



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544.5:544.722.1

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11561

Обращенно-фазовая ВЭЖХ на «мономерных» обращенных фазах: факторы, определяющие удерживание сорбатов

Виктор Иванович Дейнека^{1✉}, Елена Юрьевна Олейниц¹,
Владимир Федорович Селеменев², Татьяна Викторовна Елисеева²

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия, deineka@bsu.edu.ru[✉]

²Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Аннотация. В кратком обзоре рассмотрены варианты характеристики «мономерных» обращенных фаз, направленные на понимание типов взаимодействий, определяющих удерживание сорбатов в жидкостной хроматографии. Рассмотрены имеющие отношение к оценке дисперсионных взаимодействий традиционные точечные (определенные при одном заданном составе подвижной фазы) методы определения удерживающей способности, гидрофобности (как метиленовой селективности); показаны их преимущества и недостатки и предложен в качестве альтернативы вариант использования карт разделения веществ по методу анализа относительного удерживания. Обращено внимание на то, что в реальных обращенно-фазовых сорбентах плотность прививки алкильных цепей в два раза менее плотная по сравнению с твердыми *n*-алканами. В таком случае молекулы сорбатов могут проникать внутрь привитой фазы, и такое проникновение зависит от формы молекул. Следовательно, обычные «мономерные» обращенные фазы имеют специфическую селективность по отношению к удерживанию ряда веществ с особым строением. Показано, что в литературе не уделяется достаточного внимания к различию в механизмах удерживания веществ: абсорбционного или адсорбционного, хотя в этих механизмах перво-степенное значение имеют различные параметры. Более того, в двух наиболее часто применяемых в настоящее время очень интересных и информативных методах - методе линейных соотношений между энергиями сольватации (LSERs) и в гидрофобно-разностной модели (*The hydrophobic-subtraction model*) этой характеристике не уделено должного внимания. В методе линейных соотношений не дифференцированы сорбаты, удерживающиеся по различным механизмам (абсорбции или адсорбции), и получаемые заметные различия между расчетными и экспериментальными данными не удивительны. При этом интерпретация результатов анализа по методу LSERs осложнена неопределенностью доли в энергии сольватации сорбатов парциальных свойств в подвижной и в стационарной фазах, поскольку рассчитывается только их разность. Впрочем, сопоставление различных колонок в одних и тех же подвижных фазах может быть достаточно информативным. Недостатком второго подхода является не только требование использования нескольких колонок, но и требование значительных качественных различий между удерживанием сорбатов на них. Кроме того, вызывает сомнение возможность разложения всех взаимодействий на характеристические типы, поскольку в методе не используются никакие ортогональные (не зависящие от применяемого расчета) свойства сорбатов.

Ключевые слова: обращенно-фазовые колонки, строение «мономерных» фаз, характеристика колонок, метод линейных соотношений между энергиями сольватации, гидрофобно-разностная модель.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект FZGU-2023-0009.

Для цитирования: Дейнека В.И., Олейниц Е.Ю., Селеменев В.Ф., Елисеева Т.В. Обращенно-фазовая ВЭЖХ на «мономерных» обращенных фазах: факторы, определяющие удерживание сорбатов // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2023. Т. 23, № 4. С. 514-528. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11561>



Original article

Reversed-phase HPLC on the “monomeric” reversed phases: factors determining the retention of sorbates

Viktor I. Deineka^{1✉}, Elena Yu. Oleinits¹, Vladimir F. Selemenev², Tatyana V. Eliseeva²

¹Belgorod State University, Belgorod, Russia, deineka@bsu.edu.ru[✉]

²Voronezh State University, Voronezh, Russia

Abstract. This brief review discusses options for the characterization of “monomeric” reverse phases aimed at understanding the types of interactions that determine the retention of sorbates in liquid chromatography. Traditional point (determined at one certain composition of the mobile phase) methods for determining the retention capacity, hydrophobicity (as methylene selectivity) relevant to the assessment of dispersion interactions are considered; their advantages and disadvantages are shown and the option of using substance separation maps based on the relative retention analysis method was proposed as an alternative. Attention was drawn to the fact that in real reverse-phase sorbents the density of grafting of alkyl chains is two times less dense compared to solid *n*-alkanes. In this case, sorbate molecules can penetrate into the grafted phase, and such penetration depends on the shape of the molecules. Consequently, conventional “monomer” reverse phases have a specific selectivity with respect to the retention of a number of substances with a special structure. It has been shown that modern methods of analysis do not pay enough attention to the difference in the mechanisms of retention of substances: absorption or adsorption, although different parameters are important for these mechanisms. Moreover, attention to this characteristic is not paid in the two most frequently used now very interesting and informative methods - the linear solvation energy relationships (LSERs) and the hydrophobic-subtraction model. The linear solvation energy relationships method does not differentiate between sorbates retained by different mechanisms (absorption or adsorption), and the resulting noticeable differences between calculated and experimental data are not surprising. At the same time, interpretation of the analysis results using the LSERs is complicated by the uncertainty of the contribution of sorbates of partial properties in the mobile and stationary phases to the solvation energy, since only their difference is calculated. However, comparison of different columns in the same mobile phases can be quite informative. The disadvantage of the second approach is not only the requirement to use several columns, but also the requirement of significant qualitative differences between the retention of sorbates on them. In addition, the possibility of decomposing all interactions into characteristic types is questionable, since the method does not use any of the orthogonal (independent of the calculation used) properties of sorbates.

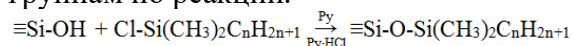
Keywords: reversed-phase columns, structure of “monomeric” phases, characterization of columns, linear solvation energy relationships, hydrophobic-subtraction model.

Acknowledgments: the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of state order to higher education institutions in the sphere of scientific research for 2023-2025, project FZGU-2023-0009.

