

УДК 543.544

ТЕТРАГИДРОФУРАН – УНИВЕРСАЛЬНЫЙ РАСТВОРИТЕЛЬ ДЛЯ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© 2003 г. О.Б. Рудаков, М.И. Соколов, В.Ф. Селеменев *, Л.В. Рудакова**

Воронежская государственная технологическая академия,

** Воронежский государственный университет,*

*** Воронежская государственная медицинская академия*

Рассмотрены хроматографические свойства тетрагидрофурана. Приведены примеры его использования в качестве подвижной фазы в эксклюзионной хроматографии и модификатора подвижных фаз в нормально- и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии экотоксикантов, природных соединений, фармацевтических препаратов, полимеров и химикатов. Даны выверенные практические рекомендации по технике работы с этим растворителем.

В жидкостной хроматографии для приготовления подвижных фаз применяют до 100 растворителей [1]. Лидирующее положение среди них занимает вода, ацетонитрил, метанол, изопропанол, ТГФ и гексан. Вода и гексан – полярный и неполярный разбавители, вода – в обращенно-фазовом (ОФХ), а гексан – в нормально-фазовом варианте хроматографии (НФХ). Эта работа посвящена хроматографическим возможностям тетрагидрофурана. ТГФ – малополярный растворитель, акцептор протонов. Он неограниченно смешивается как с водой, так и с гексаном, хорошо совместим с неполярными и умеренно полярными растворителями, прекрасно растворяет многие органические соединения и полимеры (полиэфиры, полиакрилаты, поливинилхлорид, сложные поливиниловые эфиры, эпоксидные смолы). Все это обуславливает возможность его применения в эксклюзионной хроматографии полимеров, в НФХ и ОФХ полифункциональных органических соединений в качестве подвижной фазы или модифицирующего подвижную фазу растворителя, а также в качестве растворителя анализируемой пробы.

Наряду с чисто транспортной функцией (перемещение концентрационной зоны сорбата по колонке) растворитель активно участвует в самом процессе разделения и оказывает существенное влияние на возможности детектирования. Часто незначительное изменение состава подвижной фазы дает возможность оптимизировать процесс, улучшить форму пиков, разрешение отдельных компонентов и даже изменить механизм разделения. Замена одного растворителя другим может изменить фактор удерживания в 10^3 - 10^5 раз. По-

этому при выборе растворителей необходимо учитывать весь комплекс их свойств, в той или иной степени влияющих на проведение хроматографического эксперимента (табл.1). До сих пор подбор оптимальных условий разделения разноплановых по химическому строению смесей органических соединений методами жидкостной хроматографии специалисты относят к области изящного искусства с элементами творческой интуиции. При этом их главным и обязательным инструментом является растворитель. Как говорил Герман Бургава в своем трактате «Начала химии» (1732): «Химики предпочитают всем другим средствам растворитель и горделиво утверждают, что при его содействии могут совершать все чудеса своего искусства». Данное утверждение справедливо как никакое другое в жидкостной хроматографии, так как подвижная фаза (ПФ) является компонентом хроматографической системы, который наиболее просто варьируется оператором при оптимизации разделения и детектирования.

Растворители, применяемые в ВЭЖХ, должны удовлетворять следующим основным запросам: чистота, химическая инертность, совместимость с детектором, достаточная растворяющая способность по отношению к анализируемым веществам, низкая вязкость, безопасность, доступность, смешиваемость с разбавителем и др. (табл.1). Рассмотрим свойства ТГФ в сравнении с разбавителями, в тандеме с которыми он входит в состав ПФ.

По многим свойствам ТГФ занимает промежуточные позиции между 2-мя противоположностями – водой и гексаном (табл. 2-4). По пожарной безопасности он близок к гексану, по токсичности он на порядок менее токсичен, чем основ-

Основные требования к растворителям для ВЭЖХ [1]

Параметр	Требования	Факторы
Температура кипения	Достаточно высокая	Для предотвращения образования паровых пузырей, мешающих работе клапанов и детекторов; изменения состава ПФ из-за испарения низкокипящего компонента
Плотность	Достаточно высокая	Более плотные ПФ требуют меньшей высоты напора над входом в насос, для них менее вероятен турбулентный тип потока
Вязкость	Минимальная	В низковязких ПФ эффективней диффузия, массообмен, меньше рабочее давление насоса
Поглощение в УФ области	Минимальное	Малая прозрачность ПФ ухудшает чувствительность спектрофотометрического детектора
Химическая стабильность	Максимальная	Чтобы не использовать стабилизаторы, для избежания дрейфа времен удерживания
Химическая инертность	Максимальная	Для предотвращения модификации сорбентов и сорбатов
Чистота	Отсутствие летучих и нелетучих примесей	Для предотвращения помех в работе детектора и колонок
Стоимость	Невысокая	Для снижения расходов на анализ
Совместимость с разбавителем	Максимальная	Для избежания расслоения ПФ и помех при детектировании
Растворимость сорбатов	Достаточно высокая	Для предотвращения помех в работе колонок и детектора
Элюирующая сила	Достаточно большая	Для сокращения времени анализа
Токсичность	Минимальная	Для безопасности работ
Воспламеняемость	Достаточно низкая	Для безопасности при хранении и использовании

ные модификаторы в ОФХ – метанол и ацетонитрил, или хлорсодержащие модификаторы НФХ (хлороформ, метилхлорид и др.). По элюирующей силе на силикагеле ТГФ занимает средние позиции, он близок к диоксану и этилацетату, уступает спиртам. В ОФХ он обладает большей элюирующей способностью, чем ацетонитрил и метанол, для которых $\varepsilon^0(C_{18})$ равна 3.1 и 1.0 соответственно. По рейтингу, проведенному методом обобщенного критерия по 8 критериям (важнейшим хроматографическим и технико-эксплуатационным свойствам) [1-4], ТГФ занимает 3-5 место среди модификаторов нормально-фазовых ПФ и 3 место “ среди модификаторов для ОФХ. Это лучший растворитель для эксклюзионной хроматографии многих полимеров.

