



## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544:544.72.02

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12504

### Сопоставление двух способов определения мертвого времени колонки в обращенно-фазовой ВЭЖХ

Виктор Иванович Дейнека<sup>✉</sup>

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия,  
deineka@bsu.edu.ru<sup>✉</sup>

**Аннотация.** В работе были сопоставлены мертвые времена хроматографических систем, определенные двумя различными способами. По одному способу в качестве метчика мертвого времени использовали урацил. По другому способу мертвое время рассчитывали по удерживанию гомологов – гексилового, гептилового, октилового и нонилового эфиров *para*-нитробензойной кислоты. Проведенные исследования показали, что найденные времена могут существенно различаться. Так, в элюентах с метанолом в качестве органического модификатора подвижной фазы мертвое время, определенное по удерживанию урацила, оказывается больше такого параметра, рассчитанного по удерживанию гомологов. В то же время, для элюентов на основе ацетонитрила соотношение полученных параметров противоположное – мертвое время, рассчитанное по удерживанию эфиров, оказалось больше определенного по урацилу. При этом метиленовая разность, признаваемая постоянной для гомологов, сохраняется только при использовании мертвого времени, рассчитанного по удерживанию использованных в работе эфиров. Из этого следует, что при всех физико-химических расчетах для получения корректных факторов удерживания необходимо определить механизм удерживания каждого сорбата и выбрать подходящий для расчетов способ расчета факторов удерживания и связанных с ним параметров (например, энтальпий переноса сорбатов с подвижной фазы на стационарную). Для решения вопроса о механизме удерживания предложено использование двух колонок со стационарными фазами одной марки, но с различной длиной привитого радикала. Если используется фаза C18, то ее замена, например, на фазу C8 при одном и том же составе подвижной фазы и температуре должна привести к снижению времени удерживания более чем в два раза при распределительном механизме удерживания. Различия в полученных результатах для подвижных фаз на основе метанола с одной стороны и ацетонитрила – с другой требует дополнительных исследований.

**Ключевые слова:** ВЭЖХ, мертвое время, способы определения, механизмы удерживания.

**Для цитирования:** Дейнека В.И. Сопоставление двух способов определения мертвого времени колонки в обращенно-фазовой ВЭЖХ // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 5. С. 643-651. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12504>

Original article

### A comparison of two methods for the determination of dead time of a column in reverse-phase HPLC

Viktor I. Deineka<sup>✉</sup>

Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation, deineka@bsu.edu.ru<sup>✉</sup>

**Abstract.** The dead times of chromatographic systems, determined using two different methods, were compared in this work. For one method, uracil was used as a dead time marker. As for the other method, the dead time was calculated by the retention of homologues – hexyl, heptyl, octyl, and nonyl esters of *para*-nitrobenzoic acid. The conducted studies showed that the resulting times could vary significantly. Thus, in eluents with methanol as an organic modifier of the mobile phase, the dead time determined by the retention of uracil was greater than the same parameter calculated by the retention of homologues. Meanwhile, for acetonitrile-based eluents, the ratio of the obtained parameters was the opposite: the dead time calculated by ether retention was

greater than the time determined by uracil. The methylene difference, which was recognised as constant for homologues, was preserved only when using the dead time calculated by the retention of esters used in the work. Therefore, for all physico-chemical calculations, it is necessary to determine the retention mechanism of each sorbate and choose a suitable method for calculating retention factors and related parameters (for example, the enthalpies of sorbate transfer from the mobile phase to the stationary phase) in order to obtain the correct retention factors. To solve the issue of the retention mechanism, it was proposed to use two columns with stationary phases of the same brand, but with different lengths of the grafted radical. If the C18 phase was used, then its replacement, for example, with the C8 phase with the same composition of the mobile phase and temperature should lead to a reduction in retention time by more than twice with a distributive retention mechanism. The differences in the results obtained for mobile phases based on methanol on the one hand and acetonitrile on the other require additional research.

