



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544.5.068.7:544.7

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12503

Критический обзор способов определения мертвого времени (объема)

Виктор Иванович Дейнека

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия,
deineka@bsu.edu.ru

Аннотация. В критическом обзоре рассмотрены известные к настоящему времени способы определения мертвого времени, необходимые для расчета факторов удерживания и связанных с ними закономерностей в хроматографии. Обращается внимание на то, что фактор удерживания, определенный в методе теоретических тарелок применительно к хроматографии изначально на сорбентах, в которых нет пор, может быть преобразован в фактор удерживания на пористых сорбентах, отличающихся наличием компонентов подвижной фазы в застойных зонах – в порах сорбента. При этом, однако, зона не удерживаемого сорбата перемещается медленнее истинной скорости перемещения подвижной фазы. Рассматриваются наиболее популярные варианты из ранее предложенных с учетом новых экспериментальных данных. Возможность присутствия в сорбентах галерейных пор ставит под вопрос весовой метод. Кроме того, весовой метод, как и многие другие, не учитывает различие в удерживании веществ, сорбирующихся по адсорбционному или по абсорбционному механизмам. Использование растворителей, смачивающих стационарную фазу, скорее всего, приводит к проникновению молекул растворителей в привитую фазу и должно приводить к получению мертвого объема, применимого к абсорбционному механизму. Если растворитель плохо смачивает стационарную фазу, то смысл полученного мертвого объема становится неопределенным. Расчет мертвого времени по удерживанию дейтерированной воды более приемлем для определения мертвого времени по удерживанию веществ по адсорбционному механизму, но результаты могут быть завышенными из-за сорбции воды на остаточных силанольных группах. Использование дейтерированных органических растворителей для этих же целей вызывает много вопросов. Использование в качестве метчиков мертвого объема неорганических солей может давать не совсем точные результаты по эксклюзионным эффектам, которые и в остальных вариантах следовало бы учитывать. Метод гомологических рядов также не является безусловно корректным по ряду изложенных в тексте причин. Метод системного пика также не может иметь однозначного подтверждения, поскольку может соответствовать удерживанию с неопределенной долей эксклюзионных эффектов. Следовательно, проблема остается к настоящему времени не решенной и требуется разработка новых специальных подходов.

Ключевые слова: мертвое время (объем), способы определения, нормально-фазовая, обращенно-фазовая, гидрофильная ВЭЖХ.

Для цитирования: Дейнека В.И. Критический обзор способов определения мертвого времени (объема) // *Сорбционные и хроматографические процессы. 2024. Т. 24, № 5. С. 631-642.*
<https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12503>

Original article

A critical review of methods for the determination of dead time (volume)

Viktor I. Deineka

Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation, deineka@bsu.edu.ru

Abstract. The critical review examines currently known methods for determining dead time, which are required for calculating retention factors and related patterns in chromatography. Particularly remarkable is the fact that the retention factor, determined using the theoretical plate method in relation to chromatography, initially on sorbents that did not have pores, could be converted into a retention factor on porous sorbents,

characterised by the presence of mobile phase components in stagnant zones, specifically in the pores of the sorbent. However, the zone of unretained sorbent moved slower than the true speed of movement of the mobile phase. The most popular options from those previously proposed were considered, taking into account new experimental data. The possibility of the presence of gallery pores in sorbents called into question the gravimetric method. In addition, the gravimetric method, similar to many others, did not take into account the difference in the retention of solvents sorbed by adsorption or absorption mechanisms. The use of solvents that wet the stationary phase most likely resulted in the penetration of solvent molecules into the graft phase and should result in a dead volume applicable to the absorption mechanism. If the solvent did not wet the stationary phase well, the meaning of the obtained dead volume became uncertain. Calculation of the dead time by the retention of deuterated water was more acceptable for determining the dead time by the retention of substances using the adsorption mechanism, although the results may be overestimated due to the sorption of water on residual silanol groups. The use of deuterated organic solvents for the same purposes raises many questions. The use of inorganic salts as dead volume markers may present not entirely accurate results on exclusion effects, which should be considered in other options as well. The homological series method was also not unconditionally correct for a number of reasons mentioned in the text. The system peak method also could not be unambiguously confirmed, since it may correspond to retention with an indefinite proportion of exclusion effects. Therefore, the problem remains unsolved to date and the development of new special approaches are required.