Наряду с очевидными достоинствами, для ТГФ присущи некоторые неприятные с точки зрения ВЭЖХ свойства. Во-первых, он весьма реакционноспособен, легко образует с кислородом воздуха пероксиды и более высоко окисленные соединения. Процесс разложения ускоряется, когда растворитель находится на свету, нагревается и имеет контакт с воздухом. Поэтому работать приходится только с очищенным и свежеперегнанным растворителем.

Для подавления образования пероксидов в ТГФ добавляют незначительные количества 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола (ионола), гидрохинона и других антиоксидантов. Ионол используется почти исключительно как ингибитор. Нормальный уровень 250 промилей добавки ионола в

Таблица 2.

Физические свойства растворителей [1]

Растворители	$T_{\text{кип}},$ °C	ρ при 25 °C, г/см ³	n_D^{25}	$z \cdot 10^3,$ (Па·с) при 25 °C,	Предел УФ, нм	Растворимость (%) при 20 °C	
						в воде	воды
Вода	100	0.9971	1.3325	0.894	190		
Гексан	68.7	0.6548	1.3723	0.299	195	0.014	0.01
ТГФ	66.0	0.8842	1.4036	0.460	212	∞	∞

Таблица 3.

Технико-эксплуатационные свойства растворителей [1]

Растворители	Стоимость*, у.е./л	ПДК, мг/м ³	T вспышки, °C	T самовос- пламе- нения, °C	Концентрационные пределы воспламенения, об. %	
					нижний	верхний
Вода	19.20		нет	нет	нет	нет
Гексан	33.90	300	-21.6	261	1.1	7.5
ТГФ	51.10	100	-20	250	1.8	11.8

* – стоимость растворителя марки «для ВЭЖХ»

Таблица 4.

Критерии полярности растворителей: диэлектрическая проницаемость ϵ_r , дипольный момент μ , растворимость Гильдебранда δ_T , сольватохромный параметр $E_T(30)$, критерий полярности Снайтера P' , элюирующая сила на силикагеле $\epsilon^o(\text{SiO}_2)$ и на октадецилированном силикагеле $\epsilon^o(\text{C}_{18})$ [1]

Растворители	ϵ_r	μ, D	$\delta_T,$ МПа ^{1/2}	$E_T(30),$ кДж/моль	P'	$\epsilon^o(\text{SiO}_2)$	$\epsilon^o(\text{C}_{18})$
Вода	78.54	1.83	52.20	264.0	10.2	1.50	0
Гексан	1.88	0.08	15.84	129.7	0.1	0.01	-
ТГФ	7.39	1.75	20.21	156.5	4.0	0.44	3.7

ТГФ мало влияет на работу УФ-детектора, еще меньше его влияние на работу рефрактометрического детектора и детектора светового рассеяния.

Пероксиды формируются в ТГФ даже в присутствии ингибитора. Уровень концентрации пероксидов зависит от условий хранения и времени между изготовлением и использованием. Чтобы затормозить процесс окисления, производители упаковывают растворитель под азотом. Азот вытесняет из тары с ТГФ кислород, что повышает сохранность растворителя. Однако, как только бутылка открыта, и кислород вторично попадает в растворитель, снова начинается быстрое образование пероксидов.

Образование пероксидов следует особенно тщательно избегать при использовании только одного ТГФ в качестве элюента, например, в случае эксклюзионной хроматографии. Если он входит в бинарную или многокомпонентную ПФ, скорость образования пероксидов падает и уровень их концентраций в готовом элюенте, как правило, становится небольшим.

Таким образом, чтобы предотвратить взаимодействие пероксидов с аналитом, сорбентом, понизить уровень шумов в детекторе, чтобы гарантировать стабильные, воспроизводимые хроматографические результаты, требуется удалять пероксиды из ТГФ. С другой стороны это необходимо с точки зрения техники безопасности, так как большое содержание пероксидов может привести к взрывоопасной ситуации.

Перед перегонкой ТГФ проверяют на наличие пероксидов. К 1 мл растворителя прибавляют 1 мл 10%-ного раствора KI или NaI в ледяной уксусной кислоте. При низкой концентрации пероксидов раствор окрашивается в желтый цвет, а при высокой – в коричневый. Другой способ проверки: пробу ТГФ (2-3 мл) встряхивают в пробирке с таким же объемом 2%-го раствора KI, предварительно подкисленного несколькими каплями разбавленной соляной кислоты. Появление бурого окрашивания эфирного слоя указывает на присутствие пероксидов. Или же к 20 мл эфира приливают 5 мл смеси, состоящей из равных объе-

мов 50%-го раствора KI и 1%-го спиртового раствора фенолфталеина. В данном случае появление красной окраски указывает на присутствие пероксидов.

