



УДК 543.544

Фторсодержащие органические соединения как компоненты хроматографических и электрофоретических систем

Найден С.В., Карцова Л.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 22.03.2012 г.

Аннотация

Обсуждается применение фторсодержащих органических соединений в качестве стационарных фаз, элюентов и их модификаторов в хроматографии и капиллярном электрофорезе. Рассмотрены примеры применения фторорганических соединений при разделении природных объектов и лекарственных препаратов.

Ключевые слова: хроматография, фторсодержащая неподвижная фаза, фторорганические соединения, модификатор элюента.

Fluorinated compounds application of as stationary phases, eluents and theirs modifiers in chromatography and capillary electrophoresis were described. Also fluorinated compounds employment examples in natural objects and drugs analysis were considered.

Keywords: chromatography, fluorinated stationary phase, fluoroorganic compound, eluent additives.

Введение

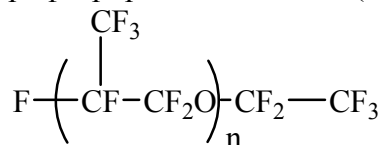
В последние годы проблема анализа смесей фторорганических соединений (ФОС) становится все более актуальной [1], что обусловлено активным использованием их в производстве высокоинертных материалов, в биомедицинских исследованиях [2-5], фармации [6], экологической химии [7], биотехнологии [8], при целевой доставке лекарственных препаратов [9]. В природе ФОС встречаются крайне редко [10].

В хроматографии фторированные полимеры первоначально использовались в качестве неподвижных фаз для газохроматографического анализа летучих фторидов металлов. Позднее появились сообщения о силикагелях с привитыми фторированными радикалами для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Показано, что использование фторорганических соединений в качестве компонентов хроматографических и электрофоретических систем позволяет с успехом определять не только фторсодержащие аналиты, но липиды [11], аминокислоты [12, 13], пептиды [12, 13], различные природные соединения [14, 15]. При этом фторорганические соединения (ФОС) применяются не только как

стационарные фазы, но и в качестве добавок к элюирующим системам [16,17].

Использование фторированных неподвижных фаз в газовой хроматографии

В газовой хроматографии наиболее часто используемыми неподвижными фазами (НПФ) являются полиэфир гексафторпропиленоксида (*Krytox AC* (рис. 1)), полимеры на основе хлортрифторэтилена (*Kel-F*, *Fluorolube*) и политрифторпропилсилоксана (*Silicone QF-1*).



Krytox AC

Рис. 1. Структура полимера Krytox AC

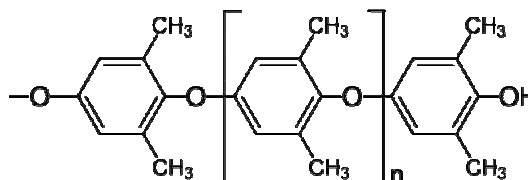


Рис. 2. Структура полиэфира PPE-5

В [18] исследованы четыре фторированных малополярных НПФ для ГЖХ (*Krytox AC*, *Kel-F 90* и *Fluorolube 2000*, *Silicone QF-1*), их характеристики сопоставлены со скваланом. Установлен ряд снижения полярности согласно константам Мак-Рейнольдса: *Silicone QF-1*, *Fluorolube 2000*, а затем *Kel-F 90* и *Krytox AC*. Отмечено, что для прогнозирования разделяющей способности фторированных стационарных фаз подход, основанный на определении полярности, в данном случае мало информативен. При использовании таких НПФ гораздо более значимо наличие атомов фтора в молекулах аналитов.

Показано, что из рассмотренных стационарных фаз для анализа соединений с одинаковым числом атомов фтора в составе молекул и отличающихся только температурами кипения наиболее подходит *Kel-F 90* [18]; а для разделения смесей фторированных и нефторированных веществ предпочтительной стационарной фазой является *Krytox AC* [19]. Обнаружено, что при использовании этой фазы присутствие атомов фтора в аналите в наибольшей степени сказывается на изменении индексов удерживания (ИУ), несмотря на наличие каких-либо функциональных групп в определяемом соединении. Так, при введении в молекулу бензола одного атома фтора индексы удерживания на стационарных фазах *Krytox AC*, *Silicone QF-1*, *Kel-F 90* и *Fluorolube 2000* возрастают на 48, 35, 27 и 22 единицы, соответственно.

В [20] проведено сравнение свойств высокофторированных неподвижных фаз PPF-20 (полиперфторфениленовый эфир) и *Fluorad FC-430* (фторалкильный сложный эфир) и сопоставление их характеристик с аналогичными нефторированными стационарными фазами. Установлено, что для фторированной фазы PPF-20 более характерны *протонодонорные* взаимодействия с аналитами, а для PPE-5 (полифениленовый эфир – аналог PPF-20, не содержащий атомов фтора (рис. 2.)) — *протоноакцепторные*, вследствие наличия фенольных гидроксильных групп в полимерной цепи.

Уже на сравнительно ранней стадии развития ГЖХ фторированные неподвижные фазы использовались для анализа смесей летучих фторированных неорганических соединений металлов [21, 22].

В [21] для анализа гексафторида урана в качестве неподвижной фазы применялся политрифторхлорэтилен. Сообщается, что для предотвращения химических реакций между аналитами и неподвижной фазой хроматографическую колонку необходимо было предварительно дезактивировать многократным

пропусканием через нее 0,1 мг газообразного фтора до тех пор, пока отношение высот пиков гексафторида урана и теллура не становилось постоянным. Для исследования разделяющей способности неподвижной фазы в качестве модельной смеси использовали фториды урана, теллура и молибдена. Описаны зависимости ВЭТТ от расхода газа-носителя, температуры колонки, количества НПФ, а также от ее средней молекулярной массы. Показано, что для выполнения указанной задачи оптимальными являются следующие условия: расход газа-носителя 60-70 мл/мин, температура колонки 30°C; стационарная фаза 10% политрифтормонохлорэтилена со средней молекулярной массой 8400. В данных условиях удалось разделить указанные соединения менее, чем за 30 с (рис. 3).

