



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544.5:068.7

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12501

Аномалии 2,2'-бипиридила в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии

Игорь Георгиевич Зенкевич¹, **Данила Александрович Баранов¹**,
Вера Михайловна Косман²

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии, Санкт-Петербург, Россия, izenkevich@yandex.ru

²АО «НПО «Дом фармации», Ленинградская обл., Россия

Аннотация. На примере особенностей удерживания 2,2'-бипиридила в обращенно-фазовой ВЭЖХ впервые установлено, что наблюдаемые при максимальном содержании воды в элюенте аномалии зависят от скорости потока подвижной фазы. Для выявления таких аномалий использована рекуррентная аппроксимация зависимости времен удерживания от содержания метанола в элюенте. Поскольку для 2,2'-бипиридила известно образование гидрата, то на графиках рекуррентной аппроксимации его времен удерживания при использовании водно-ацетонитрильных элюентов точки, соответствующие наибольшему содержанию воды в элюенте, отклоняются вниз от линии регрессии. Такая особенность типична для всех образующих гидраты аналитов. Подобная же аномалия наблюдается при использовании водно-метанольных элюентов при минимальном расходе элюента (0.7 мл/мин). Однако при увеличении расхода элюента (до 1.0 см³/мин) соответствующие точки на графиках рекуррентной аппроксимации времен удерживания оказываются расположенными выше линии регрессии, что никогда не наблюдали ранее. Предложено возможное объяснение эффекта.

Если отклонения точек на графиках рекуррентной аппроксимации вниз от линии регрессии обусловлены свойствами аналитов (образованием гидратов), то зависимость характера наблюдаемых аномалий от расхода элюента исключает их объяснение только этой причиной. При этом необходимо принять во внимание большее влияние расхода элюента на значения фактора асимметрии хроматографических пиков 2,2'-бипиридила при использовании водно-метанольных элюентов, чем в случае водно-ацетонитрильных. Сочетание двух выявленных аномалий: изменение знака отклонений точек на графиках рекуррентной аппроксимации и увеличение фактора асимметрии при увеличении расхода элюента может быть интерпретировано как следствие неравновесного характера хроматографического разделения. При уменьшении расхода элюента состояние системы более соответствует равновесному.

Столь детальное рассмотрение особенностей хроматографического удерживания 2,2'-бипиридила представляется отнюдь не частной проблемой, поскольку аналогичные аномалии могут наблюдаться для соединений иной химической природы. В результате 2,2'-бипиридил не может быть рекомендован в качестве тест-компонента для контроля инертности хроматографических систем в обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, вариации состава элюентов, 2,2'-бипиридил, параметры удерживания, рекуррентная аппроксимация, выявление аномалий.

Благодарности: в работе использовано оборудование Ресурсного Центра «Методы анализа состава вещества» Санкт-Петербургского государственного университета. Авторы благодарят сотрудников Центра за содействие ее выполнению.

Для цитирования: Зенкевич И.Г., Баранов Д.А., Косман В.М. Аномалии 2,2'-бипиридила в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 5. С. 606-619. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12501>



Original article

Anomalies of 2,2'-bipyridyl in reverse-phase high-performance liquid chromatography

Igor G. Zenkevich¹✉, Danila A. Baranov¹, Vera M. Kosman²

¹St. Petersburg State University, Institute of Chemistry, St. Petersburg, Russia, izenkevich@yandex.ru ✉

²NPO Dom farmatsii, Leningrad region, Russia

Abstract. Using the example of the retention features of 2,2'-bipyridyl in reverse-phase HPLC, it was established for the first time that the observed anomalies at the maximum water content in the eluent depended on the flow rate of the mobile phase. To identify these anomalies, we used a recurrent approximation of the dependence of retention times on the methanol content in the eluent. The formation of the hydrate is typical for 2,2'-bipyridyl, therefore the points corresponding to the highest water content in the eluent deviated downwards from the regression line on the graphs of the recurrent approximation of its retention times when using aqueous acetonitrile eluents. This feature is typical for all analytes forming hydrates. A similar anomaly was observed when using water-methanol eluents with a minimum eluent flow rate (0.7 cm³/min). However, with an increase in the eluent flow rate (up to 1.0 ml/min), the corresponding points on the graphs of the recurrent approximation of retention times were located above the regression line, which has never been observed before. We proposed a possible explanation of the effect.

If the deviations of the points on the graphs of the recurrent approximation down from the regression line were caused by the properties of analytes (formation of hydrates), the dependence of the nature of the observed anomalies on the eluent flow cannot be the only explanation for the deviations. It was also necessary to take into account the greater influence of eluent flow rate on the values of the asymmetry factor of chromatographic peaks of 2,2'-bipyridyl when using aqueous methanol eluents as compared to aqueous acetonitrile. The combination of two identified anomalies, a change in the sign of deviations of points on the graphs of recurrent approximation and an increase in the asymmetry factor with an increase in eluent flow rate, could be interpreted as a consequence of the nonequilibrium nature of chromatographic separation. With a decrease in eluent consumption, the state of the system became more consistent with equilibrium.

Such a detailed study of the features of chromatographic retention of 2,2'-bipyridyl did not seem to be a particular problem, as similar anomalies could be observed for compounds of a different chemical nature. As a result, 2,2'-bipyridyl could not be recommended as a test component for monitoring the inertness of chromatographic systems in reverse-phase HPLC.

Keywords: high-performance liquid chromatography, variations in the composition of eluents, 2,2'-bipyridyl, retention parameters, recurrent approximation, detection of anomalies.

Acknowledgments: the equipment of the Resource Centre Methods of substance composition analysis of St. Petersburg State University was used in the work. The authors are grateful to the staff of the centre for their assistance.

For citation: Zenkevich I.G., Baranov D.A., Kosman V.M. Anomalies of 2,2'-bipyridyl in reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy*. 2024. 24(5): 606-619. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12501>

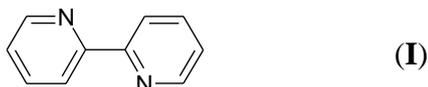
Введение

Исходная посылка настоящей работы представляла собой попытку характеристики инертности хроматографических систем в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ), которая была бы основана на тех же принципах, что и характеристика инертности газохроматографических систем. С начала 1970 гг. решение этой задачи в газовой хроматографии предполагает анализ сме-

сей соединений различной химической природы (различной полярности) с целью выявления дискриминации пиков отдельных компонентов [1, 2] (подробный библиографический список приведен в работе [3]). Последние рекомендации включают анализ образцов одинакового состава с разными концентрациями компонентов [3, 4], что позволяет количественно оценить границы инертности. Однако если в газовой хроматографии первая стадия этой операции – выбор тест-компонентов различной

полярности – не представляет особых сложностей, то в ОФ ВЭЖХ такой выбор весьма непрост. Причиной этого является многообразие взаимодействий аналитов не только с сорбентами хроматографических колонок, но и с компонентами элюентов, что может маскировать проявления целевых эффектов и усложняет интерпретацию результатов.

