

## АЦЕТОНИТРИЛ – УНИКАЛЬНЫЙ РАСТВОРИТЕЛЬ ДЛЯ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ЭКСТРАКЦИИ

О. Б. Рудаков<sup>1</sup>, Е. А. Хорохордина<sup>1</sup>, Л. В. Рудакова<sup>2</sup>, Е. Н. Грошев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Воронежский государственный архитектурно-строительный университет

<sup>2</sup>Воронежский государственный медицинский университет

Поступила в редакцию 24.04.2015 г.

**Аннотация.** Рассмотрены уникальные свойства ацетонитрила как компонента подвижной фазы в обращенно-фазовой ВЭЖХ и гидрофильного экстрагента в жидкостно-жидкостной экстракции.

**Ключевые слова:** ацетонитрил, жидкостная хроматография, жидкостно-жидкостная экстракция, полярность, фенолы.

**Abstract.** It is considered, the unique properties of acetonitrile as a component of the mobile phase in reversed-phase HPLC and the extractant in the hydrophilic liquid-liquid extraction.

**Keywords:** acetonitrile, liquid chromatography, liquid-liquid extraction, polarity, phenols.

Ацетонитрил ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) - апротонный полярный органический растворитель, который до 80-х годов прошлого века имел ограниченное применение. Однако благодаря целому ряду уникальных свойств он нашел широкое применение в аналитической химии, в первую очередь, в обращенно-фазовой ВЭЖХ, в жидкостно-жидкостной экстракции (ЖЖЭ), твердофазной экстракции (ТФЭ) и микроэкстракции [1-5].

Целью работы стало рассмотрение совокупности физико-химических свойств ацетонитрила и его водных растворов с точки зрения их прикладного применения в хроматографических, сорбционных и экстракционных процессах.

Ацетонитрил является одним из наиболее стабильных нитрилов, его гидролиз в воде протекает очень медленно, оптически чистый ацетонитрил обладает высокой прозрачностью в УФ области спектра, низкой вязкостью, высокой элюирующей способностью, хорошо растворяет многие органические вещества, при этом неограниченно смешивается с водой и буферными составами. Все это делает  $\text{CH}_3\text{CN}$  удобным растворителем не

только для спектрофотометрии и ВЭЖХ с оптическим детектированием, но и для капиллярного электрофореза.  $\text{CH}_3\text{CN}$  слабо взаимодействует с хиральными макроциклами, такими, как циклодекстрины, поэтому применим для разделения стереоизомеров с использованием хроматографических систем, содержащих макроциклические добавки [5].

Как показали рейтинговые исследования [4, 6] по сумме технико-эксплуатационных свойств, ацетонитрил и его смеси с водой и буферными растворами являются наиболее востребованными в качестве растворителей проб, гидрофильных экстрагентов и компонентов подвижных фаз в экстракционно-инструментальных способах аналитического контроля органических веществ широкого спектра, в том числе биологически активных веществ (БАВ). Вместе с тем, ацетонитрил является дорогим реактивом (чистый для спектрофотометрии и ВЭЖХ), обладает сравнительно высокой пожаровзрывоопасностью и токсичностью [7-9], эти три фактора побудили исследователей к поиску альтернативы, для чего были изучены, например, низшие спирты, простые и сложные эфиры. Наиболее интересными по комплексу физико-химических и технических

свойств оказались метиловый спирт ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), тетрагидрофуран (ТГФ), изопропанол (ИПС) и этиловый спирт ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ )[1-6, 14]. Эти растворители, демонстрируя ряд превосходных свойств, существенно уступают ацетонитрилу в чем-то другом. Как видно, природа не изобрела идеального растворителя, именно в связи с этим применение в аналитической химии все чаще находят смешанные растворители.

Не смотря на высокую полярность апротонного  $\text{CH}_3\text{CN}$ , его химическая природа существенно отличается от химической природы спиртов и воды. Структуры бинарных смесей ацетонитрила и протондонорного растворителя  $\text{CH}_3\text{OH}$ , а также их бинарных смесей с водой, до сих пор представляют научно-исследовательской интерес, но остаются неразрешенными. В связи с сильными водородными связями у воды и низших спиртов, а также наличием самоассоциированных форм органических компонентов, структуры сольватов ацетонитрила и метанола в смеси с водой существенно различаются. В частности, экспериментальные данные показали, что смесь ацетонитрил – вода следует рассматривать, по крайней мере, как трехкомпонентную систему, в которой могут в растворе сосуществовать две различные формы  $\text{CH}_3\text{CN}$  [10]. Образование сильных водородных связей и создание слабополярных самоассоциированных форм ацетонитрила воздействуют на целый ряд физических и химических свойств смесей ацетонитрил – вода [12].