При заметном содержании пероксидов, во избежание взрыва при перегонке, их удаляют кипячением с 0.5% суспензией Cu_2Cl_2 в течение 30 мин. ТГФ после удаления пероксидов хранят над твердым КОН (10-15 об. %) в плотно закрытой бутылке из темного стекла в атмосфере инертного газа и перегоняют непосредственно перед применением. Перегонку можно проводить, как показала многолетняя практика, над КОН. Для этого в колбу для перегонки добавляют 8-10 г гранулированной щелочи из расчета на 0.5-1 л. Перегнанный ТГФ можно хранить в комнатных условиях в непрозрачной таре до 5 суток, при 0 °С – до 20 суток. Если ТГФ заправлен антиоксидантом, сроки хранения увеличиваются вдвое. Эти периоды установлены авторами по появлению качественной реакции на пероксиды. Чистота полученного растворителя вполне достаточна для проведения эксклюзионной хроматографии на полужестких полистирольных гелях при детектировании рефрактометром. Содержание воды в перегнанном над КОН растворителе составляет 0.05-0.06%. В других вариантах, особенно при работе с УФ-детектором, может потребоваться дополнительная адсорбционная очистка. В частности, обработка ТГФ в течение 36 ч цеолитами NaX и CoX позволяет удалить до 90-99% пероксидов. ТГФ после удаления пероксидов можно перегонять над литийалюминийгидридом или гидридом кальция. Такой метод позволяет получить очень сухой растворитель, необходимый для работы в режиме адсорбционной НФХ.

Предел прозрачности ТГФ высшей степени очистки составляет 212 нм, более доступен ТГФ с пределом прозрачности 230 нм [1]. Это хуже,

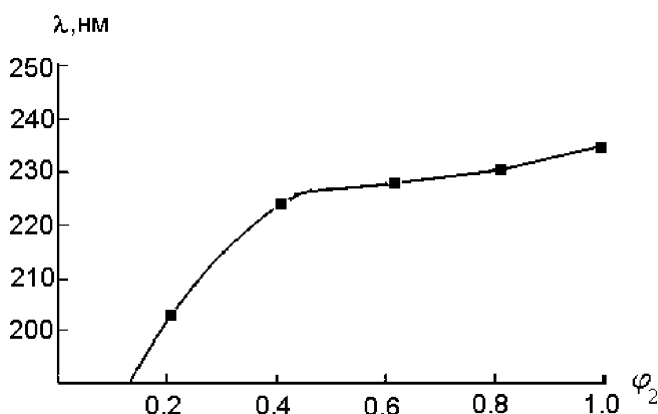


Рис. 1. Зависимость предела прозрачности в УФ-свете смеси ТГФ – вода от объемной доли ТГФ

чем прозрачность разбавителей. Однако, если используют ТГФ как малообъемную добавку (менее 10%), он позволяет проводить детектирование при длинах волн менее 210 нм. На рис.1 представлена зависимость предела прозрачности смеси ТГФ марки х.ч. с водой от состава бинарной ПФ [1]. Напомним, что пределом прозрачности считается оптическая плотность, равная 1 при длине оптического пути 10 мм, полученная относительно воды, помещенной в кювету сравнения. Как видно из рис.1, предел прозрачности изменяется от состава нелинейно, что можно объяснить сольватохромными эффектами [1].

Показатель преломления смесей с ТГФ также является неаддитивной величиной. В табл. 5 приведены данные работы [5] для системы ТГФ – вода. Показатель преломления весьма чувствителен к температуре. В табл. 6 приведены его изме-

Таблица 5.
Экспериментальные значения n для ПФ вода – ТГФ при 20 °С [5]

φ_2	n
0.0000	1.3330
0.0996	1.3410
0.2077	1.3500
0.3527	1.3598
0.4093	1.3670
0.5206	1.3778
0.6124	1.3848
0.7128	1.3908
0.8130	1.3970
0.9026	1.4018
1.0000	1.4060

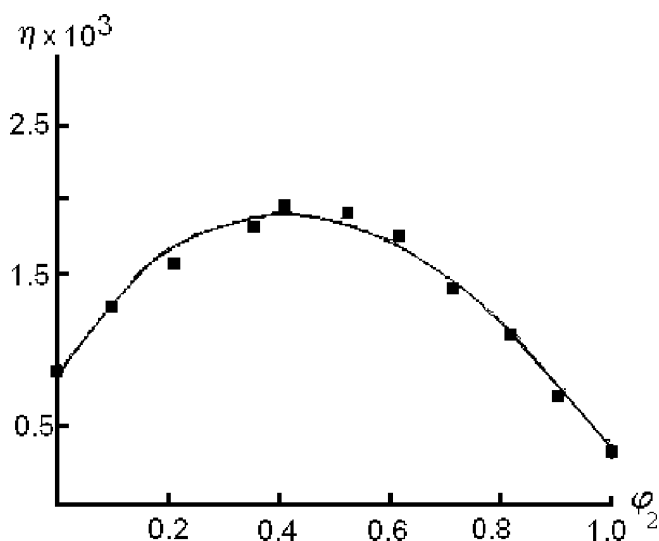


Рис. 2. Зависимость вязкости для бинарной смеси ТГФ – вода от объемной доли ТГФ

нения в зависимости от состава и температуры в диапазоне, характерном для эксклюзионной и обращено-фазовой ВЭЖХ [6]. Эти данные следует учитывать при оптимизации методик ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием.

