

АЦЕТОНИТРИЛ – УНИКАЛЬНЫЙ РАСТВОРИТЕЛЬ ДЛЯ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ЭКСТРАКЦИИ

О. Б. Рудаков¹, Е. А. Хорохордина¹, Л. В. Рудакова², Е. Н. Грошев¹

¹Воронежский государственный архитектурно-строительный университет

²Воронежский 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 (CH_3CN) - 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 CH_3CN удобным растворителем не

только для спектрофотометрии и ВЭЖХ с оптическим детектированием, но и для капиллярного электрофореза. CH_3CN 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 (CH_3OH), 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 CH_3CN , его химическая природа существенно отличается от химической природы спиртов и воды. Структуры бинарных смесей ацетонитрила и протондонорного растворителя CH_3OH , 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 CH_3CN [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 CH_3CN распределен между двумя фазами. Верхняя фаза содержит 88% об. CH_3CN , а нижняя фаза состоит из 65% об. воды. Это свойство CH_3CN 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 CH_3CN с водой. В частности, начиная с 90% об. CH_3CN 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 CH_3CN может заметно изменяться в зависимости от присутствия следов воды и других минорных примесей. Нетипичный характер замерзания смесей CH_3CN с водой связан с изменением полярности бинарного растворителя в диапазоне концентраций CH_3CN 90-100% об. Это важный вывод для прикладного использования CH_3CN в жидкостной хроматографии, особенно в обращенно-фазовой. В работе [12] на примере хроматографического поведения стероидов показано, как в этом узком диапазоне составов бинарных смесей CH_3CN 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 CH_3CN 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 CH_3CN была выявлена при прямой жидкостной экстракции CH_3CN пигментов из фармацевтических препаратов [12].

Если такой показатель, как плотность для смесей CH_3CN – 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].

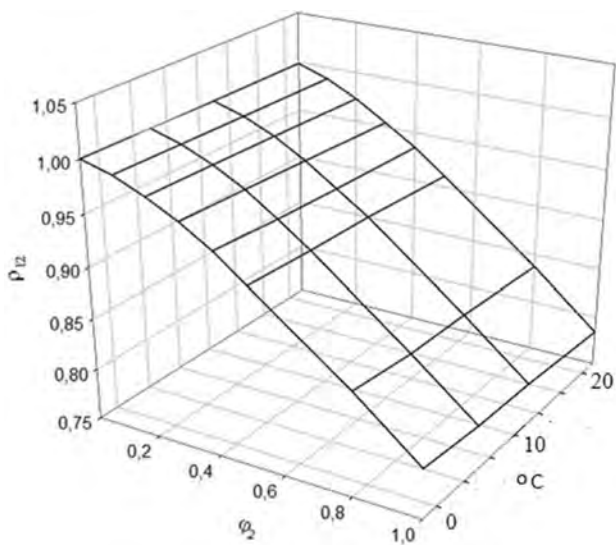


Рис. 1. Изменение плотности в системе «вода - CH_3CN » в зависимости от объемной доли ацетонитрила и температуры.

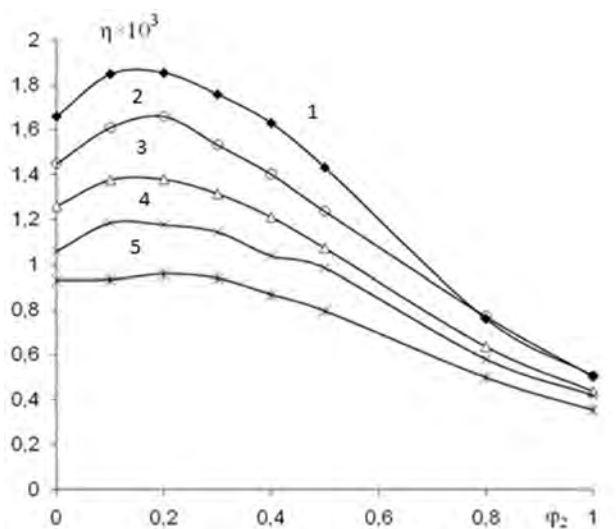


Рис. 2. Динамическая вязкость ($\eta \times 10^3$, сП) системы CH_3CN – вода при разных температурах, 1 – 3; 2 – 8; 3 – 13; 4 – 18; 5 – 23 °С.

Смеси CH_3CN – 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. CH_3CN 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.