For citation: Deineka V.I., Oleinits E.Yu., Selemenev V.F., Eliseeva T.V. Reversed-phase HPLC on the “monomeric” reversed phases: factors determining the retention of sorbates. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy*. 2023. 23(4): 514-528. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11561>

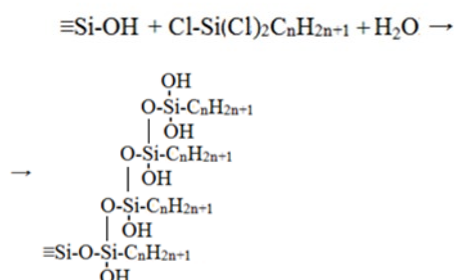
Введение

Обращенно-фазовыми сорбентами назвали первично нормально-фазовые силикагели, поверхность которых была дериватизирована силилированием алкилдиметилхлорсиланом [1] за счет ковалентного связывания по силанольным группам по реакции:



Указанная схема соответствует приготовлению так называемых «мономерных» обращенных фаз. Кроме «мономерных» существуют технологии получения «полимерных» обращенных фаз, из которых наиболее известен и широко используется вариант «вертикальных полимерных» фаз, получаемых с использованием силанов с тремя гидролизуемыми группами. При этом в «вертикальных полимерных» фазах вначале проводят конден-

сацию между молекулами алкилтрихлорсиланов, а затем полученный продукт иммобилизируется на сорбенте:



Такие фазы в значительной мере отличаются от «мономерных» и имеют принципиально иную селективность [2].

При анализе структуры и свойств «мономерных» обращенно-фазовых сорбентов следует учесть, что количество силанольных групп на поверхности полностью гидроксильированного силикагеля равно примерно 4.8 групп на nm^2 (правило Журавлева-Киселева [3]). При этом вследствие наличия в прививаемой молекуле двух метильных групп у атома кремния силилирующего агента возникают стерические препятствия, позволяющие дериватизировать не более половины поверхностных силанольных групп [1]. Простой анализ [4] показывает, что в таких фазах плотность привитых алкильных групп оказывается примерно вдвое меньше, чем для n -алканов в твердой фазе. Следовательно, пространство между привитыми радикалами может

быть заполнено компонентами подвижной фазы или использовано сорбатами для проникновения вглубь такого слоя, обеспечивая распределительный механизм удерживания [5, 6].

С другой стороны, высоко гидрофильные соединения могут удерживаться и по адсорбционному механизму, оказываясь на поверхности стационарной фазы, если они не способны вытеснить из объема заполнившие просветы между привитыми алкильными радикалами молекул органического модификатора. Отметим, что изначально именно адсорбционный механизм удерживания был предложен в качестве первого механизма удерживания в обращенно-фазовой ВЭЖХ под названием механизм гидрофобного выталкивания [7].

Таким образом, удерживание в обращенно-фазовой ВЭЖХ возможно по двум принципиально различающимся механизмам удерживания – по абсорбционному и по адсорбционному типам. Кроме того, возможен и гибридный механизм, названный «поплавочным», в котором часть молекулы проникает внутрь привитой фазы, а гидрофильная часть остается на поверхности стационарной фазы [8], рис. 1.

Различить указанные механизмы по хроматографическому поведению веществ на одной стационарной фазе невоз-

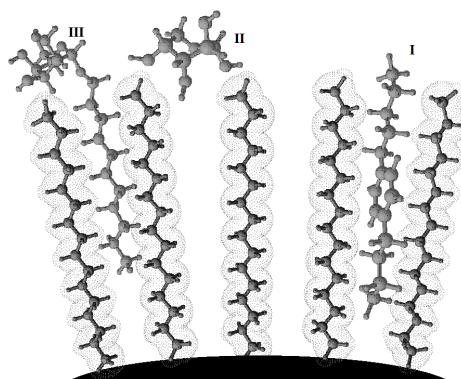


Рис. 1. Механизмы удерживания сорбатов на «мономерных» обращенных фазах:

I – абсорбционный; II – адсорбционный; III – поплавочный

Fig. 1. Mechanisms of retention of sorbates on “monomeric” reverse phases:

I – absorption; II – adsorption; III – float



можно, но можно воспользоваться анализом удерживания сорбатов на стационарных фазах с различной длиной привитого слоя. Фактор удерживания сорбата i на стационарной фазе j , $k_j(i)$, равен его константе распределения между стационарной и подвижной фазами, $K_j(i)$, и фазовым соотношением колонки, φ_j :

$$k_j(i) = K_j(i) \cdot \varphi_j. \quad (1)$$

Если воспользоваться колонками, заполненными стационарными фазами, синтезированными на одном и том же силикагеле, то фазовые соотношения для сорбатов, удерживающихся по адсорбционному механизму должны быть близкими и удерживание сорбатов будет мало зависеть от длины привитого радикала. Тогда при переходе от C18-фазы к C8-фазе и сорбционные свойства поверхностей будут достаточно близкими, хотя в фазе C8 остаточная активность силанольных групп будет выше, чем в фазе C18. При абсорбционном механизме объем привитого слоя при таком же переходе уменьшается более чем в два раза, поэтому и фактор удерживания должен уменьшиться более чем в 2 раза [9].

1. Дисперсионные взаимодействия

Ковалентная иммобилизация на поверхности силикагеля силанов с неполярными алкильными группами изменяет полярный сорбент на неполярный. Привитые алкильные группы имеют практически нулевой дипольный момент, поэтому взаимодействие «сорбат – сорбент» происходит в основном за счет дисперсионных взаимодействий, и удерживание возрастает при

- а) росте гидрофобности сорбата;
- б) росте гидрофобности стационарной фазы;
- в) росте полярности подвижной фазы.

С точки зрения термодинамики удерживание сорбатов в общем случае определяется разностью их свободных энергий в стационарной и подвижной фазах (в области линейности изотермы сорбции).

Но в литературе различают варианты, при которых определяющими считаются:

а) гидрофобные взаимодействия сорбата с компонентами водно-органической подвижной фазы [7];

б) липофильные взаимодействиями сорбата со стационарной фазой [10].