Данные, представленные в работах [5, 11, 13, 15-17] показывают, что если смеси ацетонитрил – вода выдерживаются в течение от получаса до нескольких часов при температуре ниже комнатной, может наблюдаться разделение фаз. Установлено, что разделение фаз происходит при температурах ниже  $-1,32\text{ }^\circ\text{C}$ , оно может наблюдаться в широком диапазоне концентраций ацетонитрила, от 31% об. до 89% об. ( $\varphi_2=0,31-0,89$ ) [5]. В этих условиях  $\text{CH}_3\text{CN}$  распределен между двумя фазами. Верхняя фаза содержит 88% об.  $\text{CH}_3\text{CN}$ , а нижняя фаза состоит из 65% об. воды. Это свойство  $\text{CH}_3\text{CN}$  может быть использовано для пробоподготовки образцов, в том числе для депротеинизации сырого образца, удаления белка из органического растворителя, для селективной ЖЖЭ сравнительно низкомолекулярных соединений, фенолов, триклозана или бисфенола А из сложных смесей, в том числе из молочных продуктов [4, 5, 11-13, 15-17]. Кроме того, это явление может использоваться как энергосбере-

гающий способ удаления избытка ацетонитрила из биологических образцов и из хроматографических подвижных фаз.

Несмотря на то, что ацетонитрилу и его водным растворам посвящено достаточно много исследований, даже для чистого ацетонитрила данные о температуре замерзания в разных источниках отличаются, в литературе приводятся значения от  $-46$  до  $-41\text{ }^\circ\text{C}$ . Известный российский ученый Ревельский И.А. считает практически все результаты определения физико-химических параметров индивидуальных, а тем более смешанных растворителей заведомо неверными, так как при их нахождении не учитывается наличие не обнаруженных или неизвестных примесей, в частности, в любом органическом растворителе есть хотя бы следы влаги [18]. В работе [12] как раз обсужден сложный и нелинейный профиль кривых температуры замерзания смесей  $\text{CH}_3\text{CN}$  с водой. В частности, начиная с 90% об.  $\text{CH}_3\text{CN}$  в воде, температура замерзания быстро уменьшается. Минимальная температура замерзания найденная в работе [12]  $-44,9\text{ }^\circ\text{C}$  наблюдается для смеси, состоящей из 98% об. ацетонитрила. Точку замерзания 100%-го ацетонитрила авторы этой работы определили как  $-43,4\text{ }^\circ\text{C}$ . По всей видимости, температура замерзания  $\text{CH}_3\text{CN}$  может заметно изменяться в зависимости от присутствия следов воды и других минорных примесей. Нетипичный характер замерзания смесей  $\text{CH}_3\text{CN}$  с водой связан с изменением полярности бинарного растворителя в диапазоне концентраций  $\text{CH}_3\text{CN}$  90-100% об. Это важный вывод для прикладного использования  $\text{CH}_3\text{CN}$  в жидкостной хроматографии, особенно в обращенно-фазовой. В работе [12] на примере хроматографического поведения стероидов показано, как в этом узком диапазоне составов бинарных смесей  $\text{CH}_3\text{CN}$  с водой наблюдается изменение порядка удерживания аналитов. Такое поведение более характерно для условий нормально-фазовой хроматографии, где подвижная фаза является менее полярной по сравнению с неподвижной фазой. Таким образом, это наблюдение непосредственно подтверждает, что полярность подвижной фазы, состоящей в основном из  $\text{CH}_3\text{CN}$  значительно изменяется, когда его концентрация приближается к 100%. Отсюда можно сделать вывод, что чистый ацетонитрил с низким содержанием воды может функционировать как относительно неполярный сольвент, однако его полярность легко изменяется путем добавления небольшого объема воды.

Аномально низкая полярность чистого  $\text{CH}_3\text{CN}$  была выявлена при прямой жидкостной экстракции  $\text{CH}_3\text{CN}$  пигментов из фармацевтических препаратов [12].