Проблема вязкости – еще один недостаток ТГФ. Сам ТГФ имеет низкую вязкость, но она существенно возрастает при добавлении воды (рис. 2). Когда готовят его смеси с водой для обращенно-фазового разделения, их вязкость может возрасти в 2 раза [7]. Поэтому, при использовании градиентного режима, в котором объемная доля ТГФ в воде становится $> 30\%$, необходимо проверить, чтобы возникающее из-за повышения вязкости противодавление не превышало допустимый для используемого насоса предел. Особенно это важно контролировать при использовании шприцевых насосов среднего давления, установленных на приборах серии «Милихром».

Применение ТГФ в разделении анализитов с низкой полярностью и умеренной полярностью (ретинолы, стероидные соединения, и т.д.) показало, что он обеспечивает превосходную селективность для малополярных веществ с открытыми (пространственно доступными) группами –ОН [8].

ТГФ очень эффективно используется как небольшая модифицирующая добавка в подвижные фазы как в режиме НФХ, так и в ОФХ при анализе смесей таких типичных анализитов, как производные бензола и сопутствующие им примеси. Уникальная селективность при его применении в ОФХ связана со способностью молекул ТГФ быть акцепторами водородных связей анализита. В НФХ этот тип взаимодействия ТГФ еще более важен, оно проявляется не только с анализитом, но и с силанольными группами силикагеля.

Так, при использовании подвижной фазы вода – метанол (70:30) разделение ванилина и сиреневого альдегида на колонке C_8 не удается достигнуть. Анализиты элюируются фактически одним пиком. Замена 10% об. метанола на 10% ТГФ (70:20:10 вода – метанол – этанол) приводит к хорошему разделению и уменьшению общего времени удерживания на 50% . Применение градиента тернарного состава вода – метанол – ТГФ позволяет уверенно разделить семь производных коричневой кислоты [8].

Оказалось, что конкурентные межмолекулярные взаимодействия ТГФ с сорбентом и сорбатами типа фенолов, спиртов, кетонов и нитросоединений приводят к неожиданному, но очевидному уменьшению элюирующей силы обращенной подвижной фазы. Причины однозначно не

установлены. Важно то, что этот эффект, наблюдаемый не только для ТГФ, но и для других эфиров, стабильно воспроизводится, когда применяют ПФ с его добавкой [5].

Взаимодействия ТГФ с поверхностью силикагеля приводят к экранированию поверхности за счет образования водородных связей. Только большая элюирующая сила ТГФ и в НФХ, и в ОФХ часто препятствуют его использованию в качестве главного компонента подвижной фазы. Однако способность взаимодействовать с поверхностью сорбента или с молекулами сорбата как акцептора водородной связи ведет к появлению уникальной и ценной селективности при приемлемых параметрах удерживания. Часто, добавление ТГФ к элюенту увеличивает разрешающую способность и приводит к уменьшению времени удерживания сорбатов. Так, 13 полиядерных ароматических углеводородов были успешно разделены за 20 мин при использовании градиента метанол – ТГФ (100/0-70/30) на обращенно-фазовой колонке, $\lambda=350$ нм [8]. Изучено хроматографическое поведение 26 производных хиназолина, бенз[а]кридина, акридина на колонке C_8 ($\lambda=254$ нм) в изократических подвижных фазах ТГФ – вода и метанол – вода. Установлено, что система метанол – вода дает лучшие корреляции между фактором удерживания k' и молекулярной массой, однако элюенты с ТГФ приводят к лучшей селективности между анализитами с пространственно экранированными и неэкранированными атомами азота [9].

ТГФ использовали в отдельных случаях в качестве компонентов ПФ при анализе некоторых пестицидов и гербицидов [8]. Так, 100% ТГФ применяли в качестве элюента при разделении на сорбенте α -циклодекстрин ($\lambda=238$ нм) *син*- и *анти*-изомеров 1,3,5-тринитро-1,3,5-гексагидротриазина. При 20°C изомеры элюируются одним пиком с $T_R=5$ мин, однако при -20°C наблюдается почти полное разрешение, изомеры вымываются при T_R 6 и 7.5 мин [10]. Пять оловоорганических соединений, используемых как пестициды или стабилизаторы полихлорвинила (фенилбутилолова оксид, трифенилолова хлорид, трициклогексиллолова гидроксид, дибутилолова дихлорид и дифенилолова дихлорид), разделили на цианопропильной неподвижной фазе ($\lambda=430$ нм), применяя элюент гексан – ТГФ – уксусная кислота (96:2:2) [11]. Таким образом, ТГФ не увеличивает разрешение соединений, не являющихся донорами водородной связи, поэтому он не нашел большого применения при анализе ароматических и хлорированных соединений, являющихся базовыми среди пести-

цидов. Можно отметить только интересные попытки его применения для разделения карбоновых и оловоорганических соединений.

В жидкостной хроматографии ПАВ применение ТГФ отмечено в следующих случаях. Алкилированные эфиры серной кислоты могут быть отделены от исходных спиртов с помощью элюентов вода – ТГФ в градиентном режиме (90/10-40/60-0/100) на обращенных колонках при детектировании с помощью детектора светового рассеяния [8]. При анализе линейных алкилфенилсульфонатов в сточных водах и в образцах речной воды разделение было достигнуто на колонке C_{18} ($\lambda=225$ нм) при использовании подвижной фазы ТГФ – вода (45:55) с добавкой перхлората натрия на 0.1М [12].