На этапе выбора потенциальных компонентов тест-смесей для контроля инертности хроматографических систем в ОФ ВЭЖХ любая относящаяся к этой проблеме информация представляет безусловный интерес. Одним из таких компонентов является 2,2'-бипиридил (CAS № 366-18-7, аббревиатура 2,2'-biPy) (I):



Интерес к 2,2'-biPy в ОФ ВЭЖХ вызван его упоминанием в Wikipedia (en.wikipedia.org/wiki/High_performance_liquid_chromatography) как потенциального тест-компонента для детектирования присутствия следов ионов металлов в хроматографических системах в ВЭЖХ. Поскольку 2,2'-biPy образует хелатные комплексы с ионами переходных металлов, то предполагается, что присутствие их следов (например, на поверхности силикагеля) должно приводить к увеличению асимметрии хроматографических пиков (появлению «хвостов»), что фактически соответствует понятию «недостаточная инертность». К сожалению, в Wikipedia эта информация приведена без ссылок, а попытки найти ее более «серьезные» источники оказались безрезультатными. Тем не менее, такое упоминание заслуживает дополнительную проверку.

Физико-химические характеристики 2,2'-biPy: молекулярная формула $C_{10}H_8N_2$, молекулярная масса 156 Да, нормальная температура кипения $273.0 \pm 0.7^\circ C$, температура плавления $70.7 \pm 1.5^\circ C$, относительная плотность

1.10, показатель преломления 1.580, pK_a 4.4 ± 0.1 , растворимость в воде при $20^\circ C$ 0.55 г/100 см^3 , дипольный момент 0 Д. Нулевой дипольный момент означает, что это соединение (по крайней мере, в растворах в неполярных растворителях) находится в трансoidalной конформации (I). Важно, что для 2,2'-biPy известен нестабильный при нормальных условиях моногидрат (CAS № 123333-55-1) [5]. Таким образом, в элюентах – водных растворах – существует динамическое равновесие между гидратированной и негидратированной формами 2,2'-biPy (1), однако значение константы гидратации, как и для многих других органических соединений, неизвестно:



Как было недавно показано, такая обратимая гидратация аналитов в условиях разделения методом ОФ ВЭЖХ может быть выявлена в результате рекуррентной аппроксимации их времен удерживания по отклонениям точек, соответствующих наибольшему содержанию воды в элюенте, от линии линейной регрессии [4-7]. Выявление зависимостей параметров удерживания аналитов от содержания органических растворителей в элюентах, $t_R(C)$, представляет собой один из основных способов характеристики как аналитов, так и сорбентов хроматографических колонок в ОФ ВЭЖХ [8-11]. Для хроматографических параметров (времен удерживания, t_R) в ОФ ВЭЖХ рекуррентные соотношения первого порядка имеют следующий вид:

$$t_R(C + \Delta C) = a t_R(C) + b, \quad (2)$$

где C – содержание органического компонента в элюенте, $\Delta C = \text{const}$ – заданный постоянный «шаг» его вариации, a , b – коэффициенты, вычисляемые методом наименьших квадратов.

Если при вариациях содержания органического компонента элюента аналиты не проявляют никаких аномалий

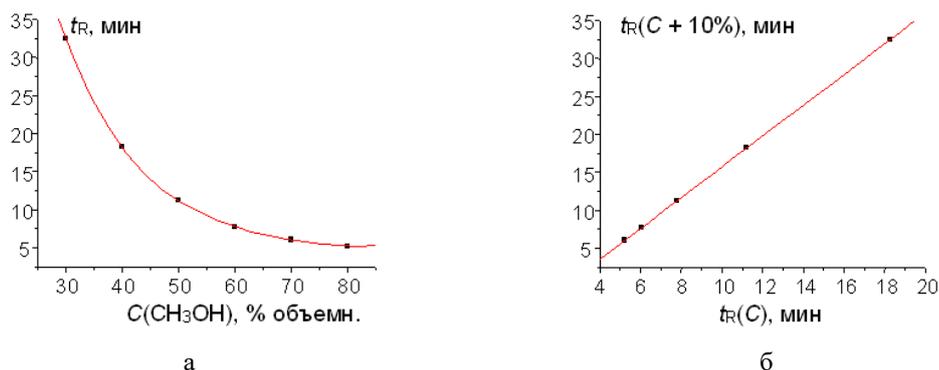


Рис. 1. (а) График зависимости экспериментально измеренных времен удерживания ацетофенона (мин) от концентрации (объемн. %) метанола в элюенте [6], $t_R(C)$: 32.464(30), 18.244(40), 11.230(50), 7.774(60), 6.052(70) и 5.226(80); (б) рекуррентное представление данных: $t_R(C+10\%)=at_R(C)+b$. Параметры линейной регрессии: $a=0.4932\pm 0.0005$, $b=2.231\pm 0.008$, $R=0.99999$, $S_0=0.01$

Fig. 1. (a) Graph of the dependence of experimentally measured retention times of acetophenone (min) on concentration (vol. %) methanol in the eluent [6], $t_R(C)$: 32.464(30), 18.244(40), 11.230(50), 7.774(60), 6.052(70), and 5.226(80); (b) recurrent representation of data: $t_R(C+10\%)=at_R(C)+b$. Linear regression parameters: $a=0.4932\pm 0.0005$, $b=2.231\pm 0.008$, $R=0.99999$, $S_0=0.01$

хроматографического удерживания в ОФ ВЭЖХ, то рекуррентные представления совокупностей значений $t_R(C)$ для них имеют вид практически «идеальных» линейных зависимостей с коэффициентами корреляции более 0.999. Примером таких соединений может служить ацетофенон (водно-метанольные элюенты), для которого на рис. 1а представлена близкая к гиперболической исходная зависимость $t_R(C)$, а на рис. 1б – ее рекуррентная аппроксимация [9]. Времена удерживания и параметры зависимости (2) указаны в подписи к рисунку.