Если такой показатель, как плотность для смесей  $\text{CH}_3\text{CN}$  – вода не проявляет сильных отклонений от типичных зависимостей для смесей гидрофильных растворителей с водой (рис. 1), то вязкость, в отличие от смесей с водой спиртов и ТГФ не имеет большого (в 1,5-3 раза) отклонения от аддитивности при эквиобъемных соотношениях, что делает водно-ацетонитрильные составы наиболее привлекательными для обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 2) [1, 6].

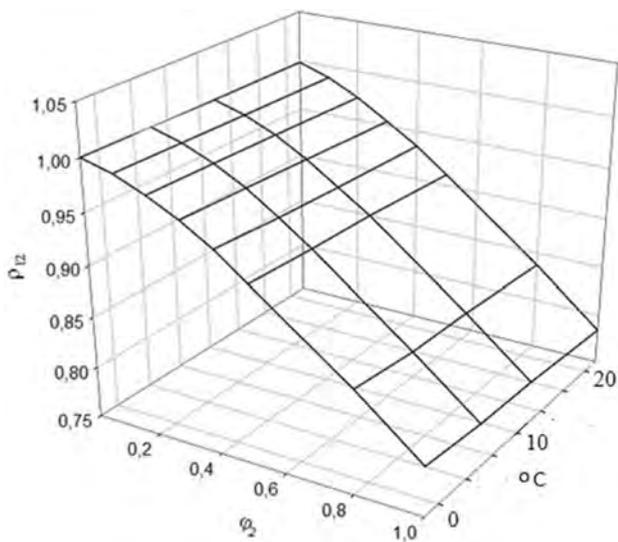


Рис. 1. Изменение плотности в системе «вода -  $\text{CH}_3\text{CN}$ » в зависимости от объемной доли ацетонитрила и температуры.

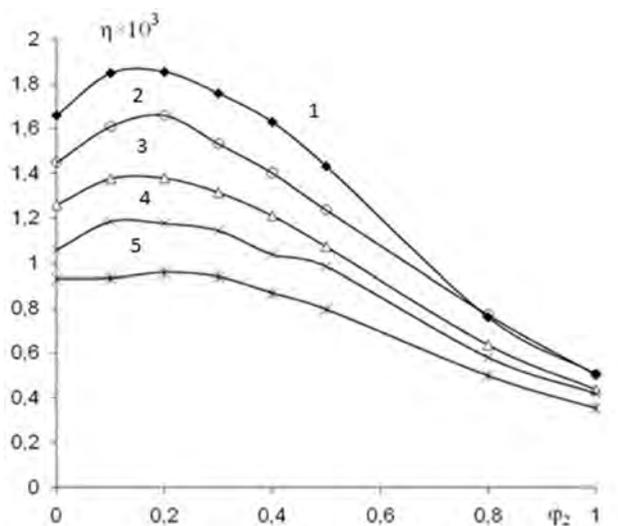


Рис. 2. Динамическая вязкость ( $\eta \times 10^3$ , сП) системы  $\text{CH}_3\text{CN}$  – вода при разных температурах, 1 – 3; 2 – 8; 3 – 13; 4 – 18; 5 – 23 °С.

Смеси  $\text{CH}_3\text{CN}$  – вода имеют высокую прозрачность в широком диапазоне длин волн [1, 3, 6], что позволяет использовать УФ-детектор для регистрации аналитических сигналов самых разнообразных органических соединений при проведении спектрофотометрического анализа или анализа методом УФ-ВЭЖХ (рис. 3). Главное условие, чтобы в ацетонитриле отсутствовали характерные для него примеси акрилонитрила и других ненасыщенных соединений с сопряженными кратными связями, т.е.  $\text{CH}_3\text{CN}$  должен иметь квалификацию «чистый для спектроскопии», «чистый для ВЭЖХ».

Интересное наблюдение сделано в работе [18], в которой изучали коэффициент проницаемости  $\psi = \sigma/\eta$  (размерность м/с) бинарных растворов. Этот коэффициент характеризует постоянную потока жидкости через капилляр и позволяет прогнозировать расстояния, проходимые фронтом конкретного растворителя за определенное время в планарной жидкостной хроматографии (бумажной или тонкослойной) в конкретном пористом слое.