Keywords: dead time (volume), determination methods, normal-phase, reverse-phase, hydrophilic HPLC

For citation: Deineka V.I. A critical review of methods for the determination of dead time (volume). *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(5): 631-642. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12503>

Введение

В настоящее время – время компьютерной записи и обработки хроматографических сигналов к значимым и истинно измеряемым параметрам хроматографического пика является его ширина на половине высоты и время удерживания (retention time), t_R , мин. Поскольку второй параметр измеряют при заданной скорости потока подвижной фазы, u , см³/мин, то возможен расчет удерживаемого объема:

$$V_R = u \cdot t_R, \text{ см}^3. \quad (1)$$

Но и время удерживания, и удерживаемый объем зависят от ряда параметров хроматографической колонки и хроматографического процесса – таких, как (при заданной температуре) длина и внутренний диаметр хроматографической колонки, заполненной сорбентом, а в случае мертвого объема – и от объемной скорости подачи подвижной фазы. Поэтому наиболее удобным параметром удерживания вещества А становится фактор удерживания, рассчитываемый при дополнительном измерении мертвого времени (hold-up time), t_M , с которым связан мертвый объем, V_M :

$$k(A) = \frac{t_R(A) - t_M}{t_M}. \quad (2)$$

Именно фактор удерживания используется для дальнейших расчетов зависимости удерживания от состава подвижной фазы, зависимости удерживания от температуры. Следовательно, корректность определения мертвого времени, t_M , определяет корректность последующих расчетов.

Для определения физического смысла фактора удерживания выполним следующие преобразования. Вначале рассмотрим процесс хроматографии на непористых частицах сорбента (как это было при построении метода теоретических тарелок [1]). Сорбат А перемещается по слою сорбента, тогда и только тогда, когда находится в подвижной фазе. Если скорость движения подвижной фазы равна u (мл/мин), а вероятность нахождения сорбата А в подвижной фазе равна $p(A)_{mp}$, то скорость перемещения центра зоны сорбата А, $v(A)$, определяется по уравнению (3):

$$v(A) = u \cdot p(A)_{mp}. \quad (3)$$

Вероятность обнаружения вещества А в подвижной фазе равна соотношению количества вещества А в подвижной фазе, $n(A)_{mp}$, моль, к сумме количеств веществ А, находящихся в стационарной, $n(A)_{sp}$ и в подвижной фазах на любом участке колонки:

$$p(A)_{mp} = \frac{n(A)_{mp}}{n(A)_{mp} + n(A)_{sp}}. \quad (4)$$

Разделим числитель и знаменатель дроби (4) на ее числитель:

$$p(A)_{mp} = \frac{1}{1+k(A)}. \quad (5)$$

Здесь определяется физический смысл фактора удерживания $k(A)$ как соотношение количеств вещества на (или в) стационарной фазе по отношению к его количеству в подвижной фазе на любом участке колонки:

$$k(A) = \frac{n(A)_{sp}}{n(A)_{mp}}. \quad (6)$$

Таким образом, скорость перемещения зоны сорбата А равна:

$$v(A) = u \cdot \frac{1}{1+k(A)}. \quad (7)$$

Для установления связи между уравнениями (2) и (5) разделим мертвый объем на левую и правую части уравнения (7):

$$\frac{V_M}{v(A)} = \frac{V_M}{u} \cdot (1 + k(A)),$$

или

$$t_R(A) = t_M \cdot (1 + k(A)), \quad (8)$$

получив уравнение, эквивалентное уравнению (2).

Приведенные выше уравнения справедливы в том случае, если фактор удерживания постоянен по всей длине колонки. При этом под скоростью движения зоны сорбата А необходимо понимать скорость движения максимума интенсивности этой зоны. Но по мере продвижения зоны происходит ее размывание, т.е. меняются количества сорбата А в единице объема как в подвижной, так и в стационарной фазах. Поэтому соотношение (4) остается константой только при использовании малых концентраций сорбата – если система находится в области линейности изотермы сорбции. Эту область принято называть областью Генри. Отметим, что изначально уравнение Генри линейно связывало концентрацию вещества Б в растворе, находящимся в равновесии с газовой фазой с заданным парциальным давлением Б. Т.е. связывались абсолютные количества веществ в

обеих фазах. С другой стороны, при изучении адсорбционных равновесий традиционным статическим методом можно определить только избыточную сорбцию веществ, но это уже не хроматографическая проблема. Поэтому не понятно, зачем вводить избыточную сорбцию для искажения связи между фактором удерживания и константой распределения [2], если эти оба понятия относятся к хроматографии.

Реальные сорбенты в жидкостной хроматографии – пористые частицы. В этих случаях подвижная фаза заполняет не только межчастичный объем (V_0), но и объем пустот в них (V_i). Скорость уравнивания состава подвижной фазы между этими объемами определяет эффективность хроматографической системы (т.е. ширину пика на хроматограмме). Поэтому уравнение (4) необходимо преобразовать с учетом наличия двух типов пор, из которых только в межчастичном (V_0) пространстве наблюдается динамическое движение подвижной фазы вторая фаза (V_i) остается застойной:

$$p(A)_{mp} = \frac{n(A)_{V_0}}{n(A)_{V_0} + n(A)_{V_i} + n(A)_{sp}}. \quad (9)$$

Однако если принять соотношение (9), но заменить мертвый объем на сумму межчастичного (движущегося) и внутричастичного (застойного!) объемов:

$$V_M = V_0 + V_i, \quad (10)$$

а для фактора удерживания использовать формулу, учитывающую сумму количеств веществ в этих же объемах:

$$k(A) = \frac{n(A)_{sp}}{n(A)_{mp(V_0)} + n(A)_{mp(V_i)}}, \quad 1)$$

то нетрудно показать, что уравнение (2) остается неизменным. Следовательно, фактор удерживания равен соотношению количества вещества А на (или в) стационарной фазе к сумме количеств вещества А в движущейся и застойной частях подвижной фазы. Отметим также, что при такой замене скорость перемещения условной зоны мертвого объема оказывается меньше заданной прибором скорости подачи подвижной фазы.