Если же зависимости $t_R(C)$ искажены проявлениями каких-либо дополнительных эффектов, то это приводит к отклонениям отдельных точек на графиках их рекуррентных аппроксимаций от линий линейной регрессии. Выявить такие отклонения для исходных зависимостей $t_R(C)$ сложно. Максимальные отклонения наблюдаются для элюентов с наибольшим содержанием воды. В случае гидратов, которые по своей природе более гидрофильны по сравнению с исходными анализами, на графиках рекуррентных аппроксимаций точки, соответствующие максимальному содержанию воды в

элюенте, отклоняются вниз от линий регрессии. В работе [9] для обоснования подобных эффектов были использованы результаты численного моделирования. В качестве иллюстрации на рис. 2 приведены графики рекуррентной аппроксимации для двух образцов 2,2'-biPy с концентрациями 216 и 21.6 мкг/см³. Примечательно, что коэффициенты линейных рекуррентных уравнений (2) (без учета аномальных точек) в обоих случаях практически одинаковы.

Образование гидратов анализов в условиях ОФ ВЭЖХ в целом более типично для водно-ацетонитрильных, нежели для водно-метанольных элюентов. Этот эффект обусловлен тем, что метанол образует с водой более прочные гидраты, чем соединения других классов, что может препятствовать их гидратации [8]. Тем не менее, выявлены анализы, для которых образование гидратов детектируется и при использовании водно-метанольных элюентов [9].

Численные эксперименты в работе [9] позволили предсказать еще несколько потенциально возможных аномалий параметров удерживания в ОФ ВЭЖХ. Однако дальнейшее расширение круга ха

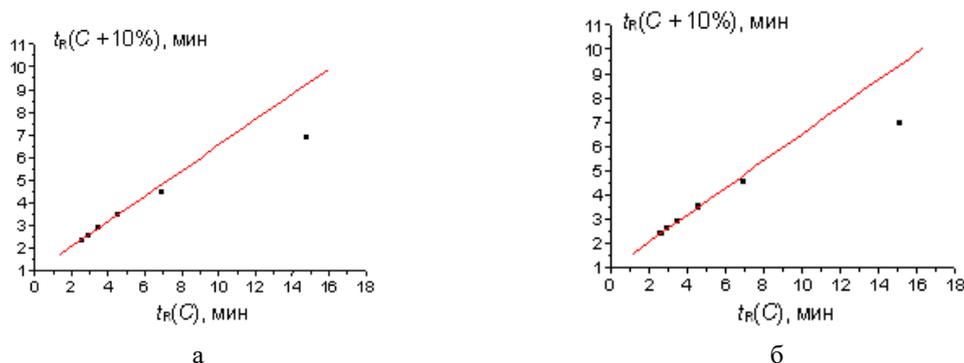


Рис. 2. Графики рекуррентной аппроксимации времен удерживания 2,2'-биРу в диапазоне концентраций ацетонитрила от 80 до 20% об. (концентрации 2,2'-биРу в растворах а) 216 и б) 21.6 мкг/см³). Параметры уравнений линейной регрессии (без учета аномальных точек): а) $a=0.56\pm 0.02$, $b=0.94\pm 0.05$, $R=0.9993$, $S_0=0.02$; б) $a=0.56\pm 0.01$, $b=0.97\pm 0.03$, $R=0.9994$, $S_0=0.01$.

Fig. 2. Graphs of the recurrent approximation of the retention times of 2,2'-biPy in the range of acetonitrile concentrations from 80 to 20% by vol. (concentrations of 2,2'-biPy in solutions а) 216 and б) 21.6 μg/ml). Parameters of linear regression equations (excluding anomalous points): а) $a = 0.56 \pm 0.02$, $b = 0.94 \pm 0.05$, $R = 0.9993$, $S_0 = 0.02$; б) $a = 0.56 \pm 0.01$, $b = 0.97 \pm 0.03$, $R = 0.9994$, $S_0 = 0.01$.

рактируемых аналитов различной химической природы привело к выявлению таких особенностей удерживания, которые не могли быть предсказаны в результате только численного моделирования. Одним из подобных соединений оказался именно 2,2'-бипиридил. Рассмотрение особенностей его хроматографического удерживания в настоящей работе представляется отнюдь не частной проблемой, поскольку аналогичные аномалии могут наблюдаться и для соединений и иной химической природы.

Экспериментальная часть

Приготовление растворов. Для приготовления исходного раствора (0) навеску 2,2'-бипиридила (2,2'-biPy; Reagent Grade; «Реанал», Будапешт, Венгрия) массой около 1 мг растворяли в 5 см³ изопропилового спирта (ХЧ, «Криохром», Санкт-Петербург), что соответствует концентрации 2,2'-биРу около 200 мкг/см³. Растворы (i) – (iii) готовили серией последовательных разбавлений исходного раствора в 10 раз (из 0.5 см³ предыдущего раствора и 4.5 см³ изопропилового

спирта). В одном случае (см. далее в тексте) использовали серию последовательных разбавлений в два раза.

В первых работах по характеристике возможностей рекуррентной аппроксимации времен удерживания в ОФ ВЭЖХ (например, [6]) пробы растворяли в элюенте. Однако впоследствии было установлено, что природа растворителя не оказывает влияния на наблюдаемые эффекты, что позволило использовать изопропиловый спирт.

Условия анализа. ВЭЖХ анализ образцов с использованием водно-метанольных элюентов проводили на приборе Shimadzu LC-20 (Prominence), с детектором SPD-M20A типа «диодная матрица» (Prominence) и колонкой Luna 5u C18 длиной 250 мм и внутренним диаметром 4.6 мм (размер частиц сорбента 5 мкм). Использованы изократические режимы элюирования при вариациях содержания метанола (ЧДА, НПК «Криохром», Санкт-Петербург) от 20 до 80% об. с шагом 5%. Температура колонки 40°C, скорость потока элюента 0.7 и 1.0 см³/мин, pH элюента 6.2-6.3, объем проб 10 мкл. В составе элюентов была использована де-

ионизированная вода (удельное сопротивление 18.2 МОм×см), полученная на установке «Milli-Q device» («Millipore», США). Вариации времен удерживания компонентов одних и тех же образцов в результате их последовательного дозирования не превышали 0.02-0.03 мин. Расход элюента 0.7 см³/мин выбран для уменьшения давления элюента на входе в хроматографическую колонку из-за увеличения вязкости смесей метанола с водой [8].

