deyl Z. Microemulsion and micellar electrokinetic chromatography of steroids // J. Chromatogr. B. 1996. V. 681. P. 107-113.
9. Pomponio R., Gotti R., Fiori J., Carvini V. Microemulsion electrokinetic chromatography of corticosteroids. Effect of surfactants and cyclodextrins on the separation // J. Chromatogr. A. 2005. V. 1081. P. 24-30.
10. Altria K. D., Mahuzier P.-E., Clark B.J. Background and operating parameters of microemulsion electrokinetic chromatography // Electrophoresis. – 2003. – V.24. – P. 315-324.
11. Pedersen-Bjergaard S., Naess O., Moestue S., Rasmussen K.E. Microemulsion electrokinetic chromatography in suppressed electroosmotic flow environment: Separation of fat-soluble vitamins // J. Chromatogr. A. 2000. – V. 876. – I. 1–2. – P. 201–211.
12. Boso R.L., Bellini M. S., Miksik I., Deyl Z. Microemulsion electrokinetic chromatography with different organic modifiers: separation of water- and lipid-soluble vitamins // J. Chromatogr. A. – 1995. – V. 709. – I. 1. – P. 11–19.
13. Altria K.D. Application of microemulsion electrokinetic chromatography to the analysis of a wide range of pharmaceuticals and excipients // J. Chromatogr. A. – 1999. – V. 844. – I. 1–2. – P. 371–386.
14. Delgado-Zamarreno M., Gonzalez-Maza I., Sanchez-Perez A., Carabias-Martinez R. Separation and simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble vitamins by electrokinetic capillary chromatography // J. Chromatogr. A. – 2002. – V. 953. – I. 1–2. – P. 257–262.

Карцова Людмила Алексеевна - д.х.н.
профессор кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного университета, тел. (812) 428-40-44

Хмельницкий Иван Константинович -
аспирант кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного университета, тел. (812) 428-40-44

Ганжа Олеся Владимировна, инженер, ООО ЦКП «Аналитическая Спектрометрия»

Kartsova Ludmila A. - Dr.Sc.Chem. the professor of organic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, e-mail: kartsova@gmail.com

Khmelnitsky Ivan K. - the post-graduate student of organic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, e-mail: khmelniyskiy@gmail.com

Ganzha Olesja V. - the engineer, CSU Analytical Spectrometry, e-mail: nessy10@yahoo.com