**Keywords:** HPLC, dead time, determination methods, retention mechanisms

**For citation:** Deineka V.I. A comparison of two methods for the determination of dead time of a column in reverse-phase HPLC. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(5): 643-651. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12504>

## Введение

Единственным характеристическим, не вызывающим сомнения (при выводе хроматографа в стационарный режим), напрямую измеряемым параметром в ВЭЖХ является время удерживания сорбата  $i$ ,  $t_R(i)$ . Если надежно определена скорость подачи подвижной фазы, то время удерживания может быть пересчитано на удерживаемый объем,  $v_R(i)$ . Но эти параметры неудобны для дальнейшего использования вследствие их зависимости от размеров колонки, температуры и (в случае времени удерживания) от скорости подачи подвижной фазы, а в некоторых случаях и от давления на входе в колонку не только молекул большого размера [1, 2], но и обычных низкомолекулярных сорбатов [3-7]. Для использования в дальнейших расчетах время удерживания пересчитывают на фактор удерживания,  $k(i)$ , но надежность полученных данных при этом проблематична, поскольку для такого расчета необходимо знание мертвого времени хроматографической системы,  $t_M$ :

$$k(i) = \frac{t_R(i) - t_M}{t_M}. \quad (1)$$

На практике существует несколько различных принятых научным сообществом способов измерения (или расчета) мертвого времени [8-12], часто дающих различные величины. Однако, работ, в которых бы оценивалось следствие применения тех или иных значений на уровне физического смысла в литературе

нами не найдено. Особенно это относится к обращенно-фазовой хроматографии, для которой признаются в самом общем (но практически не учитываемом в большинстве соответствующих публикаций) смысле два принципиально различных механизма удерживания сорбатов: адсорбционный (включая сольвофобную теорию) и абсорбционный (распределительный) [13, 14].

В нормально-фазовой хроматографии удерживание сильнополярных сорбатов вследствие локализованной сорбции определяется числом силанольных групп на поверхности силикагеля и числом силанольных групп, занимаемых одной молекулой при сорбции. Под не сорбируемым веществом в этом случае подразумевают сорбент с нулевой абсолютной (т.е. с отрицательной избыточной) сорбцией. Поскольку фактор удерживания равен соотношению количества сорбата в стационарной,  $n(i)_{sp}$ , и в подвижной  $n(i)_{mp}$ , фазах:

$$k(i) = \frac{n(i)_{sp}}{n(i)_{mp}}, \quad (2)$$

то для не сорбируемого вещества  $j$  обязательно выполнение условия:

$$k(j) = \frac{n(j)_{sp}}{n(j)_{mp}} = \frac{0}{n(j)_{mp}} = 0. \quad (3)$$

По молярно-объемному подходу, принятому в настоящее время в хроматографии (в котором используются такие понятия, как молярная концентрация и объемы подвижной и неподвижной фаз), уравнение (2) преобразуется, если учитывать межчастичный объем,  $v_0$ , объем пор сорбента,  $v_p$ , объем адсорбционного слоя,

$v_a$ , и концентрации сорбата в обеих фазах  $c(i)_{sp}$ ,  $c(i)_{mp}$ :

$$k(i) = \frac{n(i)_{sp}}{n(i)_{mp}} = \frac{v_a \cdot c(i)_{sp}}{(v_0 + v_p - v_a) \cdot c(i)_{mp}} = \frac{c(i)_{sp}}{c(i)_{mp}} \cdot \frac{v_a}{v_0 + v_p - v_a} = K(i) \cdot \varphi, \quad (4)$$

где  $K(i)$  – молярная константа распределения сорбата между стационарной и подвижной фазами, а  $\varphi$  – фазовое соотношение колонки.

Цель настоящей работы – сопоставление величин мертвого объема, рассчитанного по удерживанию гомологов и по удерживанию не сорбируемого вещества (урацила) и оценка следствий использования обоих объемов при расчетах факторов удерживания и зависящих от них параметров.