Наиболее широко ТГФ применяется в анализе полимеров. Традиционно гелепроникающая (или эксклюзионная) хроматография использовалась для характеристики полимеров. В этом случае ТГФ является базовым, потому что растворяет многие полярные и неполярные полимеры. ТГФ, используемый в гелепроникающей хроматографии, обычно стабилизируется добавкой ионола, чтобы предотвратить образование пероксидов и не повредить полистиролдивинилбензольный гель, на основе которого создана матрица сорбента. Часто ионол не создает никаких проблем с обнаружением, так как многие полимеры не имеют никаких УФ-хромофоров, поэтому для детектирования используют рефрактометрические детекторы. Для анализа полимеров используют также варианты НФХ и ОФХ. Главным требованием здесь остается растворимость полимера в элюенте. Поэтому роль ТГФ в этом случае первостепенна.

При характеристике сополимера стирол-*трет*-бутилметакрилата ($M = 240000$) в [13] получены хроматограммы ($\lambda=259$ нм) на фенильных и октадецильных колонках (C_{18}), в качестве элюента использовали градиентную систему метанол – ТГФ (90/10-30/70). Каждая проба содержала наряду с сополимером стандарт полистирола. Отмечено, что сополимер при хранении в ТГФ иногда становился мутным, даже когда использовался стабилизированный растворитель. Не удивительно, что хроматограммы изменялись, когда анализировали помутневшие растворы. Комментариев по факту помутнения авторы исследований не сделали. Когда при использовании градиента для исследований полимеров на начальном этапе применяют более слабый растворитель, вероятность осаждения возрастает. Дей-

ствительно, обратимые процессы осаждения – растворения являются важными характеристиками полимера, чтобы получить имеющие практическую значимость хроматограммы, следует учитывать баланс между адсорбцией, осаждением и редиссоциацией полимера.

Для характеристики сополимеров применяли также градиентные составы, содержащие ацетонитрил и ТГФ. Например, молекулярно-массовое распределение в сополимерах полиметилметакрилат/полистирол определяли на колонке C_{18} ($\lambda=254$ нм). Профили вымывания были получены с помощью сложного градиента бинарного состава ацетонитрил – ТГФ (90/10-0/100). Были охарактеризованы фракции с $M=86000-292000$. Авторы работы [14] обратили внимание, что распределение полимерного состава, определенное методом ОФХ, не слишком хорошо совпадает с результатами теоретических вычислений. Оказалось, что результаты искажены из-за сильной адсорбции или осаждения полимера на колонке. Удалось обнаружить при последующем элюировании остаточные количества образца полимера.

В условиях ОФХ анализировали новолачные смолы, полученные конденсацией *n*-крезола с формальдегидом ($\lambda=280$ нм). Хроматографирование проводили при 50°C с использованием сложного градиента элюентом ТГФ – метанол – вода (0/50/50-50/50/0). В образцах был выявлен исходный мономер, получено разделение олигомеров вплоть до октамера [15]. Имеются удачные разделения эпоксидных смол в условиях ОФХ с применением градиентов ТГФ – вода, ТГФ – метанол – вода, ТГФ – ацетонитрил – вода при 40-50°C. Наблюдалось разделение олигомеров $n=20$ [8].

Есть работы, в которых описано разделение фракций олигомеров полистирола в изократическом режиме ОФХ элюентом ТГФ – вода (60:40). Критический параметр, на который часто не обращают внимания – потенциальная перегрузка при вводе пробы, которая может приводить к осаждению полимера на колонке и периферии хроматографического тракта (фильтрах, капиллярах, ячейке детектора).

В последнее время интенсивно развивается химия фуллеренов. Эти соединения имеют специфическое хроматографическое поведение. Описано разделение фуллеренов C_{60} и C_{70} на колонке C_{18} ($\lambda=254$ нм) с помощью подвижной фазы ТГФ – ацетонитрил. Фактор удерживания k' для C_{60} и C_{70} составляет 0.5 и 0.6 при использовании состава смеси ТГФ – ацетонитрил в соотношении 80:20, его величины достигают 2.2 и 3.8 при использо-

вании элюента ТГФ – ацетонитрил состава 60:40. При увеличении концентрации фуллеренов в пробе наблюдается раздвоение пиков. Вероятней всего искажение формы пиков связано с перегрузкой и падением растворимости [8].

Стеариновая и 12-гидроксистеариновая кислоты, извлеченные из консистентных смазок, успешно разделили на колонке C_{18} при использовании подвижной фазы ТГФ – вода – трифторуксусная кислота (70:30:0.03) [16].

Таким образом, ТГФ обладает превосходной способностью растворять полимеры и ВМС с широким диапазоном молекулярных масс, это относительно сильный элюент, как в ОФХ, так и в НФХ. Эти свойства, вместе со способностью быть акцептором водородных связей, приводящей к уникальной селективности и уменьшению времени удерживания, выделяют ТГФ как один из универсальных растворителей для жидкостной хроматографии.

Важное значение ТГФ имеет при анализе биологических анализов. При анализе раствора 4-(бромметил)-7-метоксикумаринового производного декановой кислоты в 100 % ТГФ на колонке C_{18} с применением элюента метанол – вода 90:10 обнаружили раздвоение пика. Авторы не смогли объяснить эффект, но пришли к выводу, что для избежания данной проблемы образец следует растворять или в самой ПФ, или в растворителе, имеющим немного меньшую полярность, чем используемый элюент. Применение 100% ТГФ в качестве растворителя пробы нередко приводит к такому артефакту [8].