Мономерные обращенные фазы могут различаться по:

- свойствам использованного при дериватизации силикагеля (по удельной поверхности, по размеру и объему пор, по степени чистоты поверхности),

- степени и качеству дериватизации (с эмбедингом или без него, по денатности прививки),

- активности остаточных силанольных групп (по наличию дополнительной обработки – по эндкепингу – неполярному или полярному).

По данным причинам сорбционные свойства сорбентов различных марок (а иногда и между партиями одной марки) возникают существенные различия. Поэтому для характеристики стационарных фаз были введены параметры взаимодействия сорбатов со стационарной и подвижной фазами. Так, абсолютное удерживание этилбензола обеспечивает оценку удерживающей способности (column retentiveness, column strength) обращенно-фазовой колонки, которое предлагается определять в элюенте, содержащем 80 об. % метанола и 20 об. % воды при 23°C в стандарте США [11]. По предложению Галушко [12] для оценки гидрофобности колонок предлагают использовать полусумму факторов удерживания бензола и толуола. Еще по одному варианту в качестве меры гидрофобности колонки предложено использовать логарифм фактора удерживания, аппроксимированный на нулевое содержание органического модификатора [12]. Но применение этих трех параметров при сопоставлении свойств колонок различных производителей содержит неопределенность

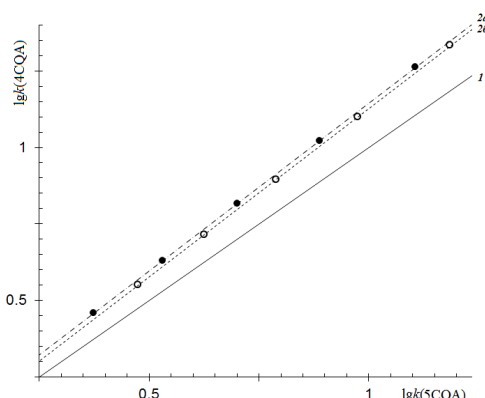


Рис. 2. Карта разделения второго типа: удерживание 4-кофеoilхинной кислоты (4CQA) относительно удерживания 5-кофеoilхинной кислоты (5CQA) в элюентах системы «ацетонитрил – 0.3 об.% ортофосфорной кислоты – вода» на двух колонках (а и б) марки Symmetry C18

Fig. 2. Second type separation map: retention of 4-caffeoylquinic acid (4CQA) relative to retention of 5-caffeoylquinic acid (5CQA) in eluents of the system “acetonitrile - 0.3 vol.% ortho-phosphoric acid - water” on two columns (A and B) Symmetry C18

связанную с возможным (и значительным) различием в фазовом соотношении в уравнении (1). Но если в качестве параметра свойства использовать соотношение факторов удерживания двух веществ на одной и той же колонке, то фазовое соотношение сокращается:

$$\frac{k_j(a)}{k_j(b)} = \frac{K_j(a)}{K_j(b)} \cdot \frac{\varphi_j}{\varphi_j} = \frac{K_j(a)}{K_j(b)} \quad (2)$$

Поэтому такое соотношение (называемое селективностью) является более надежным параметром, определяющим гидрофобность колонок. Параметры гидрофобности (или метиленовой селективности) по тесту Танака определяются как соотношение факторов удерживания амилбензола и бутилбензола, соотношение факторов удерживания этилбензола и толуола (тест Энгельгардта), и даже антрацена и бензола (тест Уолтерса), уже не имеющие смысла метиленовой селективности [12].

В этом отношении анализ карт разделения второго типа [13], рис. 2 имеет ряд преимуществ.

На рис. 2 приведена зависимость удерживания 4-кофеoilхинной кислоты (4CQA) от удерживания 5-кофеoilхинной кислоты (5CQA) в элюентах системы «ацетонитрил – 0.3 об.% ортофосфорной

кислоты – вода». Линии для относительного удерживания 4CQA имеют больший наклон по сравнению с линией для 5CQA. Из этого следует, что селективность разделения этих двух изомеров увеличивается с ростом их удерживания. Отметим, что и метиленовая селективность зависит от состава подвижной фазы. На предложенной карте разделения можно сопоставить свойства различных стационарных фаз. Это позволяет обнаружить различия в удерживании этих соединений при замене одной колонки на колонку такой же марки, но находившуюся в длительном использовании в жестких условиях (в подвижной фазе, содержащей 10 об. % муравьиной кислоты с pH около 1.5). Поскольку pH не ниже 2 является верхним пределом допустимой кислотности подвижных фаз с гарантированной устойчивостью традиционных C18-фаз [14], то при длительной работе в более кислых подвижных фазах часть привитых алкильных групп гидролизуеться. Это приводит к заметному падению удерживания; селективность разделения этих изомеров при этом также снижается, но в меньшей степени.

Другой пример был приведен в работе [15]. В этой работе логарифм фактора

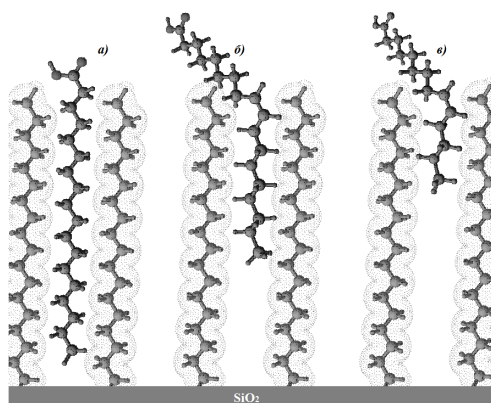


Рис. 3. О легкости и стерических затруднениях сорбции жирных кислот:
 а) *n*-алкановая кислота; б) ω -9 *n*-алкеновая кислота и в) ω -5 *n*-алкеновая кислота
 Fig. 3. On the ease and steric hindrance of fatty acid sorption:
 а) *n*-alkanoic acid; б) ω -9 *n*-alkenic acid and в) ω -5 *n*-alkenic acid

удерживания толуола относительно логарифма фактора удерживания бензола для 21 колонки, анализ которых был выполнен в стандарте США [11] при одном и том же составе подвижной фазы (см. выше), укладывался на прямую линию, близкую к прямой линии для относительного удерживания этих же соединений на одной колонке, но в различных составах подвижных фаз. Отметим, что абсолютно строгого совпадения относительного удерживания на различных колонках ожидать в принципе не следовало, поскольку в используемые параметры входят логарифмы фазовых соотношений, которые для различных стационарных фаз не должны быть одинаковыми, как отмечалось выше.