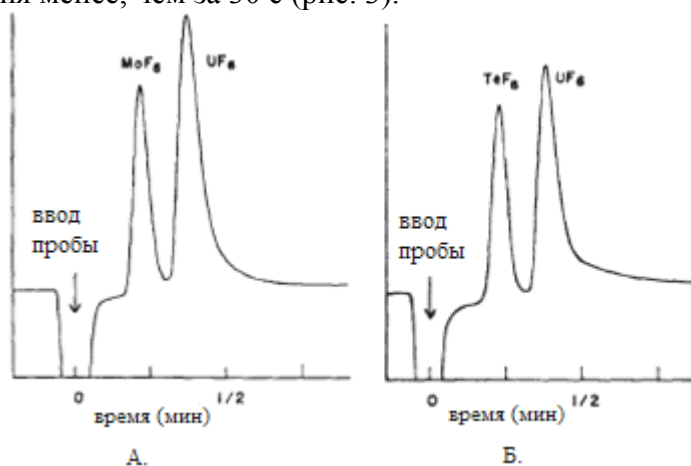


Рис. 3. Разделение гексафторидов молибдена и урана (А) и гексафторидов теллура и урана (Б); стационарная фаза 10% политрифтормонохлорэтилена, температура 32 °С, расход газа-носителя 65 мл/мин [21]

В [22] для промышленного ГЖХ анализа в потоке таких реакционноспособных веществ как трифторид урана, трифторид хлора, фтороводород, монооксид фтора, хлор, его оксиды и фториды, применяли фторированную смазку *Kel-F 40*, нанесенную на твердый высокомолекулярный полимер *Kel-F 300* ввиду химической инертности этих материала по отношению к анализам. Использование подобной колонки позволило разделить все анализаты за 30 мин (рис. 4).

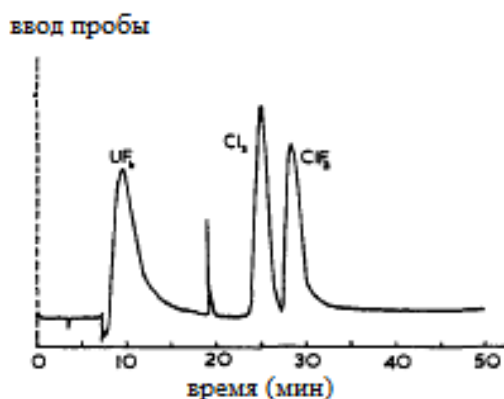


Рис. 4. Хроматограмма смеси гексафторида урана, хлора и его трифторида при использовании описанной колонки [22]

В [23, 24] исследована возможность использования фторированного углерода в качестве неподвижной фазы при газохроматографическом анализе органических

соединений различной природы.

В [23] методом газовой хроматографии изучены свойства поверхности фторуглерода. Определены относительные удерживаемые объемы и индексы удерживания Ковача для широкого набора органических соединений (*алифатические и ароматические углеводороды, спирты, простые и сложные эфиры, карбонильные соединения, нитрилы*). Величины ИУ тестовых соединений сопоставлены с соответствующими величинами для других неполярных гидрофобных НПФ — карбопак и хромосорб 101. На основании ИУ тестовых соединений (*бензол, толуол, пропанол-2, бутанол-1, метилэтилкетон*) сделано заключение, что фторированный углерод по полярности занимает промежуточное положение между указанными НПФ. При этом, согласно общепринятой газохроматографической оценке полярности неподвижных фаз по ИУ, этот сорбционный материал оказался ближе всего к Карбопаку.

Отмечено, что соответствующие величины ИУ на фторуглероде, как и на Карбопаке, оказались меньше, чем на сквалане, который используется в качестве эталонной неподвижной фазы для оценки полярности неподвижных фаз. Полученные образцы фторуглерода выдерживали нагреванием при 523°K в течение 30 ч без изменения хроматографических свойств, разрушения и потери массы. Показано, что фторированный углерод обладает достаточно большой хемо- и термостойкостью, высокой гидрофобностью и химически однородной поверхностью, что позволило авторам рекомендовать фторуглерод в качестве адсорбента для газовой хроматографии.

Установлено, что наличие π -связей или активных функциональных групп (*гидроксильной, эфирной, нитро- или цианогрупп*) в молекулах аналитов, потенциально способных к специфическим взаимодействиям с неподвижной фазой, не вносит заметного вклада в величины адсорбции на фторуглероде. Это свидетельствует о доминирующей роли дисперсионных взаимодействий при хроматографическом удерживании аналитов на фторуглеродной поверхности и отсутствии на ней адсорбционных центров, способных к специфическим (*электростатическим или донорно-акцепторным*) взаимодействиям.

В [24] методом газовой хроматографии исследовались свойства поверхности графита и углеродного волокна, а также продуктов их фторирования. Определены ИУ Ковача насыщенных и ароматических углеводородов, кислород- и азотсодержащих соединений. Установлено, что, независимо от свойств исходной матрицы, фторирование приводит к получению материалов с химически однородной и неполярной поверхностью, удельная площадь которой увеличивается в 200 раз по сравнению с начальным образцом. Фторирование приводит к снижению объемов удерживания всех изученных соединений (*низшие алканы и спирты, бензол, нитрометан, ацетонитрил, диэтиловый эфир*) по отношению к исходной матрице.

Показано, что на фторированном углероде наблюдается более заметное снижение параметров удерживания разветвленных спиртов в сравнении с линейными аналогами, чем на фторированном углеродном волокне, что говорит о снижении числа контактов молекул с поверхностью адсорбента. Высказано предположение, что при фторировании углерода образуется система ультрамикropор, недоступных для молекул с сильно разветвленной структурой углеродного скелета. Такие особенности могли бы обеспечить эффективное применение фторированных материалов для решения задач ГЖХ анализа изомеров в тех случаях, когда необходимы адсорбенты, обладающие высокой гидрофобностью.

В [25] сравнивали различные неподвижные фазы для ГЖХ анализа перфторалканов и их производных. Показано, что перфторированные неподвижные

фазы подходят для разделения широкого круга фторсодержащих соединений, а неподвижная фаза состава $\text{Cl}(\text{CF}_2\text{CFCl})_3\text{CF}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$ может быть рекомендована, в первую очередь, для разделения фторорганических соединений, температуры кипения которых ниже 150°C .