Анализ образцов с использованием водно-ацетонитрильных элюентов проводили на аналогичном хроматографе с диодно-матричным детектором и аналогичной колонкой и предколонкой длиной 3 мм, заполненной таким же сорбентом (Phenomenex, США). Компоненты элюента: вода, очищенная с использованием системы водоподготовки Simplicity UV, Millipore, США, и ацетонитрил (сорт «0», НПК «Криохром», Санкт-Петербург). Использовали изократические режимы элюирования с содержанием ацетонитрила от 20 до 80% об. с шагом 10%, скорость потока элюента 1.0 см³/мин, объем проб 20 мкл.

Обработка результатов. Регистрацию УФ-спектров и определение значений фактора асимметрии хроматографических пиков проводили с использованием стандартного программного обеспечения хроматографов. Дополнительно вычисляли относительные оптические плотности $A_{отн} = A(254)/A(220)$ для длин волн 254 и 220 нм, равные отношению площадей пиков при 254 и 220 нм, соответственно. Для статистической обработки результатов и их графического представления использовали ПО Excel (Microsoft Office 2010) и Origin (версии 4.1 и 8.1).

Необходимо отметить важную особенность рекуррентной аппроксимации. Она целесообразна только для конкретных наборов времен удерживания без их предварительного усреднения, которое может приводить к снижению точности

результатов. Роль статистической обработки в этом случае выполняет аппроксимация наборов данных методом наименьших квадратов.

Обсуждение результатов

Особенности хроматографических параметров 2,2'-бипиридила в системе ацетонитрил/вода. Поскольку известно, что 2,2'-biPy образует гидрат, то на основании ранее полученных данных [6-9] с высокой вероятностью можно было утверждать, что на графиках рекуррентной аппроксимации его времен удерживания как функций концентраций компонентов элюента, будут наблюдаться отклонения точек, соответствующих наибольшему содержанию воды в элюентах, вниз от линий регрессии. Это отчетливо видно на рис. 2. Однако в отличие от предыдущих работ [6-9], здесь такая проверка выполнена для образцов не с фиксированным содержанием 2,2'-biPy, а при варьировании его концентраций в 10³ раз. С этой целью были проанализированы растворы (0-iii) с концентрациями 2,2'-biPy 216, 21.6, 2.2 и 0.2 мкг/см³ в диапазонах содержания ацетонитрила в элюенте от 20 до 80% объемн. с шагом 10% (таблица 1). Фрагменты хроматограмм растворов 2,2'-biPy с концентрациями 216 и 0.22 мкг/мл при содержании ацетонитрила в элюенте 80% об. приведены на рис. 3.

Такие хроматограммы иллюстрируют, что форма (асимметрия) пиков 2,2'-biPy существенно не меняется при уменьшении количества аналита в 1000 раз, но при его минимальной концентрации в растворе (0.22 мкг/см³) регистрации его пиков на хроматограммах заметно мешают сигналы примесей в растворителе. По этой причине на хроматограммах двух последних растворов с наименьшими концентрациями 2,2'-biPy при содержании CH₃CN в элюенте 20 и 30% пики 2,2'-biPy малоинтенсивны и сильно размыты, что приводит к большим погрешностям

Таблица 1. Времена удерживания и факторы асимметрии пиков 2,2'-биридила для его разных концентраций в растворах при разных содержаниях ацетонитрила в составе элюента (измерены при длине волны детектирования 220 нм, расход элюента 1.0 см³/мин)

Table 1. Retention times and asymmetry factors of 2,2'-biPy for its different concentrations in solutions and different content of acetonitrile in the eluent (measured at wavelength 220 nm, eluent flow 1.0 cm³/min)

Концентрация 2,2'-биPy в дозируемом растворе, мкг/мл	Концентрация ацетонитрила в элюенте, об. %	Среднее значение времени удерживания, t_R , мин	Фактор асимметрии, A_s
216	80	2.368	1.93
	70	2.578	1.91
	60	2.895	1.98
	50	3.452	1.91
	40	4.496	1.82
	30	6.879	1.72
	20	14.758	2.18
Среднее значение A_s			1.92 ± 0.14
21.6	80	2.415	7.6*
	70	2.610	7.6
	60	2.934	5.9 – 12.3
	50	3.506	3.5 – 8.6
	40	4.562	3.8
	30	6.940	7.4
	20	15.102	3.6
2.2	80	2.572	1.60
	70	2.892	1.91
	60	3.311	1.67
	50	3.850	1.55
	40	4.464	1.60
Среднее значение A_s			1.67 ± 0.14
0.2	80	2.573	1.74
	70	2.894	1.85
	60	3.310	1.60
	50	3.845	1.68
	40	4.456	1.69
Среднее значение A_s			1.71 ± 0.09

*Стандартный алгоритм вычисления фактора асимметрии A_s для образца с концентрацией 2,2'-биPy 21.6 мкг/см³ приводит к аномально высоким значениям (комментарии см. в тексте).

интегрирования их площадей и исключению этих данных из рассмотрения.

С целью выявления возможных искажений хроматографических пиков в табл. 1 указаны значения их факторов асимметрии, A_s . При этом отмечена следующая особенность. Для раствора с концентрацией 2,2'-биPy 21.6 мкг/см³ значения A_s его пиков существенно больше, чем для

других образцов как с меньшими (2.2 и 0.2 мкг/см³), так и с большей (216 мкг/см³) концентрациями. Аномалия значений A_s в этой же области концентраций аналита воспроизводится в серии растворов, получаемых разбавлениями не в 10, а в два раза. Однако из этого факта не следуют какие-либо выводы о трансформациях 2,2'-биPy в растворах или аномалиях

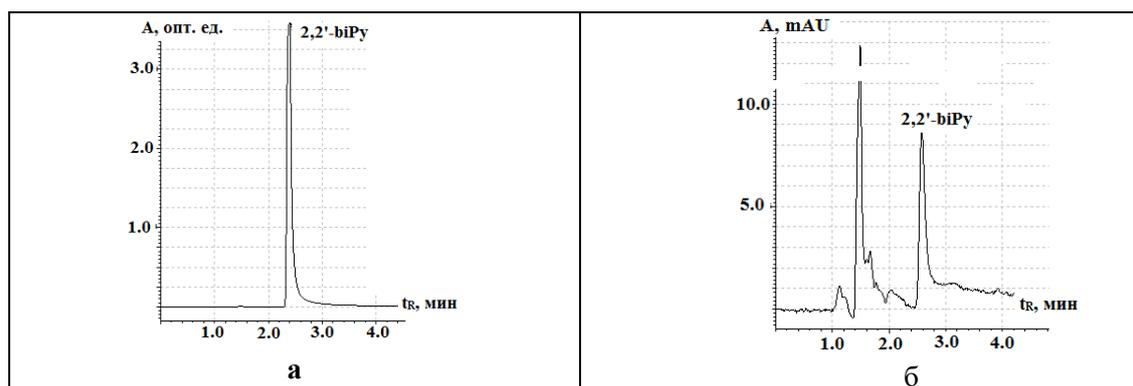


Рис. 3. Фрагменты хроматограмм растворов 2,2'-бипиридила с концентрациями 216 $\mu\text{г}/\text{см}^3$ (а) и 0.22 $\mu\text{г}/\text{см}^3$ (б) (содержание ацетонитрила в элюенте 80%).
 Fig. 3. Fragments of a chromatogram of solutions of 2,2'-bipyridyl with concentrations of 216 $\mu\text{г}/\text{см}^3$ (a) and 0.22 $\mu\text{г}/\text{см}^3$ (b) (acetonitrile content in the eluent 80%).