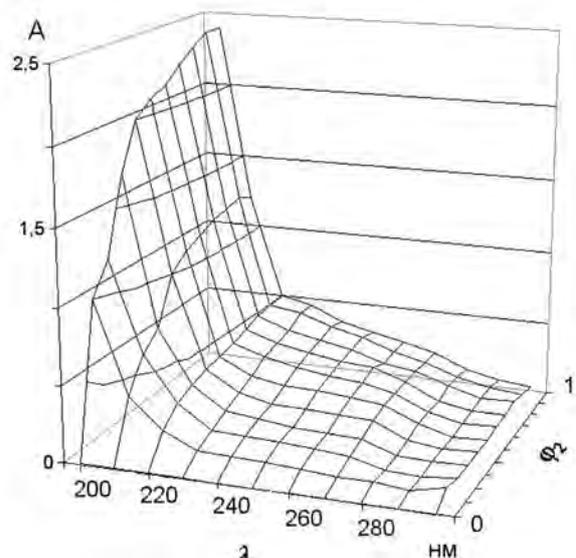


Рис. 3. Зависимость оптической плотности  $A_{12}$  от  $\phi_2$  и длины волны для смесей  $\text{CH}_3\text{CN}$  – вода, 20 °С [6].

Зависимость коэффициента проницаемости чистого  $\text{CH}_3\text{CN}$  существенно выше, чем у спиртов, т.е. при прочих равных условиях постоянная потока ацетонитрила выше, чем у спиртов и сопоставима с проницаемостью аномального растворителя – воды, ее снижение наблюдается для эквиобъемных составов (рис.4). Заметим, что для этих составов характерно существенное снижение рас-

творимости буферных растворов [1, 3]. В экстракционных системах вода -  $\text{CH}_3\text{CN}$  - высаливатель в ацетонитрильную фазу с высоким содержанием  $\text{CH}_3\text{CN}$  фенолы распределяются хуже, чем в более обводненные фазы [4] (рис.5). Это, пожалуй, также указывает на то, что при приближении концентрации ацетонитрила к 100% уменьшается его химическое сродство к гидроксилсодержащему фенольному соединению.

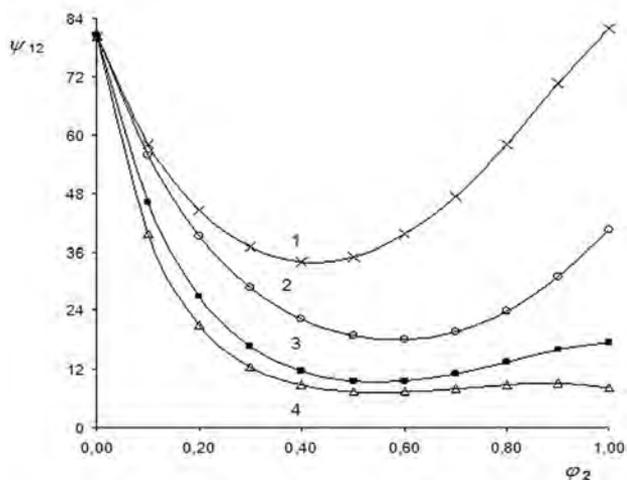


Рис.4. Изотермы проницаемости  $\Psi_{12}$  (м/с) обращенно-фазовых бинарных систем вода – модификатор от объемной доли модификатора  $\phi_2$ : 1 -  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; 2 -  $\text{CH}_3\text{OH}$ ; 3 -  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ; 4 - ИПС [18].

В работе [13] изучали возможность применения холодной экстракции фенолов из водных сред ацетонитрилом. Установлены воспроизводимые условия образования двух разделенных жидких фаз. В табл. 1 для примера приведены результаты исследования не только водно-ацетонитрильных смесей, но и смесей вода – ИПС.

Диапазон содержания ацетонитрила в смесях с водой, способных расслаиваться при температуре около  $-10^\circ\text{C}$ , оставляет от 0,38 до 0,87, тем не менее, и в этом случае можно подбирать состав растворителя пробы максимально близкий к составу подвижной фазы. Есть, конечно, возможность расслоения смеси и при более высоких температурах, но для этого требуются термостаты с более тонкой регулировкой заданной температуры.

Образование двухфазной гетерогенной системы жидкость – жидкость для смесей ацетонитри-

ла с водой при низкой температуре, безусловно, представляет большой практический интерес с точки зрения использования этого явления для пробоподготовки в химическом анализе методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, так как ацетонитрил является базовым растворителем для подвижных фаз в этом варианте ВЭЖХ. Особенно это важно для анализа лабильных БАВ, метаболитов, выделяемых из биологических жидкостей. В табл. 2 приведены коэффициенты распределения  $D$  и степени извлечения  $R$  нескольких фенолов в системе вода – ацетонитрил при  $-10^\circ\text{C}$ . Такие степени извлечения могут быть получены при проведении ЖЖЭ фенолов ацетонитрилом в присутствии  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  [4].