2. Селективность к форме сорбатов

Это свойство стационарных обращенных фаз принципиально важно для разделения сложных смесей. Причем, когда обращают внимание на селективность к форме сорбатов, то чаще относят это свойство к «полимерным» обращенным фазам. Чувствительность удерживания к форме сорбатов для «полимерных» и «мономерных» фаз зависит от различных факторов. В случае «мономерных» обращенных фаз:

а) условно линейные *n*-алкильные группы могут легко проникать вглубь

привитого слоя; но при наличии двойных С=С-связей в *цис*-конфигурации в проникающих в привитой слой сорбатах необходима конформационная перестройка алкильных цепей привитого слоя, требующая затрат свободной энергии в привитом слое, причем тем сильнее, чем ближе к «головной» метильной группе проникающего в привитой слой алкенильного радикала она находится [16, 17], рис. 3. Кстати, такая модель строения «мономерной» обращенной фазы является единственным обоснованием применимости топологической модели, объясняющей различие в удерживании сорбатов с изомерным строением алкильных радикалов [18];

б) при распределительном механизме сорбции каротиноидов полное погружение в привитой слой молекул каротиноидов требует наличия на поверхности сорбента линейных рядов с недериватизированными силанольными группами. Хаотичность же положения дериватизации и нерегулярность строения аморфного силикагеля потребует при сорбции каротиноидов дополнительных конформационных перестроек алкильных цепей привитого слоя. Эта идея позволяет объяснить, например, экспериментально наблюдаемый порядок элюирования полностью *транс*, 9-*цис*, 13-*цис* и 15-*цис* изомеров β -каротина: [19-21];

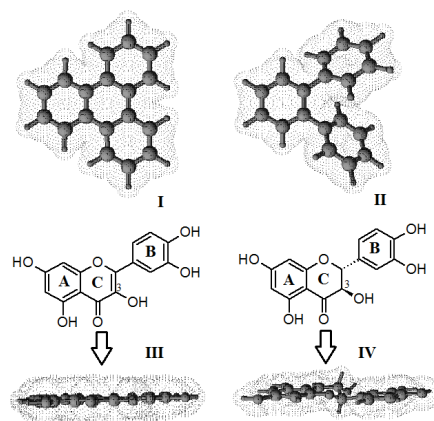


Рис. 4. Структуры трифенилена (I), *орто*-терфенила (II), кверцетина (III) и дигидрокверцетина (IV)

Fig. 4. Structures of triphenylene (I), *ortho*-terphenyl (II), quercetin (III), and dihydroquercetin (IV)

в) при плоском строении сорбатам проще проникнуть в привитой слой по сравнению с сорбатами неплоского строения. Именно этот аспект особенности сорбции специально подобранных соединений «мономерными» обращенными фазами широко известен. Так, по тесту Танака определяют соотношение факторов удерживания плоского трифенилена и неплоского (из-за отталкивание атомов водорода первого и третьего фенильных колец) *орто*-терфенила (рис. 4) для «мономерных» обращенных фаз, хотя высокая эффективность «полимерных» фаз в дифференцировании сорбатов по их пространственному строению сделала их использование предпочтительным в ВЭЖХ [22]. Именно плоская структура кверцетина, в которой ОН-группа в положении 3 частично экранирована ароматическим кольцом В, объясняет существенно большее удерживание этого соединения по сравнению с не плоским дигидрокверцетином, несмотря на замену связи С=С на более липофильную группировку СН₂-СН₂, рис. 4, [23].

3. Активность остаточных силанольных групп

Полярные взаимодействия «сорбат–сорбент» для «мономерных» обращенно-фазовых сорбентов определяются доступностью остаточных силанольных

групп, число которых составляет примерно половину от изначально существовавших на поверхности силикагеля перед дериватизацией. Именно активность остаточных силанольных групп является причиной серьезных различий сорбционных свойств обращенных фаз различных производителей. Вследствие хаотичности силилирования силанольных групп и нерегулярности строения аморфного силикагеля на начальном этапе на его поверхности могут появиться участки, на которых между привитыми группами может образоваться не одна свободная силанольная группа, а две. В этом случае дополнительное силилирование триметилхлорсиланом одной из таких групп позволяет уменьшить их суммарную активность – процесс, названный эндкепингом [24]. Существует еще одна технология снижения активности остаточных силанольных групп – эмбединг [25], но стационарные фазы такого типа не столь распространены, как фазы с эндкепингом, поэтому в данном обзоре рассматриваться не будут.

Таким образом, для традиционных «мономерных» обращенных фаз с эндкепингом молекула сорбата с полярными группами, способные проникать внутрь привитой фазы, могут образовыв-

вать с остаточными силанольными группами водородные связи или вступать в другие типы полярных взаимодействий. В ряде случаев для подавления таких взаимодействий в подвижную фазу вносят добавки, конкурирующие с сорбатами за право образовать водородную связь. Например, по опыту нашей лаборатории, при определении высших жирных кислот, получаемых омылением жиров, на хроматограммах пики кислот оказываются уширенными с затянутым тылом; но добавка в подвижную фазу менее 1 об.% триэтиламина или уксусной кислоты позволяет существенно улучшить формы пиков.