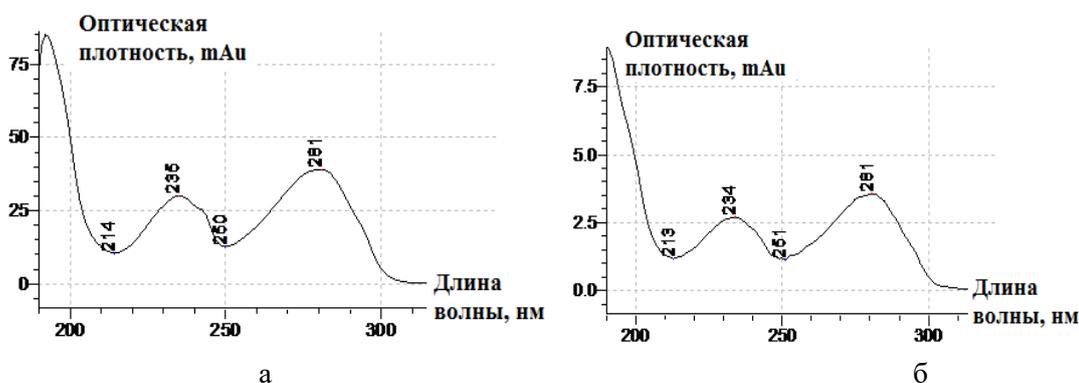


Рис. 4. Практически идентичные УФ-спектры 2,2'-биРу образца (I) с концентрацией 21.6 $\mu\text{г}/\text{см}^3$, записанные в ходе их хроматографического разделения при содержании ацетонитрила в элюенте 80% (а) и 20% (б).
 Fig. 4. Practically identical UV spectra of the 2,2'-biPy sample (I) with a concentration of 21.6 $\mu\text{г}/\text{см}^3$ recorded during their chromatographic separation with an acetonitrile content in the eluent of 80% (a) and 20% (b).

удерживания 2,2'-биРу. Возможно, это обусловлено особенностями «традиционного» алгоритма вычисления фактора асимметрии (отношение расстояний от перпендикуляра из максимума пика на базовую линию до заднего и переднего фронтов пика на уровне 10% от его высоты), который оказывается аномально «чувствительным» к форме «хвостов» пиков. Более эффективным здесь представляется алгоритм, основанный на отношении площадей частей пика после и до перпендикуляра. Большая часть всех остальных значений A_S не превышает 2.0, что в хроматографической практике считается вполне допустимым.

Для выявления возможной трансформации 2,2'-биРу в водных растворах для образца (i) с концентрацией 21.6 $\mu\text{г}/\text{см}^3$ были записаны УФ-спектры (диапазон 190-310 нм) при содержании ацетонитрила в элюенте 80 и 20% (рис. 4), которые оказались практически идентичными. Для образцов с концентрациями 2,2'-биРу менее 2.0 $\mu\text{г}/\text{см}^3$ УФ-спектральные данные, регистрируемые с использованием детектора типа «диодная матрица», ненадежны.

Следует отметить, что УФ-спектр (б) на рис. 4 соответствует аномальной крайней правой точке на рис. 2, образованной

Таблица 2. Времена удерживания и факторы асимметрии пиков 2,2'-бипиридила для его разных концентраций в растворах при разных содержаниях метанола в составе элюента (измерены при длине волны детектирования 220 нм, расходы элюента 1.0 и 0.7 см³/мин)
 Table 2. Retention times and asymmetry factors of 2,2'-biPy for its different concentrations in solutions and different content of methanol in the eluent (measured at wavelength 220 nm, eluent flow 1.0 and 0.7 cm³/min)

Концентрация 2,2'-биPy в дозируемом растворе, мкг/см ³	Концентрация метанола в элюенте, об. %	Среднее значение t_R , мин (A_S), расход элюента 1.0 мл/мин	Среднее значение t_R , мин (A_S), расход элюента 0.7 см ³ /мин
20	80	3.685 (1.56)	-
	75	3.915 (1.84)	-
	70	4.273 (1.93)	5.952 (1.64)
	65	4.746 (2.09)	6.601 (1.61)
	60	5.512 (2.13)	7.522 (1.59)
	55	6.581 (2.21)	8.825 (1.60)
	50	7.809 (2.57)	10.589 (1.69)
	45	-	13.351 (1.87)
	40	-	17.524 (1.65)
Средние значения A_S		2.05 ± 0.32	1.66 ± 0.10
2.0	80	3.714 (2.98)	-
	75	3.945	-
	70	4.304	5.965 (2.08)
	65	4.792 (2.97)	6.624 (2.11)
	60	5.584 (3.38)	7.551 (1.92)
	55	6.645 (3.14)	8.863 (1.90)
	50	7.882 (3.63)	10.856 (1.84)
	45	-	13.422 (2.22)
	40	-	17.719 (2.03)
Средние значения A_S		3.22 ± 0.28	2.01 ± 0.13

значениями t_R при наибольшем содержании воды в элюенте (70 и 80%), когда равновесие (2) максимально смещено в сторону образования гидрата. Однако при этом в УФ-спектрах 2,2'-биPy не наблюдаются никаких изменений (рис. 4), а приведенные в табл. 1 значения фактора асимметрии (A_S) его пиков за исключением отмеченной аномалии для промежуточной концентрации $C=21.6$ мкг/см³ практически не зависят от содержания ацетонитрила в элюенте и весьма слабо – от концентрации 2,2'-биPy в анализируемых растворах. Средние значения A_S (табл. 1) варьируют всего от 1.9 ($C=216$ мкг/мл) до 1.7 ($C=0.2$ мкг/см³), причем они несколько уменьшаются при значительном уменьшении количества аналита в пробе.