В [26] проводилось сопоставление частично фторированного силикона и перфторпарафина с нефторированными аналогами. Установлено, что полное фторирование углеводородов приводит к резкому снижению избыточной энтропии вращения и небольшому уменьшению теплоты растворения неполярных молекул. Отмечено, что перфторпарафины образуют водородные связи и по полярности близки к углеводородам. Частичное фторированное силиконовое масло не способно образовывать водородные связи с аналитами, но значительно более полярно, чем его нефторированные аналоги.

Фторсодержащие полимеры могут выступать и в роли носителей стационарных фаз в ГХ. Несмотря на большую инертность, фторопласт обладает невысокой механической прочностью, что ограничивает его применение в хроматографии. Для преодоления этого недостатка в [27] была разработана методика модификации фторопласта 4Д. Ранее для повышения механической прочности полимера предполагалось подвергать его термической обработке. Однако при этом происходило трехкратное уменьшение удельной поверхности фторопласта. Поэтому было предложено обрабатывать полимер раствором фторопласта 42, который является кристаллическим низкомолекулярным сополимером тетрафторэтилена с винилиденфторидом. Такой подход, как и ожидалось, привел к увеличению прочности, а снижение поверхности было не столь заметным как при термической обработке. Экспериментально установлено, что оптимально количества фторопласта 42 нанесенное на фторопласт 4Д, составляет 5%.

Подготовка и использование фторсодержащих соединений в жидкостной хроматографии

В [28] для исследования влияния длины перфторированного радикала, привитого к поверхности силикагеля, на параметры удерживания фторированных и не содержащих фтор органических соединений были синтезированы перфторированные неподвижные фазы с поверхностными C_6F_{13} - и C_8F_{17} -группами. Для выявления особенностей этих стационарных фаз использовались в качестве тестовых аналитов 13 ароматических соединений, содержащих как алкильные, так и фторированные радикалы. Установлено, что аналиты, молекулы которых не содержат атомов фтора, слабее взаимодействуют со фторированными стационарными фазами, чем с С-18; наоборот, для фторированных аналитов наблюдается иная тенденция: они сорбируются сильнее на фторированных стационарных фазах.

Характеристики новых НПФ были сопоставлены с коммерческими фторированными НПФ (*Fluophase RP* и *Fluophase PFP*), а также с обращенной фазой С-18. Ароматические соединения с различной длиной боковой цепи лучше всего разделяются на колонке C_8F_{17} ($k'_{(n)}/k'_{(n+2)} = 2,8$), немного хуже на *Fluophase RP* и C_6F_{13} ($k'_{(n)}/k'_{(n+2)} = 2,4$), а С18 ($k'_{(n)}/k'_{(n+2)} = 1,7$) и *Fluophase PFP* ($k'_{(n)}/k'_{(n+2)} = 1,5$) значительно уступают по параметрам разрешения вышеуказанным стационарным фазам [28].

Взаимодействие между атомами фтора разделяемых аналитов и фторированной стационарной фазы становится особенно ощутимым в том случае, когда перфторалкильный радикал НПФ содержит в своем составе более восьми углеродных атомов [28].

В [29] сообщается о приготовлении двух неподвижных фаз действием перфторалкиламиносиланов $(\text{RC}_2\text{H}_4\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, где $\text{R} = \text{C}_8\text{F}_{17}$, $\text{C}_{10}\text{F}_{21}$) на

лихросорбе (Lichrosorb Si 100). Хроматографические свойства этих стационарных фаз изучены с использованием тестовой системы непредельных йод- и фторсодержащих производных углеводородов. Отмечено, что на фторированных неподвижных фазах происходит значительное увеличение параметров удерживания веществ, содержащих фторалкильные радикалы, по сравнению с обращенно-фазовым сорбентом C18 [29].

Возможности практического применения этих НПФ продемонстрированы также на примере разделения двух изомерных форм (α - и β -) поверхностно-активных мальтозидов, содержащих фторированные алкильные радикалы. Показано, что на фторированных стационарных фазах факторы емкости заметно выше, чем на традиционных алкилированных НПФ [29].

Преимущество фторированных стационарных фаз перед углеводородными заключается и в том, что они позволяют разделять как фторированные соединения, так и вещества молекулы которых не содержат атомов фтора.

В [30] обсуждается действие (1,1,2,2-тетрагидроперфтороктил)-триэтоксисилана на частицы кремния в атмосфере сверхкритического CO_2 при 60°C и 450 атм в течение 3 ч для получения стационарной фазы с привитыми C_8F_{17} -группами. Хроматографические колонки с такими неподвижными фазами проявили себя как типичные обращенно-фазовые сорбенты. Подобные материалы использованы и в качестве стационарной фазы в капиллярной электрохроматографии (КЭХ) [30]. Такая НПФ характеризуется высокой эффективностью (~ 154000 т.т./м.). Возможности ее практического применения продемонстрированы на примере разделения смеси β -блокаторов (*кетопрофен, напроксен, фентопрофен, ибупрофен*), которые удалось разделить менее, чем за 3 мин (Рис. 5).

В [31] и [32] в качестве фторированной стационарной фазы использовали поли(метил-3,3,3-трифторпропилсилоксановый) полимер, иммобилизованный на силикагеле. На подготовленных стационарных фазах разделению подвергались смеси, содержащие урацил, 1,2-дифенилбензол, трифенилена, бутилбензол, пентилбензол, фенол, кофеин и бензиламин. Проведена количественная оценка гидрофобности и ионообменной емкости [31]. Полимер наносили на силикагель и выдерживали в течение 12 ч при температуре 200°C с целью иммобилизации на поверхности носителя.

В отличие от фазы C-18, на фторированной НПФ удалось разделить позиционные изомеры дифторфенолов.

В [32] иммобилизация поли(метил-3,3,3-трифторпропилсилоксанового) полимера к поверхности силикагеля осуществлялась под действием микроволнового облучения в течение 50 мин.

На основании полученных данных установлено, что синтезированная НПФ имеет гидрофобный характер, а взаимодействия между основными соединениями и остаточными силанольными группами носителя достаточно малы [32]. НПФ с трифторметильными группами может оказаться весьма перспективной при анализе смесей высоко основных лекарственных препаратов, а приготовление стационарной фазы с помощью микроволнового излучения быстрее, проще и дешевле, чем при использовании классических методов [32].