Четыре гидроксикоричных кислоты (синапиновая, кофейная, феруловая и кумариновая кислоты), входящие в состав апельсинового сока были разделены на колонке C_{18} (324 нм) в ПФ ТГФ – ацетонитрил – 2 %-й водный раствор уксусной кислоты при градиенте (12/5/83-35/0/65). Было установлено, что наибольшее разрешение при минимальном удерживании наблюдается, когда в качестве органического модификатора берут именно ТГФ, эффективность уменьшается при переходе к ацетонитрилу и затем к метанолу. В этих же условиях найдено оптимальное решение для нарингина и гесперидина, также входящих в состав апельсинового сока [17].

В режиме НФХ в ПФ гексан – ТГФ определяют содержание ретинолов, эргокальциферола, холекальциферола, токоферолов, менадиона и филлохинона (254 или 292 нм). В работе [18] найдена зависимость фактора удерживания k' от концентрации ТГФ в гексане (5-20 %), которая пока-

зала большие возможности регулировать параметры удерживания, при высокой селективности, по сравнению с другим модификатором – изопропиловым спиртом. Зависимость удерживания от концентрации изопропанола интенсивнее, однако, при его использовании в качестве модификатора улучшается форма пиков, они более симметричны, особенно для сорбатов, имеющих доступные группы –ОН. При анализе токоферолов в растительных маслах в режиме ОФХ на C_{18} пригоден элюент 60:25:15 ацетонитрил – ТГФ – вода [8]. Каротиноиды легко реагируют с пероксидами. Поэтому рекомендуется применять при их анализе свежеприготовленный, освобожденный от пероксидов ТГФ, или применять ТГФ с добавкой стабилизатора (ионола). Однако ионол мешает анализу при 280 нм, поэтому детектирование следует проводить при λ ниже, или выше указанного максимума, характерного для ионола.

Изучение хроматографического поведения 12 экистероидов (например, экизона, постстерона, циастерона и различных гидроксильированных и метилированных аналогов) на сорбенте C_{18} (254 нм) в водном метаноле (35%), ацетонитриле (15%), ТГФ (10%), и диоксане (20%) показало, что наибольшие изменения в удерживании и селективности происходят при переходе от метанола (донора и акцептора водородной связи) к диоксану или ТГФ (акцепторы водородной связи) для анализов, которые содержат в положениях С-11 или С-25 группу –ОН [19]. Удерживание этих веществ катастрофически увеличилось, указывая, что гидроксилы пространственно не затруднены и могут взаимодействовать с акцепторами водородной связи типа диоксана и ТГФ. Следовательно, в этих условиях аналит ассоциирует с растворителем, и этот эффект проявляется на удерживании в присутствии ТГФ или диоксана в подвижной фазе.

В работе [8], показано, что растительные масла можно охарактеризовать с помощью колонки C_{18} и изократического элюента ацетонитрил – ТГФ – гексан (0.58:0.32:0.10) Эта система разделяет триглицериды по числу углеродных атомов и степени ненасыщенности. Разрешение пиков изучали при понижении температуры системы от 25.5 до 14.5 °С. С уменьшением температуры ширина пика, как и ожидалось, увеличивалась, но значительно более медленно, чем изменялся коэффициент разрешения.

Исследовано влияние растворителя, в котором растворяют пробу, на форму пиков и разделение триглицеридов пальмового масла [8]. Ацетон, пропионитрил и изопропанол дают хорошие хро-

матогаммы для большого количества полярных триглицеридов, но приводят к ухудшению хроматограмм для неполярных триглицеридов. Использование ТГФ, хлороформа, дихлорметана, или гексана в качестве инъекционного растворителя дает противоположные результаты. Было найдено, что смесь ацетон – ТГФ 50:50 является оптимальным составом для поставленной задачи. ТГФ нередко используют как малообъемную добавку в ПФ при хроматографическом анализе триглицеридов и фосфолипидов [8].

Семь коричневых пигментов абрикоса были проанализированы в режиме ОФХ (C_{18}) (436 нм) с использованием сложного градиента вода – ацетонитрил – ТГФ (99/0/1-55/5/40-0/90/10) [20]. При этом на хроматограмме наблюдался в конце градиента большой пик с обратным уклоном. Скорее всего, это элюировалось не индивидуальное вещество, а накопившиеся на сорбенте за время проведения анализов в градиентном режиме фоновые примеси. Такие эффекты наблюдаются, когда проба содержит вещества с сильно различающимися полярными свойствами и растворимостью. Площади таких пиков обычно прямо пропорциональны объему ПФ с низкой элюирующей способностью, которая прокачивается через колонку между градиентами.

ТГФ использовали как малообъемный компонент обращенной ПФ в анализе 5-диметиламинафтаил-1-сульфонилпроизводных солянокислых иодотиронинов, которые извлекают из мозга, тканей печени и сыворотки: ацетонитрил – ТГФ – вода (3 мМ H_3PO_4 + 0.2 мМ триэтиламин), градиент (28/0.5/71.5-90/10/0), колонка C_{18} , флуориметрический детектор [21].