Для оценки активности силанольных групп предложено несколько различных вариантов тестов. В работе [26] приводятся варианты тестов:

а) Энгельгардта – для «силанофильных взаимодействий» (silanophilic interactions – крайне неудачное определение, поскольку силаны и силанольные группы – различные с химической точки зрения объекты), определяемые соотношением факторов удерживания анилина и фенола в подвижной фазе, содержащей 55 об. % метанола в воде при 40°C;

б) Уолтерса (Walters) – как соотношение факторов удерживания N,N-диметил-мета-толуамида (ДЭТА) и антрацена в 100%-ном ацетонитриле при 40°C;

в) Галушко предложил странную формулу с учетом факторов удерживания анилина и фенола:

$$S_G = 1 + 3 \cdot \left[\frac{k(\text{анилин})}{k(\text{фенол})} - 1 \right] \quad (3)$$

В работе [12] в качестве теста на силанольную активность по Энгельгардту предлагается оценка асимметрии пика пара-этиленамина на уровне 5% от высоты пика в элюентах 49:51 или 55:45 об.% системы «метанол-вода» при 40°C. В тесте Танаки рассчитывается способность к образованию водородных связей при использовании соотношения факторов удерживания существенно более стабильного при хранении (по сравнению с

анилином) кофеина и фенола при использовании в качестве метчика мертвого времени урацила в элюенте, содержащем 30 об.% метанола в воде. Но при этом добавляется и тест на ионообменную емкость при pH>7 и ионообменную емкость при pH<7 – как соотношение факторов удерживания бензиламина и фенола в элюентах: 30:70 по объему метанол-водный раствор 0.02 М фосфатного буфера с pH 7.6 в первом случае, или водный раствор 0.02 М фосфатного буфера с pH 2.7 – во втором.

В стандарте США [11] используются амитриптилин и хинизарин. Хинизарин (1,4-дигидроксиантрахинон) представляет собой реагент, хелатирующий металлы, поэтому его хроматографическое поведение зависит от наличия или отсутствия металлов в хроматографической системе. При низкой активности сорбента по отношению к хелатирующим реагентам образуются симметричные пики, при высокой активности пик становится несимметричным с затянутым тылом. Хинизарин обычно элюируется после этилбензола и перед амитриптилином. Для колонок с некоторым типом эмбеддинга хинизарин может элюироваться последним с хорошей симметрией пиков. Амитриптилин (трициклический антидепрессант) является основным фармацевтическим препаратом (pK_a=9.4), широко используемым производителями колонок для их характеристики. Элюирование органических оснований с затянутым тылом («хвостом») пика обычно связывают с высокой силанольной активностью. Поэтому асимметрия пика считается подходящей мерой силанольной активности. Как и в выше предложенном варианте для избавления от недостатков точечных методов возможно использование анализа карт разделения второго типа [13].

Таким образом, при удерживании сорбатов на «мономерных» обращенных фазах возможны два различных механизма сорбции (как и промежуточный меха-

низм, получивший название «поплавочный» [8]). Каждый из этих механизмов обладает своими стереоспецифическими свойствами, поэтому оценка соотношения между строением сорбатов и их удерживанием должна приводиться после разделения сорбатов по механизму удерживания.

4. Линейные соотношения между энергиями сольватации (*linear solvation energy relationships, LSERs*)

Метод стал распространением подхода, разработанного известными специалистами в физической органической химии Камлетом, Тафтом и сотр. (Kamlet, Taft et al, [28]). Метод предназначен для определения вклада типов межмолекулярных взаимодействий в энергию удерживания веществ в обращенно-фазовой хроматографии при предположении аддитивности этих характеристик. Энергия Гиббса переноса сорбата с подвижной фазы на стационарную пропорциональна логарифму фактора удерживания, а для исключения влияния фазового соотношения необходимо вычесть из этого логарифма логарифм фактора удерживания вещества, принятого в качестве вещества сравнения. По предложенному Абрахамсом и сотр. методу [29, 30] удерживание сорбатов в обращенно-фазовой хроматографии определяется уравнением:

$$\lg k = \lg k_o + M(\psi_s - \psi_m)V_2 + S(\pi_s^* - \pi_m^*)\pi_2^* + A(\beta_s - \beta_m)\alpha_2 + B(\alpha_s - \alpha_m)\beta_2 \quad (4)$$

В уравнении (3) нижние индексы s и m относятся к стационарной и подвижной фазам, соответственно; нижний индекс 2 указывает на парциальные свойства сорбата, такие как молярный объем (V), полярность и поляризуемость (π); активность в образовании водородной связи в качестве донора (α) (называемая кислотностью) и активность при образовании водородной связи в качестве акцептора (β) (называемая основностью). Множители перед этими параметрами являются разностью комплементарных свойств

между стационарной и подвижной фазами. Предполагается, что коэффициенты, обозначенные заглавными буквами, как и $\lg k_o$ являются подгоняемыми параметрами, не зависящими от сорбата и природы хроматографических фаз.

Терм $M(\psi_s - \psi_m)V_2$ является наиболее сложным термом представленного выше уравнения. Он является термом полости, создание которой необходимо для заполнения молекулой сорбата в обеих фазах, определяемым как энергия когезии, выражаемой через параметры Хильдебранда: $M_1(\delta_{H,s}^2 - \delta_{H,m}^2)V_2$, стабилизированный дисперсионными взаимодействиями между молекулами сорбата и дисперсионными средами, $M_2(D_2 - D_m)V_2$.

Алкильные радикалы привитой фазы, казалось бы, должны сообщать этой фазе нулевые парциальные компоненты, связанные с полярностью (и поляризуемостью) и со способностью образовывать водородные связи. Но при сорбции воды и органических модификаторов внутрь привитой фазы они приобретают определенные значения таких параметров (от 0.7 до 1.1 для π^*).

Для фиксированных стационарной и подвижной фаз уравнение упрощается:

$$\lg k = \lg k_o + mV_2 + s\pi_2^* + a\alpha_2 + b\beta_2. \quad (5)$$

Главная задача метода – оценить соответствующие параметры сорбата любыми подходящими методами. В качестве V_2 удобно использование McGowan параметра, V_x [31]. Остальные параметры были определены при исследовании различных свойств сорбатов, например, хроматографического поведения веществ в условиях газовой хроматографии [32]. Если все дескрипторы определены, то задача сводится к множественной линейной регрессии для нахождения термов, относящихся к хроматографической системе – т.е. к используемой колонке и составу подвижной фазы. Это должно определить основные виды взаимодействий, управляющие процессами сорбции, и установить их вклад в суммарное удерживание.