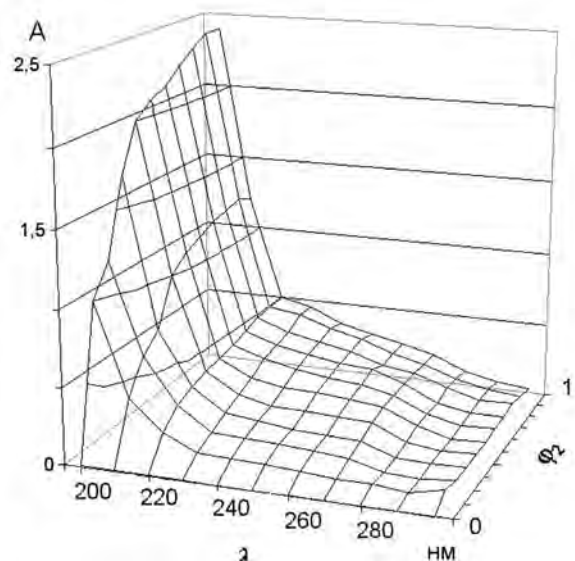


Рис. 3. Зависимость оптической плотности A_{12} от ϕ_2 и длины волны для смесей CH_3CN – вода, 20 °С [6].

Зависимость коэффициента проницаемости чистого CH_3CN 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 - CH_3CN - высаливатель в ацетонитрильную фазу с высоким содержанием CH_3CN 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.

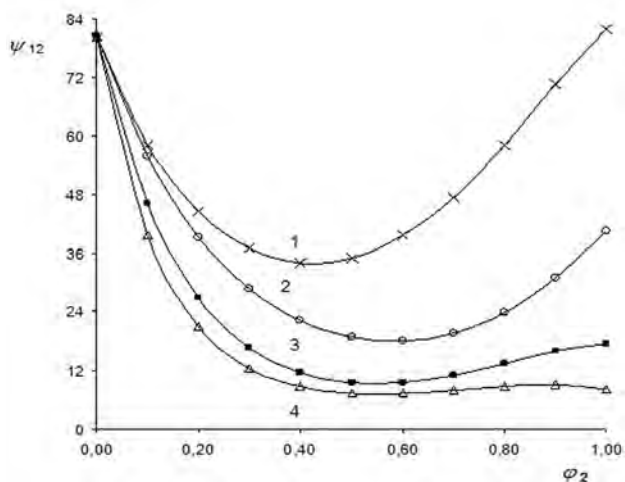


Рис.4. Изотермы проницаемости Ψ_{12} (м/с) обращенно-фазовых бинарных систем вода – модификатор от объемной доли модификатора ϕ_2 : 1 - CH_3CN ; 2 - CH_3OH ; 3 - $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$; 4 - ИПС [18].

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°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°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, τ – время выдерживания при температуре -10°C : 1 - гомогенная жидкая система; 2 - двухфазная гетерогенная система жидкость – жидкость; 3 - двухфазная гетерогенная система лёд – водно-органическая жидкая фаза

| τ , 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 ± 3 | 97.8 | 70 ± 5 | 98.5 | 75 ± 6 | 98.6 | 80 ± 7 | 98.8 | 140 ± 10 | 99.2 |

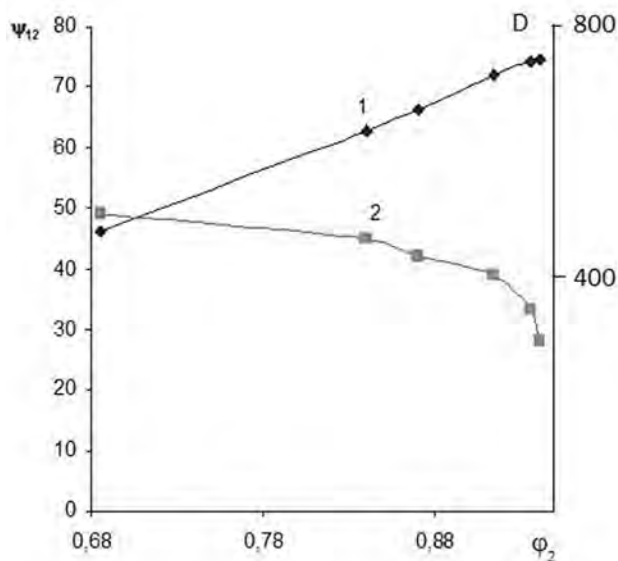


Рис. 5. Изотерма зависимости коэффициента проницаемости ψ_{12} бинарной смеси вода – CH_3CN объёмной доли CH_3CN (1) и коэффициента распределения фенола (2).

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