Аминосоединения, входящие в состав вина (гистамин, триптамин, тирамин, фенилэтиламин, путресцин, кадаверин, 1,6-диаминогексан и триптофан), были разделены в условиях ОФХ как производные о-фталевого альдегида с электрохимическим детектированием в градиентном режиме: ацетонитрил – ТГФ – вода (0.1 М ацетата натрия, pH = 6.5), исходный состав 12.5:5:82.5, конечный состав 25:30:45, градиент (85/15-0/100) [22].

Ряд из 10 кумаринов (умбеллиферон, ксантоксин, императорин, острутол и др.) разделены в режиме ОФХ ($\lambda=320$ нм) в элюентах 42:58 диоксан – вода и 28:72 ТГФ – вода. Чтобы сравнить последствия влияния растворителя, содержание ТГФ и диоксана в элюенте были выбраны так, чтобы время удерживания последнего пика было одинаковым, т.е. ПФ были изоэлюотропны по этому веществу. Отмечено реверсирование порядка элюирования для императорина и острутола при замене ТГФ на диоксан. Острутол имеет -ОН группу, отсутствующую у императорина. Увеличенная вероятность образования водородной связи с диоксаном, в отличие от ТГФ, может объяснить большее время удерживания, наблюдаемое в хроматографической системе с диоксаном [8].

Эргокорнин, эргокриптины, эргокоринин, эргомитрин и эргомитринин, выделенные из суслика, были разделены в условиях ОФХ ($\lambda=280$ или 322 нм) при использовании подвижной фазы 40:60 ТГФ – воде (10 мМ ацетата аммония) [8].

Полезным оказалось применение ТГФ в ВЭЖХ афлатоксинов. Так при разделении афлатоксинов B_1 , B_2 , G_1 и G_2 в условиях ОФХ на колонке C_{18} ($\lambda=360$ нм) испытаны подвижные фазы 60:40 метанол – вода, 40:60 ацетонитрил – вода и

Таблица 6.
Зависимость показателя преломления ПФ вода – ТГФ от температуры в диапазоне 25-50°C [6]

Об. %	Температура, С°					
	25	30	35	40	45	50
0	1.3326	1.3322	1.3318	1.3310	1.3302	1.3292
10	1.3398	1.3395	1.3382	1.3379	1.3362	1.3347
20	1.3487	1.3472	1.3468	1.3452	1.3445	1.3424
30	1.3583	1.3538	1.3528	1.3512	1.3509	1.3510
40	1.3650	1.3647	1.3613	1.3593	1.3580	1.3543
50	1.3741	1.3727	1.3712	1.3672	1.3670	1.3649
60	1.3818	1.3805	1.3782	1.3745	1.3730	1.3715
70	1.3889	1.3864	1.3854	1.3820	1.3795	1.3778
80	1.3943	1.3922	1.3910	1.3882	1.3863	1.3842
90	1.4010	1.3988	1.3962	1.3938	1.3915	1.3891
100	1.4051	1.4030	1.4000	1.3975	1.3948	1.3925

20:80 ТГФ – вода. Все подвижные фазы элюировали афлатоксины за время <15 минут, но ацетонитрильная и метанольная подвижные фазы давали неполное разделение веществ, определяемых при анализе. ТГФ-содержащая ПФ не только хорошо разрешала пики всех афлатоксинов, но и давала лучшую пиковую форму [8].

Таким образом, ТГФ целесообразен в хроматографических системах для улучшения селективности разделения соединений, содержащих группы -ОН. Для стероидов и малополярных соединений типа ретинолов, токоферолов водородная связь часто имеет первостепенное значение в увеличенной селективности. Это, вместе с высокой растворяющей способностью, является преимуществом ТГФ перед другими хроматографическими растворителями.

В хроматографии аминокислот, пептидов и протеинов ТГФ использовался только как малообъемная составляющая ПФ. Так, Гляйх и Киркланд при оптимизации разделения 20 фенилтиогидантоинов использовали кватернарные системы растворителя (метанол, ТГФ, ацетонитрил, водный буфер) [23].

ТГФ наиболее часто входит в состав ПФ при анализе фармацевтических препаратов. Он редко используется как единственный органический компонент бинарной подвижной фазы, обычно присутствует в качестве небольшой добавки (1-15 %) в дополнение к другому органическому модификатору (ацетонитрилу или метанолу). ТГФ на этих уровнях эффективно улучшает форму пиков и уменьшает общее время анализа.

Так, экстракты кофеина, теofilлина, теобромина и параксантина из мозговой ткани и сыворотки разделяются на колонке C_{18} ($\lambda=273$ нм), при использовании элюента 3:97 ТГФ – вода (фосфатный буфер, pH = 6.5) [8].

Аспартам и сахарин в диетических смесях разделяют на колонке C_{18} ($\lambda=210$ нм для аспартама и 270 нм для сахарина – имиды *o*-сульфобензойной кислоты). Удовлетворительное разделение от других компонентов матрицы (например, ацесульфам, 4-сульфанилбензойной кислоты, резорцина (внутренний стандарт) и *o*-толилсульфонамида) было сделано с применением элюента 5:5:90 ТГФ – метанол – вода (фосфатный буфер, pH = 3.0) [24].