Итак, для последующих расчетов принципиально важным является корректное определение мертвого времени. Наиболее простое решение задачи возможно в адсорбционной хроматографии, т.е. при нормально-фазовой или в некоторых случаях – в обращенно-фазовой хроматографии. В этом случае можно считать, что сорбция происходит в некотором сорбционном слое – и для хроматографии нет необходимости знать толщину этого слоя. В литературе имеется много обзоров по определению этого параметра – остановимся на некоторых из них [3-8].

При определении t_M необходимо в общем случае учитывать, что в обращенно-фазовой ВЭЖХ признается существование двух принципиально различающихся механизмов удерживания – абсорбционного (распределительного) и адсорбционного [9]. Специфика строения привитого октадецильного слоя «мономерных» обращенных фаз, состоит в том, что этот слой содержит неплотно упакованные алкильные радикалы, между которыми для уплотнения могло бы поместиться еще такое же количество алкильных групп [10]. Из этого вытекает очевидное следствие – некоторые сорбаты способны проникать либо полностью, либо частично, как в «поплавочном механизме» [11], в привитой слой, поэтому для них мертвый объем может отличаться от мертвого объема, который следует использовать для расчета фактора удерживания соединений, гидрофобно выталкиваемых на поверхность C18-фазы. Следовательно, необходимо доказательство пригодности определяемой величины V_m для каждого конкретного случая.

Способ 1. Весовой (пикнометрический) метод

Для расчета V_M предлагается определить массы (m_1 и m_2) хроматографической колонки, заполненной последовательно двумя различными растворите-

лями, полностью смачивающими стационарную фазу, но имеющими различную плотность (ρ_1 и ρ_2). В таком случае вследствие равенства объемов этих растворителей справедливо соотношение:

$$V_M(\rho_2 - \rho_1) = m_2 - m_1. \quad (12)$$

Метод наиболее приемлем для нормально-фазовой хроматографии. Но в любом случае он не учитывает возможность существования в сорбенте галерейных пор [12]. Действительно, высота эквивалентной теоретической колонки (пространства, на котором устанавливается равновесие) составляет несколько микрометров [13]. В этом отношении требование пропускания 10-20 объемов новой подвижной фазы, необходимых для уравнивания хроматографической системы [14], говорит о некотором другом равновесии. Это может быть, например, равновесие между движущейся частью подвижной фазы и объемом части галерейных пор, наиболее удаленных от поверхности. Поэтому не удивительно, что в работе [3] признается, что весовой метод дает максимальное значение V_M . И, следовательно, определяемый по этому варианту мертвый объем может превышать мертвый объем, необходимый для расчета фактора удерживания для веществ, удерживаемых даже по распределительному механизму, не говоря уже об сорбатах, удерживаемых по адсорбционному механизму.

В методе предложены и варианты определения как V_0 , так и V_i [15]. Для этого необходимо:

а) заполнить колонку растворителем с известной плотностью ρ_1 , смачивающим сорбент, например, изопропанолом, пропуская его со скоростью 0.2 см³/мин в течение 60 мин и определить массу колонки, m_1 ;

б) заполнить колонку другим гидрофобным растворителем также с известной плотностью ρ_2 , который удерживался бы в порах сорбента при пропускании гидрофильного растворителя, получив массу колонки m_2 ;

в) пропустить через колонку гидрофильный буферный раствор (со скоростью $0.25 \text{ см}^3/\text{мин}$, пропустив 20 объемов колонки) с плотностью ρ_3 , который вытеснит предыдущий растворитель из межчастичного пространства, получив массу колонки m_3 ;

г) для надежности повторить измерения, заменив использованные растворители на другие с такими же свойствами.

Затем производят расчеты:

$$V_M = \frac{m_2 - m_1}{(\rho_2 - \rho_1)}. \quad (13)$$

$$V_0 = \frac{m_3 - m_2}{(\rho_3 - \rho_2)}. \quad (14)$$

$$V_i = V_M - V_0. \quad (15)$$

Поскольку органические растворители проникают не только в галерейные поры, но и в пространство между алкильными радикалами привитой фазы, то рассмотренный способ позволяет определить увеличенный на объем галерейных пор мертвый объем колонки для распределительного механизма удерживания. Важно также и то, что рассматриваемый способ предполагает, что мертвый объем не зависит от типа элюентной системы и от конкретного состава подвижной фазы, хотя на зависимость необходимого для расчета термодинамических характеристик мертвого объема от типа органического модификатора и его концентрации указывали в работе [16].