Вид уравнений для линейных соотношений между энергиями сольватации во многих публикациях несколько изменялся или дополнялся. Так, в работе [33] вместо уравнения (4) применяли уравнение (5):

$$\lg k = \lg k_0 + vV_2 + s\pi_2^* + a \sum \alpha_2^H + b \sum \beta_2^H + rR_2, \quad (6)$$

в котором появилось дополнительное слагаемое (последнее) – избыточная молярная рефракция сорбата, R_2 ; и комплементарное значение r , зависящее от подвижной и стационарной фаз.

Анализ коэффициентов, связанных со стационарной и подвижной фазами показывает, что для обычных «мономерных» C18 фаз:

- коэффициент v положительный и уменьшается с ростом концентрации ацетонитрила в подвижной фазе. Это указывает на большой вклад дисперсионных взаимодействий энергии сольватации сорбата в стационарной фазе по сравнению в подвижной, а уменьшение такой разности связано с ростом липофильности подвижной фазы при увеличении концентрации ацетонитрила в ней;

- коэффициент s , связанный с полярностью или поляризуемостью сорбата отрицателен и почти не изменяется с ростом концентрации ацетонитрила в подвижной фазе – т.е. полярные взаимодействия в подвижной фазе сильнее, чем в стационарной;

- коэффициенты a и b также отрицательны, но уменьшаются по модулю с ростом концентрации ацетонитрила в подвижной фазе, что указывает на воду – важнейшего компонента, отвечающего за образование водородных связей, причем в подвижной фазе этот эффект выражен значительно сильнее, чем в стационарной.

При переходе к C8-фазе (при этом доступность остаточных силанольных групп сорбента повышается) коэффициент s также положителен, но почти в полтора раза меньше, чем для C18-фаз, что

может указывать на усиление полярных взаимодействий в стационарной фазе вследствие увеличения доступности остаточных силанольных групп сорбента. При этом, как и следовало предполагать, энергии водородных связей (как кислотность, так и основность) уменьшаются по абсолютной величине при одинаковых составах подвижных фаз.

Таким образом, метод позволяет оценить вклад различных взаимодействий в обеих фазах, но количественное разделение этого вклада на роль стационарной и подвижной фаз, к сожалению, мало вероятно. Явный недостаток модели состоит в том, что она может быть применена только к веществам, дескрипторы для которых определены заранее.

По мнению авторов работы [34], использование представленных выше уравнений, как способа характеристики колонок, ограничено. Во-первых, предсказательная точность метода не лучше 10-20%, что во многих случаях не приемлемо, особенно для веществ с R_s от 0.5 до 2.0. Во-вторых, использование вкладов в суммарное удерживание некоторых (ограниченного числа) параметров, требует обоснования; кроме того, использование дескрипторов сорбатов, определенными методами, далекими от ВЭЖХ, не гарантирует их применимость в ВЭЖХ.

К сказанному выше можно добавить, что в этом методе не селективно учитываются геометрические параметры сорбатов, и все использованные сорбаты не распределены по механизму удерживания, что может быть причиной обычно высокой дисперсии расчетных значений логарифма фактора удерживания относительно экспериментальных данных.

5. Гидрофобно-разностная модель (*The hydrophobic-subtraction model*)

Как следует из приведенной выше информации, удерживание сорбатов в обращенно-фазовой хроматографии зависит не только от дисперсионных взаимодействий между сорбатом и стационарной

фазой, но и от других типов взаимодействий. При сопоставлении логарифмов факторов удерживания 90 различных сорбатов на 10 различных колонках было установлено, что на колонке Intersil ODS-3 относительно колонки StableBond C18 найдена зависимость с наклоном близким к 1 (1.01) с довольно высоким коэффициентом корреляции ($R^2=0.995$) и относительно небольшим стандартным отклонением (0.034) [24]. Дальнейший анализ полученных данных привел авторов к выводу о том, что вклад основных типов взаимодействий качественно примерно одинаков для большинства использованных сорбатов (за исключением сильных оснований и алифатических амидов), но различия значительны для веществ основного типа. Следовательно, общая модель должна учитывать вклады различных типов взаимодействий.

В гидрофобно-разностной модели (*The hydrophobic-subtraction model*, [25]) предлагается использовать селективность разделения всех сорбатов относительно неполярного этилбензола по уравнению:

$$\lg \alpha = \lg \left(\frac{k}{k_{ЭБ}} \right) = \eta' H - \sigma' S + \beta' A + \alpha' B + \kappa' C \quad (7)$$

где k – фактор удерживания рассматриваемого сорбата, $k_{ЭБ}$ – фактор удерживания этилбензола, измеренные в одних и тех же условиях; остальные символы указывают на эмпирические, зависящие от состава подвижной фазы и от температуры дескрипторы, относящиеся к данному сорбату (η' , σ' , β' , α' , κ'), или относящиеся к сорбенту не зависящие от состава элюента и температуры дескрипторы сорбента (H , S , A , B , C).

Ориентировочная природа (на самом деле, эту природу предположительно определяют только после классификации сорбатов, использованных в методе) учтенных в уравнении вкладов:

- параметр, связанный с гидрофобностью (первое произведение),
- параметр, связанный со стерическими факторами (второе

произведение),

- A – дескриптор, оценивающий склонность неионизированных остаточных силанольных групп к образованию водородных связей в качестве донора водородной связи;

- B – то же, только в качестве акцептора водородной связи – связывают с молекулой воды, адсорбированной на поверхности силикагеля;

- C отвечает за катионообменные свойства сорбента.

Аддитивные параметры (η' , σ' , β' , α' , κ') указывают на соответствующее комплексментарные свойства сорбатов. Подробно метод определения приведенных выше параметров изложен в [35]. В итоге авторы цитируемой работы установили, что надежность полученных корреляций существенно выше, чем в методе линейных соотношений между энергиями сольватации.