В [33] исследовали два образца фторированного стеклоглерода в качестве НПФ для жидкостной хроматографии. Образцы фторированного стеклоглерода синтезировали медленным нагреванием циркониевых частиц, инкапсулированных олигомером 1,3-(дибутадиин-1,3)-тетрафторфенилена при температурах 200 и 400°C . Установлено, что нагревание до 200°C приводит к образованию фторированного стеклоглерода с массовой долей фтора 34% (*перфторированный стеклоглерод*), в

то время как нагревание до 400°C – к 16% содержанию фтора (*фторированный стеклоуглерод*). На этих НПФ изучалось поведение смеси 30 органических соединений различных классов с известными молекулярными дескрипторами, входящими в основное уравнение сольватации, которое служит для оценки полярности и селективности выбранной системы *элюент – неподвижная фаза*.

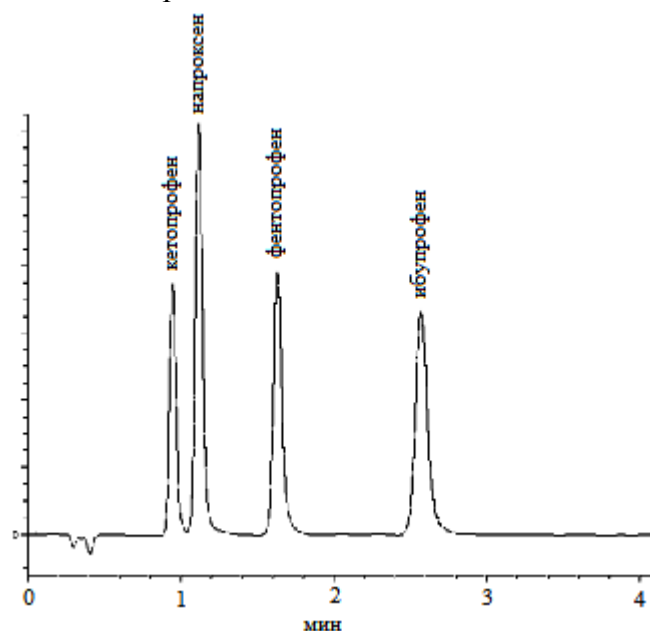


Рис. 5. Хроматограмма смеси кетопрофена, напроксена, фентопрофена и ибупрофена. Колонка: 100мм x 4,6мм, размер частиц 3 мкм; подвижная фаза: ацетонитрил – KH_2PO_4 (25:75 по объему), 2 мл/мин [30]

Такой подход позволил показать, что перфторированный стеклоуглерод по характеру взаимодействий аналита со стационарной фазой аналогичен октадецилполисилоксановой НПФ, а фторированный — графитированной саже.

В [34] сообщается о применении неподвижной фазы, полученной действием (1,1,2,2,3,3-гексагидроперфтор-4,4-диметилгептил)диметилхлорсилана на силикагель, для определения нуклеиновых кислот.

В обращенно-фазовом варианте проведен анализ олигоаденилатов, содержащих до 30 звеньев, с использованием градиентного элюирования (вода-ацетонитрил). Хроматографическое разделение подобных смесей проводилось и раньше. Преимущество применения фторированной стационарной фазы перед традиционными НПФ заключается в том, что анализ можно проводить при высоком содержании воды в подвижной фазе, что сокращает продолжительность анализа, а также в том, что для регенерации колонки не требуется ее кондиционирование метанолом.

Использование фторированных стационарных фаз в ВЭЖХ

В ВЭЖХ наиболее популярными являются колонки, заполненные силикагелем с привитыми перфторфенильными или перфтороктильными группами. Последние используются чаще и выпускаются под марками Fluofix, FluoroSep RP Octyl и FluoroFlash. Они зарекомендовали себя при разделении перфторированных кислот [1], аминокислот [12,13], пептидов [12,13], сульфонамидов [12], алкилфенонов [12], неионных ПАВ [35], ароматических соединений [36], липидов и фосфолипидов [30].

В [1] предложен универсальный метод разделения и детектирования

перфторированных кислот и их предшественников методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием с использованием НПФ FluoroSep RP Octyl, содержащей неразветвленные перфтороктильные радикалы. Наличие атомов фтора на поверхности стационарной фазы способствовало росту эффективности при определении различных перфторированных органических соединений по сравнению с традиционными НПФ. Благодаря этому удалось разделить изомеры перфторсульфонамидов, перфторалкилкарбоксилатов и перфторгексансульфонатов.

В [12] описано применение стационарной фазы с иммобилизованными C_8F_{17} -группами для разделения аминокислот, пептидов и сульфонамидов методом мицеллярной жидкостной хроматографии (МЖХ). В качестве мицеллообразователя применялся анионный детергент – додецилсульфат натрия. При использовании фторированной НПФ эффективность разделения смесей аминокислот, пептидов и сульфонамидов по сравнению с колонкой C-18 увеличилась почти в два раза, сократилось время анализа, а факторы удерживания сульфонамидов возросли. Для гидрофобных соединений отмечено снижение времени анализа, а для гидрофильных, наоборот, – увеличение.

В [37] обсуждаются достоинства фторированных НПФ в МЖХ с использованием катионного ПАВ в качестве мицеллообразователя. Получены сравнительные характеристики параметров удерживания замещенных фенолов на перфтороктильной НПФ и обращенной фазе C-18. Установлено, что производные фенолов, молекулы которых содержат циано-, нитро- и карбонильную группы, сильнее удерживаются на фторированной НПФ, за счет специфических взаимодействий между аналитами и фторированными радикалами на поверхности силикагеля. Производные алкилзамещенные фенолы на фторированных колонках удерживаются слабее, чем на обращенной фазе C-18 вследствие отсутствия специфических взаимодействий со стационарной фазой.

В [35] впервые для анализа изомерных октилфенолэтоксилатных ПАВ неионной природы использовали фторированные НПФ *Fluofix* 120E и 120N (первая обработанная триметилсиланом, а вторая — нет). Установлено, что на стационарной фазе *Fluofix* 120E факторы удерживания аналитов значительно выше, чем на *Fluofix* 120N, кроме того НПФ, необработанная триметилсиланом, характеризуется меньшим размытием аналитических сигналов.