Способ 2. Использование нейтрального метчика мертвого времени

Для реализации этого способа в реальных экспериментах предложено большое количество различных вариантов. Среди предложенных маркеров – дейтерированная вода, метанол или ацетонитрил, неорганические соли, органические соединения: урацил, цитозин, ацетон, диметилформамид, мочеви́на, тиомочеви́на, флороглюцин [4]. В цитируемой работе авторы констатируют, что определению «истинного» («true») объема мешают эффекты эксклюзии по размеру и/или по заряду, отрицательная адсорбция и сорбция метчиков мертвого объема. Если с первой

причиной можно полностью согласиться, то отрицательная сорбция для хроматографии лишена смысла, поскольку термин применим к исследованию сорбции статическим методом, поскольку в хроматографии мертвый объем относится только к удерживанию вещества с нулевой абсолютной (т.е. с отрицательной избыточной) сорбцией. А применение метчиков, частично удерживаемых сорбентом, приводит к большим или меньшим ошибкам. Поэтому вывод о том, что лучший вариант определения V_M – использовании в качестве метчика дейтерированных компонентов подвижной фазы в обращенно-фазовой хроматографии (неудобство которого связывают с необходимостью использования рефрактометрического детектора) в значительной мере ошибочен. Во-первых, хорошо известно, что органические модификаторы накапливаются в привитом слое [17], т.е. удерживаются сорбентом, поэтому не могут быть метчиками мертвого объема. Во-вторых, одно странное заблуждение часто употребляется в публикациях о хроматографии. По этому заблуждению скорость перемещения зоны сорбата вместо простой и наглядной формулы (7) задается иначе [18]:

$$u = \frac{F}{V'_0 + S' \frac{d\Gamma}{dc}}, \quad (16)$$

где u – объемная скорость перемещения зоны сорбата, F – объемная скорость перемещения подвижной фазы, V'_0 и S' – объем подвижной фазы и удельная поверхность сорбента на единицу длины колонки, а $\frac{d\Gamma}{dc}$ – производная избыточной сорбции по равновесной концентрации сорбата в подвижной фазе. Поскольку достаточно быстро при росте равновесной концентрации органического модификатора в подвижной фазе производная приближается к нулю, то создается иллюзия о нулевом удерживании органического модификатора. Но на самом деле это не так. Во-первых, автор работы [18] использует понятие избыточной сорбции,

не применимое, как отмечалось выше, к хроматографии. Во-вторых, скорость перемещения сорбата (или органического модификатора подвижной фазы) зависит не от использованной в уравнении (16) производной, а от соотношения количеств веществ в стационарной и подвижной фазах, и это соотношение отличается от нуля в любом случае. Поэтому метод будет давать завышенные результаты даже для сорбатов, удерживаемых по распределительному механизму, а непригодность в общем случае такого параметра для веществ, удерживаемых по адсорбционному механизму, очевидна. Несколько иная ситуация с использованием дейтерированной воды, как вещества, не удерживаемого привитыми радикалами обращенной фазы. Однако вода удерживается на остаточных силанольных группах, что также может увеличить мертвое время уже для веществ, удерживаемых по адсорбционному механизму. Но такая опасность существует при использовании любых полярных метчиков.

Тем не менее, использование «несорбируемых» метчиков являются наиболее простым и легко реализуемым способом оценки мертвого времени для веществ, удерживаемых по адсорбционному механизму, хотя неопределенность в надежности этого способа остается и вряд ли удастся ее устранить. Дело в том, что по нашему опыту воспроизводимость времен удерживания «несорбируемых» метчиков достаточно высока (расхождение не более долей секунды), но само время явно зависит от состава подвижной фазы. Скорее всего, для возможности сопоставления результатов, полученных различными исследователями следует договориться о том, как и для каких составов подвижной фазы рассчитывать t_M . Неодинаковые величины этого параметра для различных составов подвижных фаз могут свидетельствовать не только о частичном удерживании метчика, но и об объективных эффектах в хроматографической системе. Если определенное таким образом

мертвое время окажется больше, чем время удерживания некоторого конкретного вещества, то причиной могут быть эксклюзионные эффекты для этого вещества.