### Экспериментальная часть

В работе в качестве тестовых соединений использовали урацил (I), и синтезированные гексиловый (II), гептиловый (III), октиловый (IV) и нониловый (V) эфиры *para*-нитробензойной кислоты.

Разделение осуществляли на оборудовании Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным детектором. Хроматограммы записывали при 280 нм. В работе использовали хроматографические колонки: 100×4.6 мм Kromasil 100-5-C18 и 100×4.6 мм Kromasil 100-5-C8. Для элюирования во всех случаях применяли изократическое элюирование со скоростью подачи подвижной фазы 0.8 см<sup>3</sup>/мин при температуре 20 или 30°C. Хроматограммы регистрировали и обрабатывали программой ChemStation, необходимые расчеты выполняли в MS Excel. Метчик мертвого времени – урацил.

### Обсуждение результатов

Как указывалось выше, в обращенно-фазовой хроматографии сорбаты могут удерживаться не только по адсорбционному, но и по абсорбционному механизмам. В первом случае с нелокализованной (для обращенно-фазовой хроматографии) сорбцией определяющим является,

как и в нормально-фазовой хроматографии, площадь поверхности сорбента (точнее сорбционный слой некоторой толщины). И требование по метчику мертвого объема – нулевая сорбции (или отрицательная сорбция при статическом способе оценки сорбционных свойств) метчика мертвого объема. Но, почему-то в мировой литературе не обращают внимания на то, что для второго варианта механизма удерживания – распределительного (и для «поплавочного» [15]) механизма, подход к определению мертвого времени должен измениться. В этих случаях необходимо заменить абсорбционный слой на объем пространства между привитыми алкильными радикалами,  $v_{in}$ , полностью доступный для распределительного механизма или частично доступный с коэффициентом  $\alpha(i)$  для «поплавочного» механизма. В таком случае уравнение (4) должно быть изменено:

$$k(i) = \frac{n(i)_{sp}}{n(i)_{mp}} = \frac{\alpha(i) \cdot v_{in} \cdot c(i)_{sp}}{(v_0 + v_p) \cdot c(i)_{mp}} = \frac{c(i)_{sp}}{c(i)_{mp}} \cdot \frac{\alpha(i) \cdot v_{in}}{(v_0 + v_p)} = K(i) \cdot \varphi(i) *. \quad (5)$$

В этом уравнении фазовое соотношение,  $\varphi(i)^*$ , принципиально отлично от этого параметра в уравнении (4). Для всех веществ, сорбируемых по полностью распределительному механизму, при котором сорбат распределяется во всем объеме  $v_{in}$ , фазовое соотношение остается одинаковым, поскольку  $\alpha(i) = 1$ .

Для веществ, содержащих алкильные радикалы, в научной литературе предлагается использовать принципиально иной способ определения мертвого времени. Так, для любого ряда гомологов предполагается, что свободная энергия сорбции линейно зависит от числа метиленовых групп в алкильном радикале под порядковым номером  $N$  в этом ряду:

$$\Delta G_{sorb}^0(N + 1) = \Delta G_{sorb}^0(N) + \Delta G_{sorb}^0(CH_2). \quad (6)$$

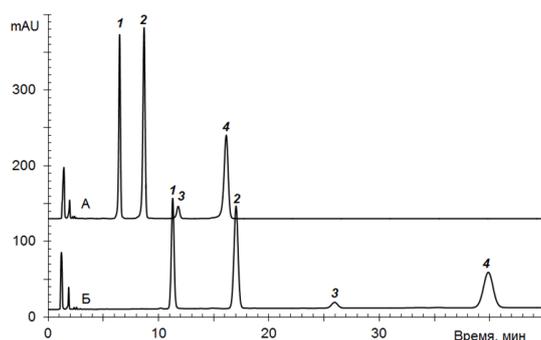


Рис. 1. Сопоставление удерживания эфиров *para*-нитробензойной кислоты в элюенте метанол – вода (80 : 20) на колонках А – Kromasil 100-5C8 и Б - Kromasil 100-5C18. Скорость подачи подвижной фазы 0.8 см<sup>3</sup>/мин, температура термостата колонки 20°C. Эфиры *para*-натриробензойной кислоты 1 – *n*-гексилый, 2 – *n*-гептиловый, 3 – *n*-октиловый и 4 – *n*-нониловый.