Но получаемые в предложенном методе параметры на самом деле имеют не до конца понятный физический смысл, поскольку ни с каким физическим свойством сорбатов не были сопоставлены. Изначально по сопоставлению относительного удерживания всех 67 сорбатов (от удерживания этилбензола, использованного в качестве вещества сравнения) выделяются те, для которых существует группа с линейной зависимостью между удерживанием на всех колонках относительно колонки, принятой за колонку сравнения (SB 100). Затем вещества, для которых нет такой корреляции, группируют по иному признаку – линейности между разностью удерживания пар веществ между собой для 10 использованных стационарных фаз. Используя множественную линейную корреляцию для всего базиса сорбатов, определяют дескрипторы сорбатов. И, наконец, множественная линейная корреляция для относительного удерживания всех сорбатов используется для уточнения параметров



колонок (на самом деле – хроматографических систем, включающих подвижную и стационарную фазы).

Классифицируя типы взаимодействий, авторы никак не моделируют стерическую селективность, предполагая, что она проявится автоматически. Наконец, подход применим для анализа удерживания большого ряда сорбатов на ряде колонок с заведомо различающимися парциальными (по типам взаимодействий) свойствами. Понятно, что использование метода для колонок с близкой химией поверхности не имеет смысла. Наконец, в исходных данных, как и в предыдущем методе, присутствуют большие отрицательные значения логарифмов факторов удерживания, численные значения которых сильно зависят от надежности использованного способа определения мертвого времени.

Заключение

Анализ литературных данных указывает на то, что проблема выяснения типов межмолекулярных взаимодействий,

Список литературы/References

1. Himiya privityh poverhnostnyh soedinenij / Pod red. G.V. Lisichkina. M.: FIZMATLIT. 2003. 592 s. (in Russ.)
2. Deineka V.I., Burzhinskaya T.G., Deineka L.A. The Surface Structure of “Monomeric” and “Polymeric” Reversed Stationary Phases and Mechanisms of Carotenoid Separation. *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*. 2022; 58(6): 1188-1192. <https://doi.org/10.1134/S2070205122060053>
3. Zhuravlev L.T. Concentration of hydroxyl groups on the surface of amorphous silicas. *Langmuir*. 1987; 3: 316-318. <https://doi.org/10.1021/la00075a004>.
3. Deineka V.I., Nguyen Anh Van, Deineka L.A. Model of a Reversed Phase Grafted on Silica Gel, *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2019; 93(12): 2490-2493. <https://doi.org/10.1021/cr00092a005>

определяющих удерживание сорбатов в условиях «мономерных» обращенных стационарных фаз, очень сложна. Причем сложность такого описания существует не только на количественном, но даже и на качественном уровнях. Это связано, прежде всего, со сложностью учета чувствительности стационарных фаз к объемным факторам сорбатов в распределительном механизме сорбции, обоснованных дескрипторов для которых к настоящему времени не существует. Наконец, необходима дифференциация сорбатов, удерживающихся по адсорбционному или абсорбционному механизмам, закономерности удерживания которых могут существенно различаться по всем типам взаимодействий.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

4. Deineka V.I., Burzhinskaya T.G., Deineka L.A. The Surface Structure of “Monomeric” and “Polymeric” Reversed Stationary Phases and Mechanisms of Carotenoid Separation, *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*, 2022; 58(6): 1188-1192. <https://doi.org/10.1134/S2070205122060053>
5. Žuvela P., Skoczylas M., Jay Liu J., Bączek T. Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chem. Rev.*, 2018; 119: 3674-3729. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00246>
6. Rafferty J.L., Zhang L., Siepmann J.I., Schure M.R. Retention Mechanism in Reversed-Phase Liquid Chromatography: A Molecular Perspective. *Anal. Chem.* 2007; 79: 6551-6558. <https://doi.org/10.1021/ac0705115>
7. Horváth C., Melander W., Molnár I. Solvophobic Interactions in Liquid Chromatography with Nonpolar Stationary Phases.



- J. Chromatogr. A.* 1976; 125: 129-156. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)93816-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)93816-0)
8. Deineka V.I., Deineka L.A., Saenko I.I., Chulkov A.N. A Float Mechanism of Retention in Reversed-Phase Chromatography. *Russian Journal of Physical Chemistry A.* 2015; 89: 1300-1304. <https://doi.org/10.1134/S0036024415070079>
9. Deineka V.I., Burzhinskaya T.G., Deineka L.A. Separation of carotenoids during reversed-phase HPLC: retention mechanism and methylene selectivity on a monomeric stationary phase. *Sorbtionnyye i khromatograficheskie protsessy.* 2022; 22(4): 393-405. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorp-chrom.2022.22/1056>
10. Carr P.W., Li J., Dallas A.J., Eikens D.I. *et al.* Revisionist Look at Solvophobic Driving Forces in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A,* 1993; 656: 113-133. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)80800-N](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)80800-N)
11. Carlos A. Gonzalez Standard Reference Material® 870 Column Performance Test Mixture for Liquid Chromatography / National Institute of Standards & Technology Certificate of Analysis. Gaithersburg, MD 20899. 2016. https://www.hplc.eu/Downloads/NIST_SRM_870.pdf
12. Claessens H.A., van Straten M.A., Cramers C.A., Jezierska M. *et al.* Comparative study of test methods for reversed-phase columns for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A,* 1998; 826: 135-156. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00749-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00749-3).
13. Deineka V.I., Oleinits E.Yu., Blinova I.P., Deineka L.A. Comparing Two Versions of a Separation Map in Reversed Phase Liquid Chromatography. *Russian Journal of Physical Chemistry A,* 2022; 96(8): 1768-1772. <https://doi.org/10.1134/S003602442208007>
14. Moldoveanu S.C. HPLC Analysis. Ch. 9 / In: Essentials in Modern HPLC Separations. Serban C. Moldoveanu, Victor David. Elsevier. 2012. 550 p.
15. Deineka V.I. Relative retentions analysis in reversed-phase HPLC. Columns standardization. *Sorbtionnyye i khromatograficheskie protsessy.* 2006; 6(4): 596-01. (In Russ.)
16. Deineka V.I., Nguyen Anh Van, Deineka L.A. Model of a Reversed Phase Grafted on Silica Gel. *Russian Journal of Physical Chemistry A.* 2019; 93(12): 2490-2493. <https://doi.org/10.1134/S0036024419120057>
17. Czauderna M., Kowalczyk J. HPLC Separation of Some Unsaturated and Saturated Fatty Acids. *Chem. Anal. (Warsaw),* 2002; 47: 867-882. <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.baztech-article-BPP1-0031-0019>
18. Kurbatova S.V., Shumskaya N.Yu. Issledovanie vzaimosvyazi mezhdu strukturoj i khromatograficheskim povedeniem karbonil'nyh proizvodnyh adamantana v usloviyah obrashchenno-fazovoj VEZHKKH, *Vestnik SamGU. Estestvennonauchnaya seriya.* 2004. Vtoroj spec. vypusk. 123-130. (In Russ.)
19. Stahl W., Sundquist A.R., Hanusch M., Schwarz W. *et al.* Separation of β -Carotene and Lycopene Geometrical Isomers in Biological Samples. *Clin. Chem.,* 1993; 39/5: 810-814. <https://doi.org/10.1093/clinchem/39.5.810>
20. Saleh M.H., Tan B. Separation and Identification of *Cis/Trans* Carotenoid Isomers. *J. Agric. Food Chem.* 1991; 39: 1438-1443. <https://doi.org/10.1021/jf00008a015>.
21. Deineka V.I., Burzhinskaya T.G., Deineka L.A., Blinova I. P. Determination of Carotenoids of Tomato Fruits of Different Colors. *J. Anal. Chem.* 2021; 76(2): 196-203. <https://doi.org/10.1134/S1061934820120060>
22. Engelhardt H., Nikolov M., Arangio M., Scherer M. Studies on Shape Selectivity of RP C18-Columns. *Chromatographia.* 1998; 48(3/4): 186-189. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF02467669.pdf>