Из поглощающих электромагнитное излучение в УФ-области метчиков мертвого времени для нормально-фазовой ВЭЖХ рекомендуется использование бензола или тетрахлорэтилена. При этом объем, оцененный этими метчиком, оказывается меньше, чем при использовании дейтерированных компонентов подвижной фазы, причиной чему, по мнению авторов [4], является эксклюзия по размерам, поскольку результат зависел от порового распределения сорбента. Эти результаты были получены сопоставлением удерживания метчиков (и погрешностей определения V_M) с мертвым объемом, определенным по удерживанию CD_2Cl_2 при использовании дихлорметана в качестве элюента. Заметим, что дихлорметан как дейтерированный, так и не дейтерированный, являются полярными соединениями (имеют ненулевой дипольный момент), т.е. в некоторой степени удерживаются силикагелем. Именно поэтому они дают завышенное значение мертвого объема. Нулевое удерживание *n*-гексана (как основного неполярного компонента подвижной фазы) можно признать достаточно обоснованным, т.е. его удерживание на силикагеле близко к нулю. При этом нулевое удерживание дейтерированной воды в нормально-фазовой хроматографии – это явное заблуждение, особенно с учетом работ, в которых обнаружено три слоя воды на силикагеле с большими проблемами с удалением сорбированной воды из первого слоя [19].

Для обращенно-фазовой хроматографии авторами работы [4] также предлагается в качестве требуемого метчика использовать дейтерированные органические модификаторы; при этом признается, что их удерживание наблюдается, но только при концентрациях органического модификатора в подвижных фазах



менее 20 об.%. Из УФ-поглощающих метчиков рекомендован нитрометан, но только если элюентами являются метанол или ацетонитрил при их содержании 100 об. %. При использовании водно-органических подвижных фаз при содержании воды более 5 об.% нитрометан начинает также удерживаться. Отметим также, что формально в цитируемой работе считается, что мертвый объем не должен зависеть от типа модификатора и его концентрации в подвижной фазе.

Способ 2а. Метчики – неорганические соединения

Этот способ получил широкое практическое распространение в обращенно-фазовой хроматографии [5] благодаря простоте, доступности, возможности УФ-детектирования и различия по размерам. Однако, основной недостаток способа – возможность эксклюзии по заряду. Для преодоления этого эффекта предложено использовать буферные растворы или высокие концентрации солей для маскировки заряда остаточных силанольных групп. При этом удерживание солей может зависеть от pH. Но в целом, результаты, полученные различными авторами, не совпадают, и в ряде публикаций, см. [5], эффект эксклюзии по заряду не обнаружен, поэтому рекомендовано использовать в качестве надежного метчика нитрат или нитрит натрия.

Различие в результатах использования неорганических солей в качестве метчиков мертвого времени не удивительны, поскольку в технологии приготовления обращенных фаз произошли существенные изменения, включающие не только гидрофобный, но гидрофильный эндкепинг. При этом нежелание разбираться в механизмах сорбции (адсорбционном или абсорбционном) ставит под сомнение любые выводы о влиянии метчика на мертвый объем, а вопрос о том какой мертвый объем необходим для конкретных расчетов ни в одной из известных нам работ вообще не поднимался.

Способ 3. Использование набора сорбатов из одного и того же гомологического ряда

Способ основан на предположении о равенстве селективностей разделения последовательных гомологов ($n, n+1, n+2, \dots$) в некоторых хроматографических условиях [4-8], которое выражается уравнением (17), позволяющим рассчитать искомое время, t_M :

$$\frac{t_{n+1}-t_M}{t_n-t_M} = \frac{t_{n+2}-t_M}{t_{n+1}-t_M} \quad (17)$$

При этом известно несколько особенностей применения этого метода.

Во-первых, из рассмотрения удаляются первые два гомолога, объяснение чему можно получить, используя закономерности классификации атомов по типам и видам, предложенной В.М. Татевским (см. [20]). Во-вторых, в ряду гомологов в зависимости от длины привитых алкильных групп сорбентов, наблюдаются изломы прямых линий на графиках зависимости логарифма фактора удерживания от числа атомов углерода в углеводородном радикале гомологов [21]. Этот эффект связывают с конформационными изменениями молекул больших размеров гомологов в подвижной фазе.

$$\lg k(i) = a + b \cdot n. \quad (18)$$

Вследствие такого излома различаются результаты определения V_M , полученные с использованием серий гомологов, последовательно ограниченных со стороны гомологов меньшими n (начиная с серии от $n = 5$ до $n = 10$). Такой эксперимент приводит к заметно различающимся между собой результатами определения мертвого объема - от 0.842 см³ для серии из восьми гомологов до 1.280 см³ для трех, несмотря на очень высокие коэффициенты корреляции (более пяти десятков [3]).

Для группы гомологов мертвое время может быть получено [22] обработкой экспериментальных данных по уравнению (19):

$$t_R(n+1) = a \cdot t_R(n) + (1-a) \cdot t_M, \quad (19)$$

где сопоставляются времена удерживания гомологов (n и $n+1$), a – наклон линии тренда; при этом используется метод наименьших квадратов.