В [36] проведено сравнение аналитических характеристик коммерческой колонки *Fluofix* (C_8F_{15}) с обращенной фазой C8 при разделении смесей ароматических углеводов. Установлено, что при высоком содержании метанола в подвижной фазе (> 80%) порядок элюирования ароматических соединений на фторированной НПФ обращается: чем больше молекулярная масса аналита, тем раньше он элюируется.

Такое явление объясняется тем, что для фторированной стационарной фазы при увеличении концентрации метанола от 50 до 80% величина температуры, при которой энтропийные факторы начинают превалировать над энтальпийными, снижается с 484 °К до 294 °К, чего не наблюдается в случае колонки с углеводородной фазой. Это приводит к тому, что при работе со фторированной НПФ изменяется и механизм разделения.

В [11] проводилось разделение природных соединений с использованием фторированной НПФ *Fluofix*, позволяющей разделять большое число липидов, включая фосфолипиды, холестерин и продукты их разложения. При использовании фторированной стационарной фазы наблюдается снижение времен удерживания по сравнению с колонкой C-18. Установлено, что наличие специфических

взаимодействий аналитов со фторированной НПФ обеспечивает разделение таких близких по структуре изомеров как холестерин (холест-5-ен-3 β -ол) и латостерол (холест-7-ен-3 β -ол). При градиентном элюировании были разделены лизофосфатидилхолин 1 и 2, пальмитиновая кислота, гидрохолестерол, десмоesterol, кетохолестерин, фосфогликолипиды.

Показано, что хроматографические свойства обсуждаемой стационарной фазы не могут быть объяснены простым гидрофобным механизмом: в процессе разделения большую роль играют и специфические взаимодействия аналитов со фторированной НПФ.

В [13] исследовалось разделение малофторированных и соответствующих нефторированных аминокислот и пептидов на обращенной (C8) и соответствующей фторированной (C₈F₁₇) неподвижных фазах. Установлено, что в случае последней целесообразно в качестве элюирующих систем применять этиловый и изопропиловый спирт, и, наоборот, в случае углеводородной НПФ себя хорошо зарекомендовали фторированные элюенты (трифторэтиловый и гексафторизопропиловый спирт). Природа элюента оказывает большее влияние на результаты анализа, нежели природа неподвижной фазы. При разделении аминокислот и пептидов на стационарной фазе C8 со фторированным элюентом (*трифторэтанол-вода*) разница времен удерживания фторированных аминокислот и аналогичных нефторированных более выражена, чем при использовании фторированной колонки и нефторированного элюента. Другая, достаточно востребованная в ВЭЖХ НПФ, – силикагель с привитыми перфторфенильными группами.

В [16] проводилось сопоставление НПФ C18 и *Fluorophase* (C₆F₅-); в качестве элюентов применялись водные растворы метанола, ацетонитрила и трифторэтанола. Тестовая смесь состояла из 60 веществ различной природы с известными молекулярными дескрипторами. Наиболее интересные результаты были получены при использовании трифторэтанола в сочетании со фторированной колонкой. Применение молекулярных дескрипторов помогло установить, что соединения, обладающие «кислыми» атомами водорода, удерживаются значительно слабее на этой фазе, чем на нефторированных, а соединения основной природы – сильнее. Была выдвинута гипотеза: обнаруженная селективность является следствием специфической адсорбции молекул трифторэтанола на фторированной стационарной фазе (за счет наличия трифторметильной группы), что, в свою очередь, приводит к увеличению удерживания Н-оснований и ослаблению удерживания Н-кислот.

В [14] сообщается о разделении четырех токоферолов (витамин Е) методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием фторированной НПФ, содержащей пентафторфенильные радикалы, привитые к поверхности силикагеля. Применение традиционных стационарных фаз, не содержащих атомов фтора, позволяет провести разделение токоферолов только в нормально-фазовом режиме. В обращенно-фазовом – не удастся разделить все токоферолы, а продолжительность анализа составляла до 50 мин.

Биологическая активность β , γ -изомеров токоферолов различается в 5 раз, поэтому их количественное определение принципиально в различных фармацевтических препаратах. В [14] проведена оптимизация условий разделения токоферолов. Использование фторированной НПФ помогло сократить время анализа до 20 мин и осуществить полное разделение α -, β -, γ -, и δ -изомеров токоферолов в природных объектах (природный витамин Е, соевое масло).

В [15] пентафторфенилпропиловая НПФ была использована для разделения эфедриновых алкалоидов и синэфедрина (рис. 6). Обнаружение линейного

соотношения между факторами удерживания аналитов и концентрацией ацетата аммония в подвижной фазе позволило легко оптимизировать селективность разделения. Отмечено увеличение факторов удерживания при росте температуры; для ОФ ВЭЖХ обычно наблюдается противоположный эффект. Выдвинута гипотеза, что это явление связано с уменьшением сольватации аналитов и, как следствие, усилением их взаимодействия со стационарной фазой.

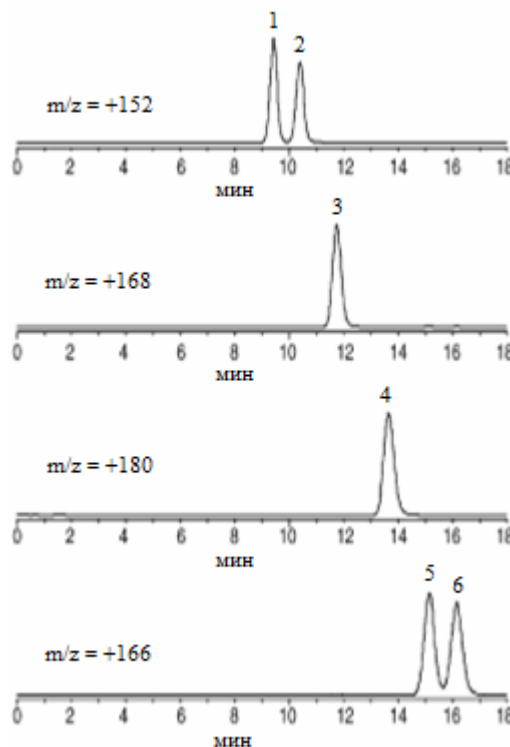


Рис. 6. Разделение норэфедрина (1), норпсевдоэфедрина (2), синефрина (3), метилэфедрина (4), эфедрина (5) и псевдоэфедрина на пентафторвенильной НПФ, 150 мм x 4,6мм, 5 мкм. Элюент: 4 мМ ацетата аммония, 90:10 (по объему) ацетонитрил:вода, 1 мл/мин, 45°С [15], детектирование: МС с электроспреем в режиме положительно заряженных ионов