Fig. 1. Comparison of the retention of *para*-nitrobenzoic acid esters in the methanol-water eluent (80:20) on columns A – Kromasil 100-5C8 and B – Kromasil 100-5C18.

The feed rate of the mobile phase was 0.8 cm<sup>3</sup>/min, the temperature of the column thermostat was 20°C. The esters of *para*-natrirobenzoic acid were 1 – *n*-hexyl, 2 – *n*-heptyl, 3 – *n*-octyl and 4 – *n*-nonyl

В таких условиях выполняется соотношение:

$$\frac{k(N+1)}{k(N)} = \frac{k(N)}{k(N-1)}, \quad (7)$$

из которого вытекает простой способ определения мертвого времени по уравнению:

$$t_M = \frac{t_R(N+1) \cdot t_R(N-1) - t_R(N) \cdot t_R(N)}{t_R(N+1) + t_R(N-1) - 2t_R(N)}. \quad (8)$$

Можно также воспользоваться и удерживанием всех веществ использованного ряда гомологов по линейному уравнению [16]:

$$t_R(N+1) = a \cdot t_R(N) + b, \quad (9)$$

из которого получают простую формулу:

$$t_M = \frac{-b}{a-1}. \quad (10)$$

Таким образом, перед расчетом фактора удерживания необходимо оценить механизм, по которому вещество удерживается в обращенно-фазовой хроматографии. Для оценки механизма сорбции можно предложить сопоставление удерживания соединений в одних и тех же элюентах на стационарных фазах с различной длиной привитого алкильного радикала на одной и той же марке силикагеля в колонках одинаковых размеров (100×4.6 мм Kromasil 100-5C8 и Kromasil 100-5C18). Это позволяет рассчитывать

на одинаковую величину удельной поверхности сорбентов в сопоставляемых хроматографических колонках.

Из практики экстракции органических соединений в водно-органических смесях понятно, что чем больше объем органического растворителя добавляется в такую смесь, тем больше экстрагируемого вещества окажется в этом растворителе. Соответственно, при адсорбционном механизме удерживания вследствие близости удельных поверхностей обоих сорбентов времена удерживания сорбатов должны быть близкими. Если же вещества удерживаются по абсорбционному механизму, то удерживание на колонке C18 должно быть выше более чем в два раза, чем на колонке C8 (при одинаковой плотности прививки). Уместно обратить внимание на то, что сорбция при высокой степени прививки зависит от объема свободного пространства между привитыми алкильными радикалами заданного окружения, а не от числа привитых радикалов на единицу поверхности сорбента, как считают в ряде работ [17].

Сопоставление удерживания четырех *n*-алкильных эфиров *para*-нитробензойной кислоты представлено на рис. 1, а расчетные данные приведены в табл. 1.

Таблица 1. Параметры удерживания и величины мертвых времен на колонках Kromasil 100-5C18 и Kromasil 100-5C8 для подвижной фазы в элюенте метанол – вода (80 : 20) при температуре 20°C

Table 1. Retention parameters and values of dead times on the Kromasil 100-5C18 and Kromasil 100-5C8 columns for the mobile phase in the methanol-water eluent (80:20) at a temperature of 20°C.