С целью выявления возможных аномалий 2,2'-биPy дополнительно были вычислены относительные оптические плотности для длин волн 254 и 220 нм, $A_{отн}=A(254)/A(220)$. Для малоинтенсивных хроматографических пиков значения $A_{отн}$ сильно зависят от погрешностей интегрирования, а также от присутствия неразделенных с 2,2'-биPy примесей. В таких случаях использование этих параметров не рекомендуется. Поскольку поглощение типичных примесей существенно выше при длине волны 220 нм, это объясняет уменьшение значений $A_{отн}$ при уменьшении концентрации 2,2'-биPy. Например, при содержании CH₃CN в элюенте 80% значения $A_{отн}$ составляют 0.25 ($C=21.6$ мкг/см³), 0.18 ($C=2.2$ мкг/см³), 0.12 ($C=0.22$ мкг/см³) и 0.13 ($C=0.2$ мкг/см³).

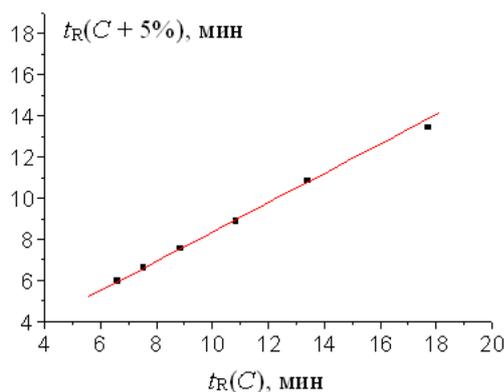


Рис. 5. График рекуррентной аппроксимации времен удерживания 2,2'-биРу в диапазоне концентраций метанола от 70 до 40% об. (концентрация 2,2'-биРу в растворе 2.0 мкг/см³). Расход элюента 0.7 см³/мин. Параметры уравнения линейной регрессии (без учета аномальной точки): $a=0.714\pm 0.007$, $b=1.22\pm 0.08$, $R=0.9998$, $S_0=0.06$.

Fig. 5. Graph of the recurrent approximation of the retention times of 2,2'-biPy in the range of acetonitrile concentrations from 70 to 40 % by vol. (concentrations of 2,2'-biPy in solutions 21.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$). Eluent consumption 1.0 ml/min. Linear regression equation parameters (excluding the anomalous point): $a=0.714\pm 0.007$, $b=1.22\pm 0.08$, $R=0.9998$, $S_0=0.06$.

При содержании CH_3CN в элюенте 20% диапазон вариаций этого параметра сменяется до 0.19-0.07.

Таким образом, из полученных данных следует, что ни УФ-спектры, ни значения фактора асимметрии, ни относительные оптические плотности не могут служить подтверждением обратимой гидратации 2,2'-биРу в ходе его ВЭЖХ анализа. Обусловленные этим аномалии могут быть выявлены только в результате рекуррентной аппроксимации его времен удерживания. Такое же утверждение справедливо для водно-метанольных элюентов.

Аномалии хроматографических параметров 2,2'-бипиридила в системе метанол/вода. Особенностью водно-метанольных элюентов в ОФ ВЭЖХ по сравнению с водно-ацетонитрильными является их значительно большая вязкость [14]. По этой причине для исключения чрезмерного повышения давления в хроматографической системе и, как следствие, возможного несоответствия заданного и установленного расходов элюента, часть экспериментов была выполнена при расходе элюента 0.7 см³/мин вместо 1.0 см³/мин. В табл. 2 приведены времена

удерживания 2,2'-биРу для его растворов с концентрациями 20 и 2.0 мкг/мл в диапазонах содержания метанола в элюенте от 40 до 80% объемн. с шагом 5% при расходах элюента 1.0 и 0.7 см³/мин. Дополнительно указаны значения фактора асимметрии, A_s .

При расходе элюента 0.7 см³/мин замена ацетонитрила в составе элюента на метанол практически не изменяет характер рекуррентной аппроксимации времен удерживания. На рис. 5 приведен такой график для образца с концентрацией 2,2'-биРу 2.0 мкг/см³, на котором крайняя правая точка, соответствующая наибольшему содержанию воды в элюенте, закономерно расположена несколько ниже линии регрессии, что соответствует виду этой зависимости [6-9], типичному для образования гидратов. Это может означать, что 2,2'-биРу образует гидрат, стабильность которого сопоставима с устойчивостью гидрата метанола или превышает ее.

Однако рекуррентная аппроксимация времен удерживания, измеренных при расходе элюента 1.0 см³/мин, приводит к неожиданному результату. Крайняя правая точка на графике оказывается выше

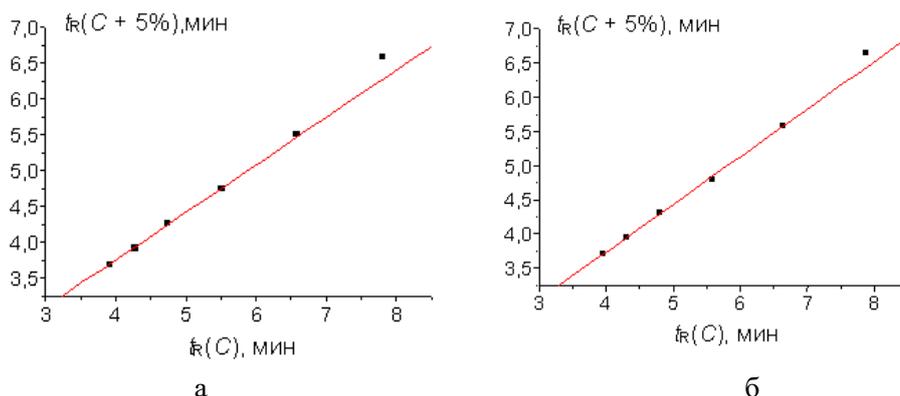


Рис. 6. Графики рекуррентной аппроксимации времен удерживания 2,2'-биРу в диапазоне концентраций метанола от 80 до 50 % об. (концентрации 2,2'-биРу в растворах а) 20 и б) 2.0 мкг/см³). Расход элюента 1.0 см³/мин. Параметры уравнений линейной регрессии (без учета аномальных точек): а) $a=0.68\pm 0.01$, $b=1.01\pm 0.05$, $R=0.9996$, $S_0=0.02$; б) $a=0.69\pm 0.01$, $b=0.99\pm 0.07$, $R=0.9994$, $S_0=0.03$.