В [38] проведена оптимизация условий разделения модельной смеси 15 таксанов (дитерпены, продуцируемые растениями рода *тис*) на 5 различных фторированных стационарных фазах (два образца линейного перфторгексил с удельной поверхностью 115 и 332 м²/г, разветвленный пропилперфторгексил, перфторпропилфенол и пентафторфенил) и С-8 с использованием элюирующей системы вода-ацетонитрил. Показано, что увеличение содержания ацетонитрила в подвижной фазе приводит к снижению факторов удерживания таксанов для всех исследованных НПФ, причем для таксанов, содержащих фрагменты ксилозы, это снижение наиболее значительно.

Установлено, что температура колонки может оказывать значительное влияние на удерживание и селективность разделения при содержании ацетонитрила в подвижной фазе более 40%. Причем, если разделение проводится на колонке С-18, то, в зависимости от температуры, порядок элюирования аналитов может изменяться. При использовании фторированных НПФ температурный эффект проявляется значительно слабее, характер элюирования таксанов практически не меняется. Слабое удерживание гидрированных соединений на фторированных фазах позволяет работать при более низких концентрациях органического растворителя без

значительного увеличения времени анализа. Влияние температуры в этом случае пренебрежимо мало. Из сказанного следует, что для анализа подобных соединений предпочтительно использование фторированных стационарных фаз.

Фторированные органические соединения как добавки к подвижным фазам и буферным электролитам

Фторированные соединения могут выступать не только в роли элюентов и неподвижных фаз, но и в качестве добавок к подвижным фазам.

Так, в [17] изучена возможность разделения β -блокаторов при добавлении в элюент перфторированных кислот (трифторуксусная, пентафторпропионовая, гептафтормасляная кислота (ГФМК)) в качестве ион-парных агентов.

Установлено, что замена уксусной кислоты в подвижной фазе фторированными кислотами приводит к заметному увеличению факторов удерживания аналитов и повышению симметрии хроматографических пиков. При увеличении длины цепи перфторированного радикала кислоты растут факторы удерживания аналитов, а также наблюдается увеличение эффективности. Максимальная эффективность при минимальных значениях факторов асимметрии была достигнута при использовании ГФМК.

Основываясь на полученных результатах, авторы считают, что в будущем перфторированные кислоты могут вытеснить другие ион-парные агенты и ионные жидкости, которые используют при разделении основных соединений в ВЭЖХ.

В [39] для снижения адсорбции протеинов на стенках капилляров при капиллярном зонном электрофорезе использовали поверхностно-активное вещество FC-135 (рис. 7). Установлено, что оптимальное для разделения значения pH буферного электролита равно 7, т.к. при более низких величинах pH падает эффективность и возрастает вероятность денатурации белков.

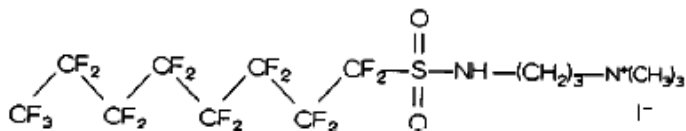


Рис. 7. Структура FC-135

С помощью модельной смеси, состоящей из мезитилоксида, α -химотрипсиногена, рибонуклеазы А, цитохрома С и лизоцима изучена разделяющая способность системы. Достигнута эффективность более 120 000 т.т./м. Попытки разделить указанную смесь без использования ПАВ не привели к успеху: на электрофореграмме регистрировался лишь один аналитический сигнал. Таким образом, показано, что применение фторированного ПАВ позволяет существенно улучшить разделяющую способность капиллярного зонного электрофореза при анализе протеинов.

Фторорганические соединения в капиллярном электрофорезе и капиллярной электрохроматографии

В [40] сообщается о синтезе монолитной стационарной фазы для капиллярной электрохроматографии путем сополимеризации трифторэтилметакрилата и диметакрилата. Установлено, что при увеличении pH от 4 до 7 происходит рост электроосмотической подвижности от 1,4 до 2,8 м²/В*с. Авторы объясняют это явление увеличением ионной силы из-за адсорбции ионных компонентов фонового электролита.

Для изучения разделяющей способности полученной НПФ использовали смеси, содержащие производные бензола, фенола, анилина и бензойной кислоты. Разделение компонентов таких смесей достигалось при содержании ацетонитрила в подвижной фазе от 60 до 70% (рис. 8). Варьировалось напряжение от 10 до 30 кВ: при 30 кВ время анализа составило менее 4 мин, а при 10 кВ — 15 мин. На примере производных фенола показано, что эффективность полученной колонки может достигать 220 000 т.т./м.

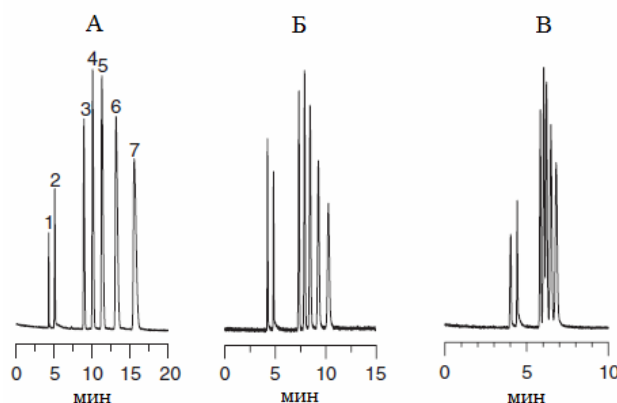


Рис. 8. Влияния состава элюента на разделение смеси: тиомочевина (1), фенол (2), бензол (3), толуол (4), этилбензол (5), пропилбензол (6) и бутилбензол (7). Элюент ацетонитрил:буферный раствор (5 мМ фосфатный буферный раствор, рН 7,2): 60:40 (А), 70:30 (Б), 80:20 (В) (по объему) [40]