В составе наркотических препаратов и лекарственных средств часто содержатся одна и более основных аминогрупп, и ТГФ имеет явное преимущество как модификатор, благодаря свойствам акцептора водородной связи. Это свойство предотвращает прямое взаимодействие силанольных

групп сорбента с аналитом, которое кинетически замедляет десорбцию вещества с поверхности сорбента. Поэтому, ТГФ используется как модификатор ПФ с уровнем ≤ 10 %, например, при анализе 5-аминосалициловой кислоты и ее примесей, рамиприла и рамиприлатов, таксола и сопутствующих соединений, пириметамина и др. [8].

Так, тразодон был отделен от 10 сопутствующих примесей на обращенной фазе ($\lambda=248$ нм) при использовании элюента 15:5:15:67.5 ТГФ – метанол – ацетонитрил – вода (трифторуксусная кислота 0.5 %). Кортизол, кортизон, кортикостерон, преднизон и преднизолон, выделенные из сыворотки, разделяли на неподвижной фазе C_{18} ($\lambda=215$ нм) при 50°C с помощью ПФ вода – ТГФ (80:20). Кокаин, и его метаболиты разделяли друг от друга и от ацетилпромазина, кетамина и атропина на колонке C_8 ($\lambda=215$ или 235 нм) с помощью элюента вода (фосфатный буфер, pH = 2.75) – ТГФ – триэтиламин (96.75:3.25:0.0025) [8].

Подводя итог обзора хроматографических свойств ТГФ, отметим, что этот растворитель значительно повышает эффективность хроматографической системы при осуществлении разделения многих соединений, содержащих гидроксил- и аминогруппы. Для этой цели ТГФ достаточно использовать в виде малообъемной добавки (часто <10 %) к ПФ. Небольшой уровень концентрации ТГФ в элюенте позволяет сохранить достаточную для детектирования суммарную прозрачность в УФ свете (до 210 нм) и сводит к минимуму его реакционную способность.

Авторы выражают благодарность к.б.н. Проселкову П.В. за помощь в подборе иностранной литературы по ВЭЖХ биологических и фармацевтических аналитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рудаков О.Б. Растворитель как средство управления процессом в жидкостной хроматографии. Воронеж: ВГУ. 300 с.
2. Рудаков О. Б., Рудакова Л.В., Селеменев В. Ф. // Теория и практика сорбционных процессов. Воронеж: ВГУ, 1998. Вып. 23. с. 251-258.
3. Рудаков О.Б., Хрипушин В. В., Селеменев В.Ф., Коновалов В.В., Рудакова Л. В., Бочарова О. Н. //Теория и практика сорбционных процессов». Воронеж: ВГУ, 1999. Вып. 24. С. 45-47.
4. Рудаков О.Б., Хрипушин В. В., Селеменев В.Ф., Бочарова О. Н., Рудакова Л. В., Дроздова Н.В. //Теория и практика сорбционных процессов». Воронеж: ВГУ, 1999. Вып. 24. С. 82-85.
5. Рудаков О. Б., Селеменев В.Ф. // Журн. физической химии. 1999, Т.73, №12, с. 2242

6. *Openheim G. Grushka E.* //J. of Chromatogr. A, 2002, №942, p. 631.
7. *Рудаков О. Б., Соколов М.И. Селеменев В.Ф.* // Журн. физической химии. 1999, Т.73, №9, с. 1641.
8. *Sadek P.* The HPLC solvent guide. New York: John Wiley & Sons, NY, 1996. 346 p.
9. *Colin H., Schmitter J.M., Guiochon G.* //Anal. Chem. 1981, №53. p.625.
10. *Issaq H.J., Atamna I.Z., Schultz N.M., Muschik G.M., Saavedra I.E.*, J. Liq. Chromatogr. 1989, №12, p. 771.
11. *Stab J.A., Rozing M.J.M., van Hattum B., Cofino W.P., Brinkman U.A.Th.* //J. Chromatogr. 1992, №609, p.195.
12. *Castles M.A., Moore B.L., Ward S.R.* //Anal. Chem. 1989, №61, p.2534.
13. *Glöckner G., Wolf D.* // Chromatographia 1992, №34, p. 363.
14. *Glöckner G., Wolf D., Engelhardt H.* // Chromatographia, 1994, №39, p.170.
15. *Podzimek S., Hroch L.* //J. Appl. Polym. Sci. 1993, №47, p.2005.
16. *Calabrese K.L.* // J. Chromatogr. 1987, №386, p. 199 .
17. *Rouseff R.L., Dettweiler G.R., Swaine R.M., Nairn M., Zehavi U.* //J. Chromat. Sci. 1992, №30, p.383.
18. *Hara S., Ando T., Nakayama Y.* // J. Liq. Chromatogr. 1989, N12, p.739.
19. *Wilson I.D., Bielby C.R., Morgan E.D.* // J. Chromatogr. 1982, N238, p.97.
20. *Okamura N., Kobayashi K., Yagi A., Kitazawa T., Shimomura K.* //J. Chromatogr. 1991, N542, p.317.
21. *Hendrich C.E., Berdecia-Rodriguez J., Wiednieier V.T., Porterfield S.P.* // J. Chromatogr. 1992, N577, p.19.
22. *Achilli G., Cellerino G.P., d’Eril G.M.* // J. Chromatogr. 1994 № A 661, p. 201.
23. *Glajch J.L., Kirkland J.J.* //J. Chromatogr. Sci.1987 №25, p. 4.
24. *Di Pietra A.M, Cavrini V., Bonazzi D., Benfenati L.* //Chromatographia 1990, N30, p. 215.