В то же время линейность соотношения (18) не очевидна. По мнению авторов работы [21] это связано с изменением конформационных состояний по мере роста длины алкильного радикала. В работе [22] было обращено внимание, что для гомологов при исключении первых двух членов гомологического ряда линейность в энтальпии сорбции весьма вероятна, но этого нельзя сказать про энтропию этого процесса. Но предложение линейности в уравнениях (18) и (19) очень привлекательно, в таком приближении для метода определения V_M предоставляет термодинамическое обоснование и метод пригоден для расчета энтальпии переноса веществ из подвижной фазы не *на*, а *в* стационарную. Поскольку алкильные радикалы проникают в стационарную фазу, возникают вопросы о применимости величин V_M , полученных с использованием несорбируемых веществ, если механизм удерживания не установлен. В работе [23] было установлено, что время удерживания, определенное по ряду гомологов, оказалось меньше, чем по удерживанию не сорбируемого соединения. Следовательно, в обращенно-фазовой хроматографии перед определением V_M , необходимо разобраться с механизмами удерживания для выбора способа определения этой характеристики.

Наконец кроме обычных эксклюзионных эффектов существует еще один особый случай. Этот случай связан с удерживанием веществ, размер которых больше 10% от среднего размера пор сорбента, – в этом случае, например, для эфиров ксантофиллов мертвый объем, определенный по гомологам, оказывается даже меньше мертвого объема, определенного по несорбируемому компоненту [24]. Кроме того, по опыту работы нашей лаборатории мертвое время, определенное

по удерживанию гомологов, может оказаться и меньше мертвого времени, определенного по удерживанию вещества с относительно небольшими размерами.

Инкрементные соотношения между удерживанием триацилглицеринов указывают на то, что вместо гомологов (триацилглицеринов, образованных насыщенными жирными кислотами) можно воспользоваться рядом псевдогомологов, например, серией из четырех триацилглицеринов: трилинолеата, дилинолеата-олеата, диолеата-линолеата и триолеата [25].

Способ 4. Метод возмущения потока или системного пика

Единственное достоинство метода – кажущаяся простота. В обращенно-фазовой ВЭЖХ предполагает ввод в качестве пробы чистого компонента с наименьшим удерживанием, т.е. воды. С точки зрения физического смысла при таком способе наблюдают возмещение нулевой линии вследствие изменения коэффициентов преломления растворов, попадающих в кювету, приводящих к отклонению луча от заданного в приборе направления. Сомнительность корректности данного способа подтверждается тем, что результат зависит от состава подвижной фазы [5], поэтому рассматривают всю элюэнтную систему и рассчитывают среднее значение. В неудачном варианте системный пик может показывать удерживания примесей, не попадающих в поры сорбента по причинам эксклюзии. Но по литературным данным результаты, полученные по этому методу очень близки к результатам, полученным с использованием ряда гомологов, хотя появление сложного многопикового профиля осложняет интерпретацию: так предполагается, что первый пик соответствует удерживанию воды, а второй – вакансионный пик. При вводе пробы того же состава, что и подвижная фаза такой пик обнаружить трудно, поэтому применяют



пробы с изотопно-меченным компонентом. D₂O удобно использовать даже с УФ-детектором, но, получая сходимые результаты для систем «ацетонитрил – вода» и «метанол – вода», на подвижные фазы на основе тетрагидрофурана следует исключить.

В работе [26] определение V_M также предлагается выполнять по системному пику, но при этом в качестве критерия правильности получаемых результатов предлагают сопоставлять их с объемом, рассчитанным по формуле (20) для колонок со внутренним диаметром 4.6 мм:

$$V_M = 0.01 \cdot L, \quad (20)$$

где мертвый объем измеряется в мл, а длина колонки – в мм. Так, например, для колонки с размерами 150×4.6 мм мертвый объем составит 1.5 см³, а для колонки с другим диаметром, d_c , 50×2.1 мм – 0.11 см³, используя уравнение:

$$V_M = 0.5 \cdot L \cdot d_c^2 / 1000. \quad (21)$$

Автор считает, что если объем окажется больше рассчитанного, то это свидетельствует о проблемах со скоростью подачи подвижной фазы. Если объем меньше рассчитанного, то либо снова проблемы с потоком элюента, либо возникают эксклюзионные эффекты (по размеру), либо по заряду.

Мертвое время для колонок с истинно полимерными сорбентами

Истинно полимерные сорбенты – сополимеры стирола и дивинилбензола и сверхсшитые полистиролы, получили заметное распространение в последнее время благодаря технологиям жесткой сшивки с образованием ненабухающих (или мало набухающих в растворителях) частиц. Такие сорбенты по сорбционным свойствам близки к обращенно-фазовым. Разумеется, в этом случае реализуется только адсорбционный механизм удерживания при исключении абсорбционного, что существенно упрощает исследование свойств колонок.