Тип стационарной фазы		C18		C8		k <sub>C18</sub> /k <sub>C8</sub>
Мертвое время, $t_M$		1.035 <sup>1</sup>	1.203 <sup>2</sup>	0.988 <sup>1</sup>	1.426 <sup>2</sup>	
Логарифмы факторов удерживания эфиров <i>para</i> -нитробензойной кислоты, рассчитанные по двум вариантам $t_M$						
1	гексиловый	0.996	0.923	0.745	0.549	1.78
2	гептиловый	1.189	1.119	0.892	0.707	1.98
3	октиловый	1.382	1.313	1.039	0.861	2.20
4	нониловый	1.574	1.507	1.186	1.014	2.44
Инкременты (последовательный рост логарифмов факторов удерживания)						
1→2		0.193	0.196	0.147	0.158	-
2→3		0.193	0.194	0.147	0.154	-
3→4		0.193	0.194	0.147	0.153	-

Примечание: <sup>1</sup> - рассчитано по удерживанию веществ гомологического ряда; <sup>2</sup> – определено по удерживанию урацила.

Из представленных данных следует, что удерживание  $V$  при переходе от колонки C8 к колонке C18 увеличилось более чем в 2 раза. Это свидетельствует о распределительном механизме сорбции эфира в рассмотренных условиях. Отметим, что чаще всего (как и в рассматриваемом случае) вещества гомологических рядов содержат изменяющуюся по длине липофильную часть (алкильные радикалы) и гидрофильную часть, не способную проникать в привитой слой. В этом случае  $\alpha(i)$  в уравнении (5) увеличивается по мере роста длины алкильного радикала сорбата. Именно поэтому в табл. 1 получены различные значения соотношения факторов удерживания эфиров *para*-нитробензойной кислоты на фазе C18 к фазе C8 (от 1.78 до 2.44). Но поскольку при расчете фактора удерживания всех эфиров использовали одно и то же значение мертвого времени параметр  $\alpha(i)$  вошел в итоговое значение константы распределения.

Расчетные значения мертвых времен (по удерживанию членов гомологического ряда),  $t_m^1$ , и определенные по удерживанию урацила,  $t_m^2$ , заметно различаются во всех случаях: урацил показывает большие значения, табл. 1. Рост мертвого

времени по урацилу при переходе от C18-фазы к C8-фазе понятен, так как октильные радикалы занимают меньше пространства пор сорбента по сравнению с октадецильными. Но относительно небольшое падение  $t_m^1$  может быть связанным с «поплавочным» механизмом удерживания, поскольку внедрение полярного *para*-нитробензойного фрагмента в неполярную привитую фазу маловероятно.

При этом важно, что только при использовании  $t_m^1$  соблюдается сохранение инкрементов – постоянство разностей логарифмов факторов удерживания при переходе от  $n$ -го гомолога к  $(n+1)$ -ому. Т.е. мертвое время, определенное по удерживанию урацила, не позволяет получить согласованные (с точки зрения термодинамики) факторы удерживания.

При анализе удерживания этих же веществ в элюенте, содержащем 80 об. % ацетонитрила и 20 об. % воды при температуре 30°C были получены заметно отличающиеся результаты, табл. 2.

В этом случае мертвое время  $t_m^1$  оказалось существенно больше мертвого времени, определенного по удерживанию урацила. При этом и удерживание использованных в работе эфиров также зна

Таблица 2. Параметры удерживания и величины мертвых времен на колонках Kromasil 100-5C18 и Kromasil 100-5C8 для подвижной фазы в элюенте ацетонитрил – вода (80 : 20) при температуре 30°C

Table 2. Retention parameters and values of dead times on the Kromasil 100-5C18 and Kromasil 100-5C8 columns for the mobile phase in the methanol-water eluent (80:20) at a temperature of 30 °C.

Тип стационарной фазы		C18		C8	
Мертвое время, $t_M$		1.312 <sup>1</sup>	1.076 <sup>2</sup>	1.116 <sup>1</sup>	1.245 <sup>2</sup>
Логарифмы факторов удерживания эфиров <i>para</i> -нитробензойной кислоты, рассчитанные по двум вариантам $t_M$					
1	гексиловый	0.488	0.599	0.394	0.326
2	гептиловый	0.651	0.752	0.507	0.444
3	октиловый	0.814	0.912	0.620	0.561
4	нониловый	0.975	1.069	0.734	0.677
Инкременты (последовательный рост логарифмов факторов удерживания)					
1→2		0.163	0.155	0.113	0.118
2→3		0.163	0.157	0.113	0.117
3→4		0.162	0.158	0.114	0.117

Примечание: <sup>1</sup> - рассчитано по удерживанию веществ гомологического ряда; <sup>2</sup> – определено по удерживанию урацила.