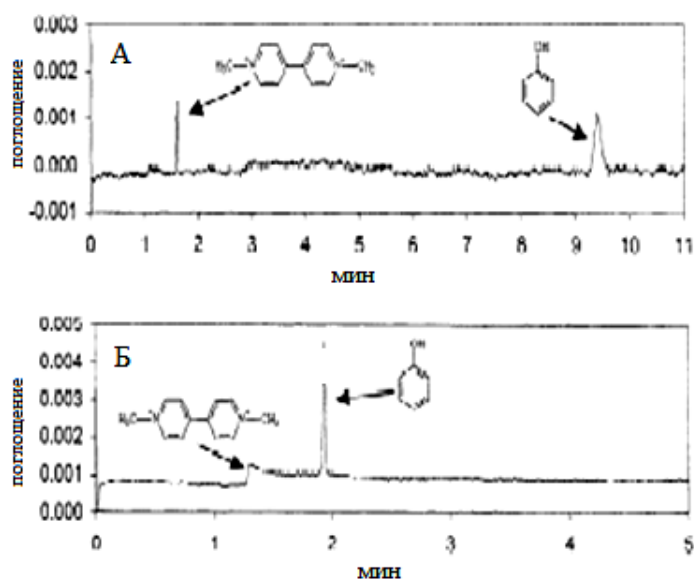


Рис. 9. Электрофореграмма смеси метилвиологена и фенола в фторированном капилляре (А) и в кварцевом капилляре (Б) [41]

Фторированные полимеры находят применение и в капиллярном зонном электрофорезе. В [41] приготовлен капилляр на основе фторированного сополимера этилена с пропиленом. Этот материал подходит для оптического детектирования во всем диапазоне, кроме длин волн близких к 200 нм.

При увеличении рН элюента от 4 до 8 электроосмотический поток (ЭОП) возрастает в 3 раза. В качестве модельной смеси использовали метилвиологен и фенол, т.к. они поглощают излучение в области 200-300 нм; метилвиологен имеет заряд +2 и должен заметно взаимодействовать с отрицательно заряженными

стенками кварцевого капилляра; фенол при условиях эксперимента нейтрален и служит в качестве маркера ЭОП. Показано, что при электрофоретическом разделении этой смеси во фторированном этиленпропиленовом капилляре, эффективность для метилвиологена составляет 55300 т.т./м, а для фенола – 22500 т.т./м (рис. 9).

Заключение

Рассмотрены основные возможности применения фторорганических соединений в газовой и жидкостной хроматографии, а также в капиллярном электрофорезе. По таким параметрам как эффективность и время анализа существующие фторированные НПФ не уступают стандартным стационарным фазам C8 и C18.

Фторорганические соединения хорошо себя зарекомендовали в качестве элюентов и добавок к ним. Использование фторированных капилляров в капиллярном электрофорезе позволяет увеличить эффективность при разделении положительно заряженных аналитов.

Авторы выражают свою признательность д.х.н. Баскину З.Л. за проявленный интерес и советы к данной публикации

Список литературы

1. J. P. Benskin, M. Bataineh, J. W. Martin. Simultaneous characterization of perfluoroalkyl carboxylate, sulfonate, and sulfonamide isomers by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Anal. Chem.*, 2007, V. 79, P. 6455-6464.
2. B. J. Stockman. 2-Fluoro-ATP as a Versatile Tool for ¹⁹F NMR-based Activity Screening // *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, V. 130, P. 5870-5871.
3. Clark, L. C., Jr. Gollan. Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at a atmospheric pressure // *F. Science*, V. 152, P. 1966, 1755-1756.
4. S. Purser, P.M. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur. Fluorine in medicinal chemistry // *Chem. Soc. Rev.*, 2008, V. 37, P. 320–330.
5. Riess J. G., Le Blanc M. Solubility and transport phenomena in perfluorochemicals relevant to blood substitution and other biomedical applications // *Pure Appl. Chem.*, 1982, V. 54, P. 2383-2406.
6. K. Müller, C. Faeh, F. Diederich. Fluorine in pharmaceuticals: Looking beyond intuition // *Science* 2007, V. 317, P. 1881-1886.
7. Horváth, I. T. Solvents from nature // *Green Chem.*, 2008, V. 10, P. 1024–1028.
8. Brittain S.M., Ficarro S.B., Brock A., Peters E.C. Enrichment and analysis of peptide subsets using fluorous affinity tags and mass spectrometry // *Nat Biotechnol*, 2005, V. 23, P. 463-468.
9. Lehmler H.-J. Perfluorocarbon compounds as vehicles for pulmonary drug delivery // *Expert Opin Drug Deliv.*, 2007, V.4, P. 247-262.
10. D. O'Hagan, D. B. Harper. Fluorine-containing natural products // *J. Fluorine Chem.*, 1999, V. 100, P. 127–133.
11. I. De Miguel, A. Roueche, D. Betbeder. Separation of dipalmitoyl phosphatidyl choline, cholesterol and their degradation products by high-performance liquid chromatography on a perfluorinated stationary bonded phase // *J. Chromatogr. A*, 1999, V.

840, P. 31-38.

12. S. Yang, L.F. Resotoko Kruk, M.G. Khaledi. Fluorinated bonded stationary phases in micellar liquid chromatography // *Journal of Chromatography A*, 1994, V. 664, P. 1-11.

13. N. Xiao, Y. B. Yu. Separation of fluorinated amino acids and oligopeptides from their non-fluorinated counterparts using high-performance liquid chromatography // *Journal of Fluorine Chemistry*, 2010, V. 13, P. 439-445.

14. S.L. Richeimer, M.C. Kent, M.W. Bernart. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method using a pentafluorophenyl bonded phase for analysis of tocopherols // *J. Chromatogr. A*, 1994, V. 667, P. 75-80.

15. D.S. Bell, H.M. Cramer, A.D. Jones. Rational method development strategies on a fluorinated liquid chromatography stationary phase: mobile phase ion concentration and temperature effects on the separation of ephedrine alkaloids // *Journal of Chromatography A*, 2005, V. 1095, P. 113-118.

16. K. Valko, S. Espinosa, C.M. Du, E. Bosch, M. Roses, C. Bevan, M.H. Abraham. Unique selectivity of perfluorinated stationary phases with 2,2,2-trifluoroethanol as organic mobile phase modifier // *J. Chromatogr. A*, 2001, V. 933, P. 73-81.