Сопоставление методов определения мертвого времени выполнено в работе

[27]. В работе использовали колонку 4.1×150 мм, заполненную сополимером дивинилбензола и стирола в подвижной фазе, содержащей ацетонитрил и буферный раствор ацетата аммония с pH 4.6, при скорости подачи 1 см³/мин. При этом для различных маркеров t_M получены следующие результаты: 1.26 (вода), 1.26 (NaNO₃), 1.30 (урацил), 1.28 (мочевина), 1.32 формамид и 1.76 мин (ацетон). Расчет (выполненный в настоящей работе) по представленным в работе [27] данным по удерживанию двух рядов гомологов привел к следующим результатам 1.26 мин для ряда алкилбензолов и 0.89 для 1-алканолов. Из этого следует, что алкилбензолы дают лучше результат, если считать, что высоко полярная вода и нитрат натрия не будут удерживаться на неполярном сорбенте. Малое значение мертвого объема, рассчитанного по формуле (18), может свидетельствовать о том, что при сорбции алканолов на поверхности сорбента появляются полярные группы, которые могут дополнительно сорбировать алканолы вследствие полярных взаимодействий, т.е. удерживание членов гомологического ряда усиливается не только вследствие добавления метиленовых групп, но и вследствие дополнительной полярной сорбции. Следовательно, к выбору рядов гомологов для расчета мертвого времени колонок с полимерными сорбентами следует относиться с осторожностью, понимая, что сорбция приводит к модификации поверхности сорбента. Отметим, что в цитируемой работе из-за ошибки в расчетах авторы пришли к обратному выводу о выборе рядов гомологов.

Мертвое время колонок для гидрофильной хроматографии

Этот перспективный вариант хроматографии, в котором элюирование сорбатов происходит по мере увеличения их полярности (как в нормально-фазовой хроматографии). Метод уникален тем, что

удерживание обеспечивается генерированным *in situ* слоем, обогащенным водой, из водно-органической подвижной фазы, обогащенной органическим модификатором. По этой причине весовой метод определения не имеет никакого смысла. Поскольку стационарная фаза оказывается существенно более гидрофильной по сравнению с подвижной фазой, то неполярные метчики (с низкими кислотностью и основностью) могут быть использованы для определения V_M . И действительно, в работе [28], показано хорошее совпадение удерживания толуола, используемого в качестве метчика V_M , с расчетным значением V_M , полученным для гомологического ряда от толуола до гептадецилбензола. Правда настоятельно отмечает тот факт, что сравнительные результаты зависели от размера пор сорбентов, что напоминает ситуацию с определением этого параметра для эфиров ксантофиллов, осложненные большим соотношением размера тестовых молекул к размеру пор [24].

В работе [29] определили полный объем колонок для гидрофильной хрома-

тографии используя весовой метод – вначале с водой, а затем с органическими растворителями, получив при этом одинаковые (в пределах погрешности метода) результаты – $1.950 \pm 0.016 \text{ см}^3$ для ацетонитрила и $1.946 \pm 0.009 \text{ см}^3$ для метанола для колонки ZIC-HILIC.

Заключение

Таким образом, определение мертвого времени хроматографических систем к настоящему времени не является окончательно решенной проблемой. Особенно это касается обращенно-фазовой хроматографии, для которой в соответствующих работах не делают различий между веществами, удерживаемыми по распределительному и по адсорбционному механизмам.

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.

Список литературы/References

1. Martin A.J.P., Synge R.L.M. A new form of chromatogram employing two liquid phases. I. Theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *Biochem J.* 1941; 35: 1358-1368. <https://doi.org/10.1042/bj0351358>

2. Saifutdinov B.R. On the interrelation between the distribution constant and the retention factor in liquid chromatography. *Russ. J. Phys. Chem.* 2013; 87: 512-515. <https://doi.org/10.1134/S0036024413030266>

3. Krstulovle A.M., Colin H., Guiochon G. Comparison of Methods Used for the Determination of Void Volume in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 1982; 54: 2438-2443. <https://doi.org/10.1021/ac00251a009>

4. Engelhardt H., Müller H., Dreyer B. Is There a "True" Dead Volume for HPLC Columns? *Chromatographia.* 1984; 19: 240-245. <https://doi.org/10.1007/BF02687745>

5. Rimmer C.A., Simmons C.R., Dorsey J.G. The measurement and meaning of void volumes in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2002; 965: 219-232. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00730-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00730-6)

6. Tsopelas F., Ochsenkühn-Petropoulou M., Tsantili-Kakoulidou A. Void volume markers in reversed-phase and biomimetic liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2010; 1217: 2847-2854. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.062>

7. Jiang P., Wu D., Lucy C.A. Determination of void volume in normal phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2014; 1324: 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.11.019>