Fig. 6. Graphs of the recurrent approximation of the retention times of 2,2'-biRu in the range of acetonitrile concentrations from 80 to 50 % by vol. (concentrations of 2,2'-biRu in solutions а) 20 and б) 21.6 µg/cm³). Eluent consumption 1.0 ml/min. Parameters of linear regression equations (excluding anomalous points): а) $a=0.56\pm 0.02$, $b=0.94\pm 0.05$, $R=0.9993$, $S_0=0.02$; б) $a=0.56\pm 0.01$, $b=0.97\pm 0.03$, $R=0.9994$, $S_0=0.01$.

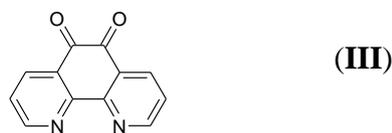
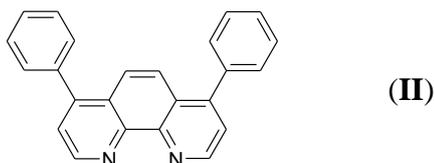
линии регрессии, что никогда не наблюдали ранее [6-9]. В результате численного моделирования [9] было показано, что такие аномалии допустимы лишь теоретически, если при увеличении содержания воды в элюенте образуются более гидрофобные формы аналитов, что вряд ли возможно в случае 2,2'-биРу. На рис. 6 приведены соответствующие графики рекуррентных зависимостей для концентраций 2,2'-биРу в образцах 20 и 2.0 мкг/см³.

В настоящий момент однозначная интерпретация этого необычного явления затруднительна, но перед обсуждением его возможных причин, целесообразно, как и в случае водно-ацетонитрильных элюентов, упомянуть особенности такого вспомогательного хроматографического параметра как асимметрия хроматографических пиков. Средние значения фактора асимметрии (табл. 2), как и в случае водно-ацетонитрильных элюентов, слабо зависят от дозируемых количеств 2,2'-биРу и содержания метанола. Тем не менее, здесь следует отметить два важных момента. Во-первых, значения A_s заметно уменьшаются при уменьшении

расхода элюента с 1.0 до 0.7 см³/мин (с 2.05 до 1.66 при концентрации 2,2'-биРу 20 мкг/см³ и с 3.22 до 2.01 при концентрации 2.0 мкг/см³). Это может свидетельствовать о неравновесном характере хроматографического процесса в ОФ ВЭЖХ для рассматриваемого соединения при относительно большом расходе элюента, тогда как его уменьшение соответствует приближению процесса к равновесному. Среднее значение отношения факторов асимметрии при расходах элюента 1.0/0.7 см³/мин для концентрации 2,2'-биРу 20 мкг/см³ равно 1.7 ± 0.2 , а для концентрации 2.0 мкг/см³ – 1.34 ± 0.12 . Во-вторых, уменьшение концентрации 2,2'-биРу при использовании водно-метанольных элюентов закономерно увеличивает значения A_s в 1.2-1.6 раза (табл. 2), тогда как для водно-ацетонитрильных элюентов такого увеличения не наблюдается.

Таким образом, смещение точек на графиках рекуррентной аппроксимации времен удерживания вверх от линии регрессии не может быть обусловлено образованием более гидрофобных форм 2,2'-

biPy в растворах. Предположения об образовании сольватов 2,2'-biPy с метанолом, которые могут преобладать при высоком содержании метанола в элюенте, так же следует отклонить, так как это приводило бы к аномалиям в области малого содержания воды в элюенте, которые не наблюдаются. В литературе подтверждения образования сольватов 2,2'-biPy с простейшими спиртами найти не удалось. Однако такие данные известны для более сложных структурных аналогов этого соединения с жестко фиксированными положениями атомов азота в структуре молекул. Так, известны гемисольват 4,7-дифенил-1,10-фенантролина (структура II) с метанолом [15] и моносольват 1,10-фенантролин-5,6-диона (структура III) с этанолом [16], которые вполне устойчивы и даже выделены в кристаллическом виде:



Как и при использовании водно-ацетонитрильных элюентов значения относительной оптической плотности $A_{\text{отн}}=A(254)/A(220)$ для длин волн 254 и 220 несколько варьируют в зависимости от концентрации 2,2'-biPy в образцах, но такие вариации, скорее всего, обусловлены влиянием примесей и погрешностями интегрирования площадей малоинтенсивных хроматографических пиков.

Таким образом, при объяснении ранее не наблюдавшейся зависимости особенностей рекуррентной аппроксимации времен удерживания 2,2'-biPy от расхода элюента следует признать, что отклонения точек, соответствующих наибольшему содержанию воды в элюенте, вверх

от линии регрессии не связаны с образованием гидратов или сольватов аналитов. В качестве возможной причины локализации таких точек выше линии рекуррентной регрессии остается предположить неравновесный характер хроматографического процесса. Если для гидратированной формы аналита (схема 1) равновесие в хроматографической системе достигается медленнее, чем для негидратированной, то зона гидрата может несколько «отставать» от зоны негидратированного 2,2'-biPy, что заметнее всего проявляется при большем расходе элюента. Тогда гидрофобность аналита в максимуме хроматографического пика может оказаться относительно большей по сравнению с ее величиной при меньших расходах элюента, что в соответствии с результатами численного моделирования [9] и приводит к смещению точек выше линии регрессии (рис. 6). Если так, то уменьшение расхода элюента приближает процесс хроматографического разделения к равновесному, проявляется в уменьшении асимметрии хроматографических пиков, и объясняет закономерное смещение аномальных точек «вниз» от линии регрессии. Подобные эффекты, несомненно, заслуживают дальнейшего рассмотрения.

Если же вернуться к проблеме характеристики инертности хроматографических систем в ОФ ВЭЖХ, которая послужила отправной точкой настоящей работы, то можно заключить следующее. Сложные процессы с участием 2,2'-бипиридила в содержащих воду элюентах, по видимому, делают его непригодным в качестве тест-компонента для таких целей.