23. Deineka V.I., Deineka L.A., Blinova I.P., Kostenko M.O., Oleinits E.Yu. About chromatographic behavior of flavonoids in reversed-phase HPLC. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2016; 16(3): 377-383. (In Russ.)
24. Gritti F., Guiochon G. Effect of the endcapping of reversed-phase high-performance liquid chromatography adsorbents on the adsorption isotherm. *J. Chromatogr. A*. 2005; 1098: 82-94. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.08.045>
25. Wilson N.S., Gilroy J., Dolan J.W., Snyder L.R. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography VI. Columns with embedded or end-capping polar groups. *J. Chromatogr. A*. 2004; 1026: 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.11.041>
26. Vyňuchalová K., Jandera P. Selectivity Tests of Stationary Phases for Reversed-Phase HPLC. *Anal. Lett.* 2011; 44(9): 1640-1662. <https://doi.org/10.1080/00032719.2010.520393>
27. Deineka V.I. A New Method for Assessing the Effect of Residual Silanol Groups on Total Retention in Reversed-Phase HPLC. *J. Anal. Chem.* 2007; 62(7): 665-668. <https://doi.org/10.1134/S106193480707009X>
28. Kamlet M.J., Taft R.W. Linear solvation energy relationships. Local empirical rules – of fundamental laws of chemistry? A reply to the chemometricians. *Acta Chem. Scand. B*. 1985; 39: 611-628. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.41b-0589>
29. Sadek P.C., Carr P.W., Doherty R.M., Kamlet M.J. *et al.* Study of Retention Processes in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography by the Use of the Solvatochromic Comparison Method. *Anal. Chem.* 1985; 57: 2971-2978. <https://doi.org/10.1021/ac00291a049>
30. Tan L.C., Carr P.W., Abraham M.H. Study of retention in reversed-phase liquid chromatography using linear solvation energy relationships I. The stationary phase. *J. Chromatogr. A*. 1996; 752: 1-18. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00459-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00459-1)
31. Abraham M.H., McGowan J.C. The Use of Characteristic Volumes to Measure Cavity Terms in Reversed Phase Liquid Chromatography. *Chromatographia*. 1987; 23(4): 243-246. <https://doi.org/10.1007/BF02311772>
32. Abraham M.H., Whiting G.S., Doherty R.M., Shuely W.J. Hydrogen bonding XVI. A new solute solvation parameter, π^H_2 , from gas chromatographic data. *J. Chromatogr.* 1991; 587: 213-228. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(91\)85158-C](https://doi.org/10.1016/0021-9673(91)85158-C)
33. Zhai J., Carr P.W. Comparison of the Retention Characteristics of Aromatic and Aliphatic Reversed Phases for HPLC Using Linear Solvation Energy Relationships. *Anal. Chem.* 1998; 70: 3619-3628. <https://doi.org/10.1021/ac980173v>
34. Wilson N.S., Nelson M.D., Dolan J.W., Snyder L.R. *et al.* Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography. I. A general quantitative relationship. *J. Chromatogr. A*. 2002; 961: 171-193. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(02\)00659-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(02)00659-3)
35. Snyder L.R., Dolan J.W., Carr P.W. The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity. *J. Chromatogr. A*. 2004; 1060: P. 77-116. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.121>

Информация об авторах / Information about the authors

В.И. Дейнека – профессор кафедры общей химии, д.х.н., Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород

V.I. Deineka – Professor of the Department of General Chemistry Belgorod state national research University, Belgorod, e-mail deineka@bsu.edu.ru



Е.Ю. Олейниц – ассистент кафедры общей химии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

В.Ф. Селеменев – д.х.н., проф. каф. аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж

Т.В. Елисева – к.х.н., зав. кафедрой аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

E.A. Oleynits – Assistant of the Department of General Chemistry, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation, e-mail: oleinits_e@bsu.edu.ru

V.F. Selemenev – DSci in chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: common@chem.vsu.ru

T.V. Eliseeva – Head of the Department of Analytical Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: tatyanaeliseeva@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 21.05.2023; одобрена после рецензирования 25.07.2023; принята к публикации 02.08.2023.

The article was submitted 11.12. 2023; approved after reviewing 25.07.2023; accepted for publication 02.08.2023.