чительно возрастало при переходе от колонки C8 к колонке C18, но этот рост оказался несколько меньшим по сравнению с подвижной фазой на основе метанола, хотя строго сравнивать эти данные проблематично из-за различных температур.

Для корректного сравнения был выполнен эксперимент по определению мертвых времен при постоянной температуре, но в различных подвижной фазах, отличающихся по соотношению концентраций метанола к ацетонитрилу, результаты которого приведены в табл. 3.

Оказалось, что при одной и той же температуре постепенная замена метанола на ацетонитрил приводит к росту  $t_m^1$ , а величины  $t_m^2$  при этом мало изменяются. Следовательно, для ацетонитрила характерно не только меньшее удерживание всех гомологов, что совпадает с общей тенденцией для таких замен в обращенно-фазовой хроматографии [18], но и рост мертвого времени, определенного по удерживанию гомологов.

Первая идея, объясняющая эти результаты сводилась к известным экспериментальным фактам. Так, известно, что метанол (в отличие от ацетонитрила) с алканами (с *n*-гексаном) не смешивается, но вследствие разряженного частотола октадецильных групп в привитом слое [19]

возможна их самосольватация (или изменение мобильности [20]) этих привитых групп и/или, по крайней мере, частичная сольватация привитых радикалов метанолом. В таком случае алкильные группы использованных эфиров идеально подходят для заполнения пустот в частотоле привитого слоя с относительно легким вытеснением метанола из привитого слоя. Ацетонитрил полностью смачивает алкильные радикалы привитого слоя, т.е. увеличивает объем внедрения среди таких радикалов из-за отсутствия необходимости их самосольватации, что приводит к росту мертвого объема. Кроме того, как вещество, лучше сольватирующее эти привитые радикалы, легче вытесняет тестовые эфиры из этого пространства, что приводит к уменьшению удерживания.

Но, как показал следующий эксперимент, замена метанола на хорошо смачивающие алканы этанол и изопропанол, и даже на этилацетат не привела к росту мертвых времен, рассчитанных по удерживанию гомологов, табл. 4. Это свидетельствует о том, что необходимы дополнительные исследования для объяснения различия между мертвым временем, определенным по удерживанию гомологов в элюентах на основе ацетонитрила с



Таблица 3. Параметры удерживания и величины мертвых времен на колонке в трех составах подвижных фаз при температуре 20°C

Table 3. Retention parameters and values of dead times on the column in three compositions of mobile phases at a temperature of 20°C

Состав подвижной фазы, об. %	CH <sub>3</sub> OH	40	60	80			
	CH <sub>3</sub> CN	40	20	0			
	H <sub>2</sub> O	20	20	20			
Мертвое время, $t_M$		1.270 <sup>1</sup>	1.199 <sup>2</sup>	1.208 <sup>1</sup>	1.220 <sup>2</sup>	1.035 <sup>1</sup>	1.203 <sup>2</sup>
Логарифмы факторов удерживания эфиров пара-нитробензойной кислоты, рассчитанные по двум вариантам $t_M$							
1	гексиловый	0.758	0.787	0.858	0.853	0.996	0.923
2	гептиловый	0.943	0.971	1.049	1.045	1.189	1.119
3	октиловый	1.129	1.155	1.240	1.235	1.382	1.313
4	нониловый	1.314	1.340	1.431	1.426	1.574	1.507
Инкременты (последовательный рост логарифмов факторов удерживания)							
1→2		0.185	0.184	0.191	0.191	0.193	0.196
2→3		0.185	0.184	0.191	0.191	0.193	0.194
3→4		0.185	0.185	0.191	0.191	0.193	0.194

Примечание: <sup>1</sup> - рассчитано по удерживанию веществ гомологического ряда; <sup>2</sup> – определено по удерживанию урацила.