Заключение

На примере особенностей удерживания 2,2'-бипиридила в обращенно-фазовой ВЭЖХ впервые установлено, что их аномалии при максимальном содержании воды в подвижной фазе зависят от рас-

хода элюента. Для выявления таких аномалий использована рекуррентная аппроксимация зависимости времен удерживания от содержания метанола в элюенте. Поскольку 2,2'-бипиридил образует гидрат, то закономерно, что на графиках рекуррентной аппроксимации его времен удерживания при использовании водно-ацетонитрильных элюентов точки, соответствующие наибольшему содержанию воды в элюенте, закономерно отклоняются вниз от линии регрессии. Такая особенность типична для всех образующих гидраты аналитов. Подобная же аномалия наблюдается и при использовании водно-метанольных элюентов при минимальном расходе элюента ($0.7 \text{ см}^3/\text{мин}$). Однако при увеличении расхода элюента (до $1.0 \text{ см}^3/\text{мин}$) соответствующие точки на графиках рекуррентной аппроксимации времен удерживания оказываются выше линии регрессии, что никогда не наблюдали ранее.

Если отклонения точек на графиках рекуррентной аппроксимации вниз от линии регрессии обусловлены свойствами аналитов (образованием гидратов), то зависимость наблюдаемых аномалий от расхода элюента исключает их объяснение только этой причиной. При этом

Список литературы/References

1. Grob K., Grob G., Grob K. Comprehensive, standardized quality test for glass capillary columns. *J. Chromatogr.*, 1978; 156(1): 1-20. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)83129-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)83129-9)
2. Grob K., Grob G., Grob K. Testing capillary gas chromatographic columns. *J. Chromatogr.* 1981; 219(1): 13-20. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)80568-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)80568-3).
3. Zenkevich I.G., Morozova T.E., Klark-Karskaya Yu.F. Inertness criterion for gas-chromatographic systems. *J. Anal. Chem. (Rus.)*. 2014; 69(12): 1130-1140. <https://doi.org/10.1134/S1061934814120156>
4. Zenkevich I.G., Desyatova A.I. Modification of inertness test for gas

необходимо принять во внимание большее влияние расхода элюента на значения фактора асимметрии хроматографических пиков 2,2'-бипиридила при использовании водно-метанольных элюентов, чем в случае водно-ацетонитрильных. Сочетание двух выявленных аномалий: изменение знака отклонений точек на графиках рекуррентной аппроксимации и увеличение фактора асимметрии при увеличении расхода элюента может быть интерпретировано как неравновесный характер хроматографического разделения. При уменьшении расхода элюента система приближается к равновесному состоянию.

Столь детальное рассмотрение особенностей хроматографического удерживания 2,2'-biPy представляется отнюдь не частной проблемой, поскольку аналогичные аномалии могут наблюдаться для соединений и иной химической природы.

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.

chromatographic systems. *Analytics and Control*. 2020; 24(2): 133-141. <https://doi.org/10.15826/analitika.2020.24.2.004>

5. Henry M.S., Hoffman M.Z. Fluorescence from 2,2'-bipyridine. Evidence for covalent hydrate formation. *J. Am. Chem. Soc.* 1977; 99(15): 5201-5203.

6. Zenkevich I.G., Nikitina D.A. Features of the recurrent approximation of retention parameters of polyfunctional compounds in reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Phys. Chem. A*. 2021; 95(2): 395-402. <https://doi.org/10.1134/S003602442102028X>

7. Zenkevich I.G., Nikitina D.A., Kornilova T.A. Recurrent approximation of retention parameters of N-substituted p-toluenesulfonamides in reversed-phase high performance liquid chromatography for



- revealing the formation of their hydrates. *J. Phys. Chem. A*. 2021; 95(9): 1931-1941. <https://doi.org/10.1134/S0036024421090326>
8. Zenkevich I.G., Derouiche A., Nikitina D.A. Detection of organic hydrates in reversed phase high performance liquid chromatography using recurrent approximation of their retention times. *J. Liquid Chromatogr. Related Technol.* 2021; 44(11-12): <https://doi.org/10.1080/10826076.2021.1998905>
9. Zenkevich I.G., Derouiche A. Features and advantages of the recurrent approximation of retention times in reversed-phase high performance liquid chromatography. *Separations*. 2024; 11(3): 69. <https://doi.org/10.3390/separations11030069>
10. Soczewinski E. Quantitative retention-eluent composition relationships in liquid chromatography. *J. Liquid Chromatogr.* 1980; 12: 1781-1806. <https://doi.org/10.1080/01483918008064770>
11. Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd Edn. New York: J. Wiley & Sons, 2009.
12. Saifutdinov B.R., Davankov V.A., Il'in M.M. Thermodynamics of the sorption of 1,3,4-oxadiazole and 1,2,4,5-tetrazine derivatives from solutions on hypercrosslinked polystyrene. *J. Phys. Chem. A*. 2014; 88(3): 358-364. <https://doi.org/10.1134/S0036024414030224>
13. Saifutdinov B.R., Buryak A.K. The influence of water-acetonitrile solvent composition on thermodynamic characterization of adsorption of aromatic heterocycles on octadecyl-bonded silica gels. *Colloid J.* 2019; 87(6): 754-761. <https://doi.org/10.1134/S1061933X19060176>
14. Mikhael S.Z., Kimel W.P. Densities and viscosities of methanol-water mixtures. *J. Chem. Eng. Data*. 1961; 6(4): 533-537. <https://doi.org/10.1021/je60011a015>
15. Martins J.P., Martin-Ramos P., Sobral A.J.F.N., Silva M.R. 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthroline methanol hemisolvate. *Acta Crystallogr. Sect. E*. 2013; E69: o1018. <https://doi.org/10.1107/S1600536813014682>
16. Dai J.-W., Li, Z.-Y., Sato O. 1,10-Phenanthroline-5,6-dione ethanol monosolvate. *Acta Crystallogr. Sect. E*. 2014; E70: o573. <https://doi.org/10.1107/S1600536814008241>

Информация об авторах / Information about the authors

И.Г. Зенкевич – профессор кафедры органической химии, д.х.н., Институт химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия

Д.А. Баранов – выпускник бакалавриата Института химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия

В.М. Косман – к. фарм. н., руководитель химико-аналитической лаборатории АО «Дом фармации», Ленинградская обл., Россия

I.G. Zenkevich – Professor, Dr. Sci, Department of Organic Chemistry, Institute for Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation, E-mail: izenkevich@yandex.ru

D.A. Baranov – bachelor's degree graduate, Institute for Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation, E-mail: st085339@student.spbu.ru

V.M. Kosman – PhD, supervisor of the chemical-analytical laboratory of JSC “House of Pharmacy”, Leningrad district, Russian federation, E-mail: vmkosman@mail.ru

Статья поступила в редакцию 04.09.2024; одобрена после рецензирования 25.09.2024; принята к публикации 02.10.2024.

The article was submitted 04.09.2024; approved after reviewing 25.09.2024; accepted for publication 02.10.2024.