17. J. Fliieger. Application of perfluorinated acids as ion-pairing reagents for reversed-phase chromatography and retention-hydrophobicity relationships studies of selected β -blockers // *J. Chromatogr. A*, 2010, V. 1217, P. 540-549.

18. F. Vernona and G.T. Edwardsa. Gas-liquid chromatography on fluorinated stationary phases: I. Hydrocarbons and fluorocarbons // *Journal of Chromatography A*, 1975, V. 110, P. 73-80.

19. F. Vernona and G.T. Edwardsa. Gas-liquid chromatography on fluorinated stationary phases: II. Fluorinated compounds containing a functional group // *Journal of Chromatography A*, 1975, V. 114, P. 87-93.

20. R. M. Pomavillea, C. F. Poole. Thermally stable, highly fluorinated stationary phases for gas chromatography // *Analytica Chimica Acta*, 1987, V. 200, P. 151-169.

21. H. Shinohara, N. Asakura, S. Tsujimora. Gas Chromatographic Characteristics of Polytrifluoromonoethylenecolumns as applied to Analysis of Uranium Hexafluoride and other Volatile Inorganic Fluorides // *Journal of nuclear science and Tech.*, 1966, V. 3, P. 373-378.

22. A.G. Hamlin, G. Iveson, T.R. Phillips. Analysis of volatile inorganic fluorides by gas-liquid chromatography // *Anal. Chem.* 1963, № 56, P. 2037-2040.

23. Т. М. Рощина, С. В. Глазкова, А. Д. Хрычева. Газохроматографическое исследование свойств поверхности фторированного углерода // *Вестн. Моск. Ун-та. Серия 2. Химия*, 2005, Т. 46, №1, С. 29-33.

24. Т. М. Рощина, С. В. Глазкова, А. Д. Хрычева, В.Г. Макотченко, М. Л. Пантюхин. Исследование влияния фторирования на свойства поверхности углеродных материалов методом газовой хроматографии // *Вестн. Моск. Ун-та. Серия 2. Химия*, 2007, Т. 48, №2, С. 80-85.

25. T.M. Reed III. Gas-Liquid Partition Chromatography of Fluorocarbons // *Anal. Chem.*, 1958, V. 30, P. 221-228.

26. А.Н. Король, В.М. Сахаров. К вопросу избирательности фторсодержащих неподвижных фаз в газовой хроматографии // *Газовая хроматография*, 1967, вып. 7, С. 39-47.

27. В.В. Бражников, Л.И. Мосева, К.И. Сакодынский, В.А. Сокольский. Модифицированный фторопластовый носитель // *Газовая хроматография*, 1969, вып. 8, С. 80-85.

28. H. Glatz, C. Blay, H. Engelhardt, W. Bannwarth. New fluorous reversed phase silica gels for HPLC separations of perfluorinated compounds // *Chromatographia*, 2004, 59, №

9/10, P. 567-570.

29. M. P. Krafft, Fr. Jeannaux, M. Le Blanc, J. G. Riess, A. Berthod. Highly fluorinated stationary phases for analysis of polyfluorinated solutes by reversed-phase high-performance liquid chromatography // *Anal. Chem.*, 1988, 60 (18), P. 1969–1972.

30. L. O. Healy, V. P. Owens, T. O'Mahony, S. Srijaranai, J. D. Holmes, J. D. Glennon. Supercritical fluid generated stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography // *Anal. Chem.*, 2003, V. 75, P. 5860-5869.

31. L. Maldaner, I.C.S.F. Jardim. A new thermally immobilized fluorinated stationary phase for RP-HPLC // *J. Spec. Sci.*, 2010, V.33, P. 174-181.

32. L. Maldaner, I.C.S.F. Jardim. Preparation and characterization of a microwave-immobilized fluorinated stationary phase for RP-LC // *Chromatographia*, 2010, V. 72, P. 617-626.

33. J. W. Shearer, L. Ding, S. V. Olesik. Solvation parameter models for retention on perfluorinated and fluorinated low temperature glassy carbon stationary phases in reversed-phase liquid chromatography // *Journal of Chromatography A*, 2007, V. 1141, P. 73-80.

34. H. Itoh, T. Kinoshita, N. Nimura. High-performance liquid chromatographic separation of nucleic acids on a fluorocarbon-bonded silica gel column // *J. Chromatogr. A*, 1994, V. 662, P. 95-99.

35. T. Kamiyuki, T. Monde, F. Nemoto, T. Konakahara, Y. Takahashi. Separation and characterization of octylphenol ethoxylate surfactants used by reversed-phase high-performance liquid chromatography on branched fluorinated silica gel columns // *J. Chromatogr. A*, 1999, V. 852, P. 475-485.

36. F.M. Yamamoto, S. Rokushika. Retention properties of the fluorinated bonded phase on liquid chromatography of aromatic hydrocarbons // *J. Chromatogr. A*, 2000, V. 898, P. 141-151.

37. S. Yang, M. G. Khaledi. Stationary phase effects on retention behavior of phenols in micellar liquid chromatography: perfluorooctane vs. C18 // *Analytica Chimica Acta*, 1994, V. 294, P. 135-143.

38. R. Dolfinger, D.C. Locke. Dependence of selectivity on eluent composition and temperature in the HPLC separations of taxanes using fluorinated and hydrocarbon phases // 2003, *Anal. Chem.*, V. 75, P. 1355-1364.

39. W.G.H.M. Muijselaar, C.H.M.M. De Bruijn, F.M. Everaerts. Capillary zone electrophoresis of proteins with a dynamic surfactant coating // *J. Of Chromatogr.*, 1992, V. 605, P. 115-123.

40. A. Yurtsever, B. Saracoglu, A. Tuncel. CEC with new monolithic stationary phase based on a fluorinated monomer, trifluoroethyl metacrylate // *Electrophoresis*, 2009, V.30, P. 589-598.

41. E. Sahlin, S. G. Weber. Capillary zone electrophoresis in laboratory-made fluorinated ethylene propylene capillaries // *Journal of Chromatography A*, 2002, V. 972, №2, P. 283-287.

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

Найден Святослав Владимирович - аспирант кафедры аналитической химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург

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

Nayden Svyatoslav V. - the post-graduate student of analytical chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, St. Petersburg