8. Djerki R.A., Laub R.J. Solute Retention in Column Liquid Chromatography: IX. Comparison of Methods of Determination of the Void Volume in Liquid-Liquid Chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 1987. 10: 1749-1767. <https://doi.org/10.1080/01483918708066797>
9. Dorsey J.G., Dill K.A. The Molecular Mechanism of Retention in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Chem. Rev.* 1989; 89: 331-346. <https://doi.org/10.1021/cr00092a005>
10. Deineka V.I., Nguyen A.V., Deineka L.A. Model of a Reversed Phase Grafted on Silica Gel. *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2019; 93: 2490-2493. <https://doi.org/10.1134/S0036024419120057>
11. Deineka V.I., Deineka L.A., Saenko I.I., Chulkov A.N. A Float Mechanism of Retention in Reversed-Phase Chromatography. *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2015; 89: 1300-1304. <https://doi.org/10.1134/S0036024415070079>
12. Deineka V.I., Deineka L.A., Sidorov A.N., Saenko I.I., Kostenko M.O. The evaluation of the properties of the solid-phase extraction cartridge sorbents: the role of the «gallery» pores. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy.* 2016; 16: 624-630. (In Russ.)
13. Gritti F., Guiochon G. The van Deemter equation: Assumptions, limits, and adjustment to modern high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2013; 1302: 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.032>
14. Dolan J.W. Slow Column Equilibration. *LCGC North America.* 2015; 33: 102-107.
15. Devitt N.M., Moran R.E., Godinho J.M., Wagner B.M., Schure M.R. Measuring porosities of chromatographic columns utilizing a mass-based total pore-blocking method: Superficially porous particles and pore-blocking critical pressure mechanism. *J. Chromatogr. A.* 2019; 1595: 117-126. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.02.045>
16. Deineka V.I. Nekotorye termodinamicheskie aspekty povedeniya veshchestv v usloviyah obrashcheno-fazovoj hromatografii. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy.* 2006; 6: 571-580. (In Russ.)
17. Yonker C.R., Zwier T.A., Burke M.F. Investigation of stationary phase formation for RP-18 using various organic modifiers. *J. Chromatogr.* 1982; 241: 269-380. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)81752-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)81752-5)
18. Kazakevitch Yu.V., Eltekov Yu.A. Thermodynamic Interpretation of the Capacity Factor. *Chromatographia.* 1988; 25: 965-968. <https://doi.org/10.1007/BF02259413>
19. Scott R.P.W., Traiman S. Solute-solvent interactions on the surface of silica gel: III. Multilayer adsorption of water on the surface of silica gel. *J. Chromatogr.* 1980; 196: 193-205. [doi/10.1016/S0021-9673\(00\)80439-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)80439-2).
20. Deineka V.I., Makarevich S.L., Blianova I.P., Deineka L.A. Determining the enthalpy of the transfer of anthocyanidins from the mobile phase to the stationary phase during reversed-phase chromatography on a C18 stationary phase. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy.* 2022; 22: 386-392. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10565>
21. Tchapla A., Colin H., Guiochon G. Linearity of Homologous Series Retention Plots in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 1984; 56: 621-625. <https://doi.org/10.1021/ac00268a007>
22. Fleming P. Column Dead-time Determination Methods Based on the Isothermal Retention-time Behaviour of a Homologous Series in Chromatography. *Analyst.* 1992; 117: 1553-1557. <https://doi.org/10.1039/AN9921701553>
23. Berendsen G.E., Schoenmakers P.J., de Galan L., Vigh G., Varga-puchony Z., Inczedy J. On the Determination of the Hold-Up Time in Reversed Phase Liquid Chromatography. *J. Liq. Chrom.* 1980; 3: 1669-1686. <https://doi.org/10.1080/01483918008064759>



24. Deineka V.I., Staroverov S.M., Vasilyarov G.G., Burzhinskaya T.G., Blinova I.P. Specific Features of the Retention of Lutein Diesters on C16 Stationary Phases with Different Pore Diameters. *Russ. J. Phys. Chem.* 2023; 97: 1802-1805. <https://doi.org/10.1134/S0036024423080034>

25. Deineka V.I., Deineka L.A., Turtygin A.V. Method of the relative retention analysis: reversed-phase HPLC of triglycerides. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2008; 8: 465-477. (In Russ.)

26. Dolan J.W. Column dead time as diagnostic tool. *LCGC North America*. 2014; 32: 24-29.

27. Nowotnik D.P., Narra R.K. A Comparison of Methods for the Determination of

Dead Time in a Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography System Used for the Measurement of Lipophilicity. *J. Liq. Chromatogr.* 1993; 16: 3919-3932. <https://doi.org/10.1080/10826079308019677>

28. McCalley D.V. Evaluation of a linear free energy relationship for the determination of the column void volume in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*. 2021; 1638: 461849. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461849>

29. Redón L., Subirats X., Rosés M. Evaluation of Hold-Up Volume Determination Methods and Markers in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *Molecules*. 2023; 28: 1372. <https://doi.org/10.3390/molecules28031372>

Информация об авторах / Information about the authors

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

V.I. Deineka – Professor of General Chemistry Department. Dr. Sci.(Chemistry), Belgorod State University, Belgorod, Russia, e-mail: deineka@bsu.edu.ru

Статья поступила в редакцию 16.06.2024; одобрена после рецензирования 28.08.2024; принята к публикации 04.09.2024.

The article was submitted 16.06.2024; approved after reviewing 28.08.2024; accepted for publication 04.09.2024.