Таблица 1.

Результаты наблюдений за образованием гетерогенных фаз из смесей гидрофильных растворителей с водой при различном соотношении их объёмов,  $\tau$  – время выдерживания при температуре  $-10^\circ\text{C}$ : 1 - гомогенная жидкая система; 2 - двухфазная гетерогенная система жидкость – жидкость; 3 - двухфазная гетерогенная система лёд – водно-органическая жидкая фаза

$\tau$ , мин	Ацетонитрил			Изопропанол		
	1:1	1:10	1:100	1:1	1:10	1:100
25	1	1	1	1	1	1
30	2	1	1	1	1	1
45	2	1	3	1	1	3
60	2	3	3	1	3	3

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Чистый ацетонитрил и его водные смеси обладают уникальными хроматографическими, экстракционными и спектрофотометрическими свойствами, которые имеют важное прикладное значение и являются перспективными в разработке и усовершенствовании методик экстракционной пробоподготовки с применением гидрофильных экстрагентов и химического анализа биологически активных веществ с применением инструментальных методов. Одним из актуальных направлений исследования ацетонитрильных смесей является изучение их экстракционной эффективности при низких температурах, подбор тройных смесей, способных к образованию двух жидких фаз при охлаждении, в которых ацетонитрил частично замещен менее токсичными и менее дорогими растворителями.

Таблица 2.

Коэффициенты распределения ( $D$ ) и степень извлечения фенолов ( $R$ ) [18]

фенол		орто-крезол		мета-крезол		пара-крезол		орто-трет-бутилфенол	
$D$	$R, \%$	$D$	$R, \%$	$D$	$R, \%$	$D$	$R, \%$	$D$	$R, \%$
$45 \pm 3$	97.8	$70 \pm 5$	98.5	$75 \pm 6$	98.6	$80 \pm 7$	98.8	$140 \pm 10$	99.2

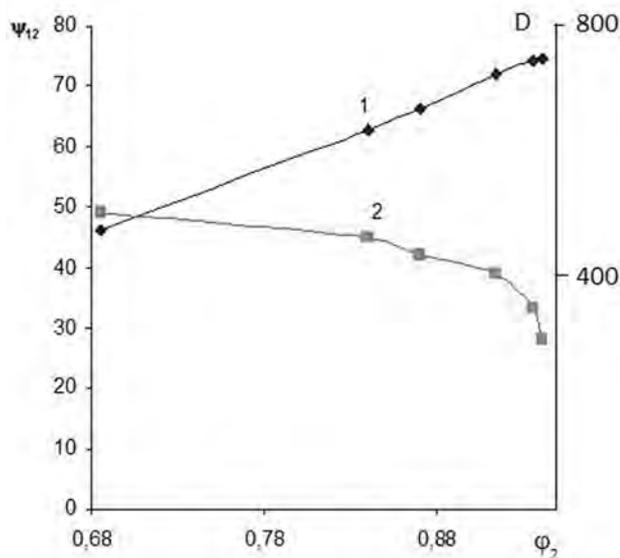


Рис. 5. Изотерма зависимости коэффициента проницаемости  $\psi_{12}$  бинарной смеси вода –  $\text{CH}_3\text{CN}$  объёмной доли  $\text{CH}_3\text{CN}$  (1) и коэффициента распределения фенола (2).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии / О.Б. Рудаков [и др.] — Воронеж: Водолей, 2004. — 528 с.
2. Рудаков О.Б. Растворитель как средство управления процессом в жидкостной хроматографии / О.Б. Рудаков. — Воронеж: Изд-во ВГУ, 2003. — 300 с.
3. Садек П. Растворители для ВЭЖХ / П. Садек. — М.: Бином. Лаборатория знаний, 2006. — 704 с.
4. Жидкостная экстракция смешанными растворителями. Применение в химическом анализе фенолов / Е.А. Хорохордина [и др.]. — Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing, 2012. — 240 с.
5. Pence D.N. Liquid-liquid equilibrium of the acetonitrile – water system for protein purification / D.N. Pence, Gu Tingyue // Separations Technology. — 1996. — V. 6, № 4. — P. 261–264.
6. Суровцев И.С. Информационные системы и цифровые технологии в аналитике и контроле биологически активных веществ / И.С. Суровцев, Л.В. Рудакова, О.Б. Рудаков. — Воронеж: Изд-во ВГАСУ. — 300 с.
7. Рудаков О.Б. Пожарная опасность водорастворимых растворителей и их водных растворов / О.Б. Рудаков, А.В. Калач, Н.В. Бердникова // Пожаровзрывобезопасность. — 2011. — Т. 20, № 1. — С. 31–32.
8. Пожаровзрывобезопасность хроматографической аналитической лаборатории / О.Б. Рудаков [и др.] // Пожаровзрывобезопасность. — 2012. — Т. 21, № 1. — С. 57–60.
9. Обобщенный критерий химической и пожарной безопасности сольвентов / О.Б. Рудаков [и др.] // Пожарная безопасность. — 2005. — № 6. — С. 81–85.
10. Rowlen K.L. Raman spectroscopic study of solvation structure in acetonitrile / water mixtures / K.L. Rowlen, J.M. Harris // Anal. Chem. — 1991. — V.63, №10. — P. 964–969.
11. Tingue Gu. Phase separation of acetonitrile – water mixture in protein purification / Gu Tingue, Gu Yesong, Zheng Yizhou // Separations Technology. — 1994. — V. 4, № 4. — P. 258–260.
12. Zarzycki P. K. Acetonitrile, the polarity chameleon / P.K. Zarzycki, M. B. Zarzycka, M. M. Ślącza // Analytical and Bioanalytical Chemistry. — 2010. — V. 397, №3. — P. 905–908.
13. Низкотемпературная жидкостная экстракция как способ пробоподготовки фенолов для анализа методом обращенно-фазовой ВЭЖХ / Е.А. Подолина [и др.] // Журнал аналитической химии. — 2010. — Т. 65, № 2. — С. 121–123.
14. Тетрагидрофуран – универсальный растворитель для жидкостной хроматографии / О.Б. Рудаков [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2003. — № 2. — С. 56–65.
15. Yesong Gu. Salt-induced phase separation can effectively remove the acetonitrile from the protein sample after the preparative RP-HPLC / Gu Yesong, Shih Po-Huhg // Enzyme and Microbial Technology. — 2004. — V.35, № 6-7. — P. 592–597.
16. Roach A. Association of triclosan to casein proteins through solvent-mediated high-pressure homogenization / A. Roach, J. Dunlap, F. Harte // Journal of Food Science. — 2009. — V.74, №2. — P. 23–29.
17. Georgescu B. Bisphenol A levels in commercial milk, infant formula and dairy products / B. Georgescu, C.E. Georgescu // Animal Biology & Animal Husbandry International Journal of the Bioflux Society. — 2013. — V. 5, №2. — P.171–174
18. Изотермы коэффициентов проницаемости бинарных подвижных фаз для жидкостной хроматографии / О.Б. Рудаков [и др.] // Журнал физической химии. — 2009. — Т. 83, № 11. — С. 2165–2168.

*Рудаков О. Б., Хорохордина Е. А., Рудакова Л. В., Грошев Е. Н.*

*Воронежский государственный архитектурно-строительный университет*

*Рудаков О. Б., д.х.н, профессор, проректор по научной работе, заведующий кафедрой химии*

*E-mail: robi57@mail.ru*

*Тел.: +7(473) 271-76-17*

*Хорохордина Е. А., к.х.н., доцент кафедры химии*

*E-mail: chorochordina@mail.ru*

*Тел.: +7(473) 271-76-17*

*Грошев Е. Н., аспирант кафедры химии*

*Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко*

*Рудакова Л. В., д.х.н, заведующая кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии*

*E-mail: pharmchem.vgma@mail.ru*

*Тел. (473) 253-02-49*

*Voronezh State University of Architecture and Civil Engineering*

*Rudakov O. B., Dr. Sci. (Chemistry), professor; Head of the department of chemistry*

*E-mail: robi57@mail.ru*

*Ph.: +7(473) 271-76-17*

*Khorokhordina E. A., PhD (Chemistry), associate professor of the department of chemistry*

*E-mail: chorochordina@mail.ru*

*Ph.: (473) 271-76-17*

*Groshev E. N., postgraduate student of the Department of chemistry*

*Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko*

*Rudakova L. V. — Dr. Sci. (Chemistry), Head of the department of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology*

*E-mail: pharmchem.vgma@mail.ru*

*Ph.: +7(473) 253-02-49*