Note: <sup>1</sup> – calculated by retention of homologous substances. <sup>2</sup> – determined by uracil retention.

Таблица 4. Параметры удерживания и величины мертвых времен на колонке в трех составах подвижных фаз при температуре 20°C

Table 4. Retention parameters and values of dead times on the column in three compositions of mobile phases at a temperature of 20°C

Состав подвижной фазы, об. %	CH <sub>3</sub> OH	40	40	60			
	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	40	0	0			
	ИПС	0	40	0			
	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OAc	0	0	20			
	H <sub>2</sub> O	20	20	20			
Мертвое время, $t_M$		1.008 <sup>1</sup>	1.201 <sup>2</sup>	0.879 <sup>1</sup>	1.185 <sup>2</sup>	0.936 <sup>1</sup>	1.168 <sup>2</sup>
Логарифмы факторов удерживания эфиров пара-нитробензойной кислоты, рассчитанные по двум вариантам $t_M$							
1	гексиловый	0.796	0.707	0.589	0.418	0.791	0.677
2	гептиловый	0.967	0.882	0.715	0.555	0.937	0.828
3	октиловый	1.137	1.055	0.841	0.688	1.083	0.978
4	нониловый	1.307	1.227	0.967	0.820	1.230	1.127
Инкременты (последовательный рост логарифмов факторов удерживания)							
1→2		0.171	0.175	0.126	0.137	0.146	0.152
2→3		0.170	0.173	0.126	0.134	0.146	0.150
3→4		0.170	0.172	0.126	0.132	0.146	0.149

Примечание: <sup>1</sup> - рассчитано по удерживанию веществ гомологического ряда; <sup>2</sup> – определено по удерживанию урацила.

Note: <sup>1</sup> – calculated by retention of homologous substances. <sup>2</sup> – determined by uracil retention.

одной стороны и на основе спиртов – с другой.

Более того, экспериментально установлено, что добавки триэтиламина на уровне 0.1% в подвижную фазу заметно

уменьшают удерживание урацила во всех исследованных элюентах, тогда как мертвое время, рассчитанное по удерживанию гомологов, при этом несколько увеличи-

вается. Следовательно, кроме учета механизма сорбции необходимо учитывать и влияние остаточных силанольных групп при использовании урацила в качестве метчика мертвого времени.

### Заключение

Проведенные исследования показали, что мертвое время, определенное по удерживанию урацила не совпадает с мертвым временем, определенным по удерживанию гомологов – алкильных эфиров *para*-нитробензойной кислоты. При этом соотношение этих параметров изменяется при переходе от метанола к ацетонитрилу. Но только мертвое время,

### Список литературы/References

1. Fekete S., Fogwill M., Lauber M.A. Pressure-Enhanced Liquid Chromatography, a Proof of Concept: Tuning Selectivity with Pressure Changes and Gradients. *Anal. Chem.* 2022; 94: 7877-7884. <https://doi.org/10.1021/acs.anal-chem.2c00464>.
2. Chen S.-H., Li C.-W. Thermodynamic studies of pressure-induced retention of peptides in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2004; 1023: 41-47. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.09.057>
3. Martin M., Guiochon G. Effects of high pressure in liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2005; 1090: 16-38. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.005>
4. McGuffin V.L., Chen S.-H. Theoretical and Experimental Studies of the Effect of Pressure on Solute Retention in Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 1997; 69: 930-943. <https://doi.org/10.1021/ac960589d>
5. Ohmacht R., Boros B. Effect of Pressure on Solute Capacity Factor in HPLC Using a Non-Porous Stationary Phase. *Chromatogr. Suppl.* 2000; 51: S-205-S-210. <https://doi.org/10.1007/BF02492807>
6. Fallas M.M., Neue U.D., Hadley M.R., McCalley D.V. Investigation of the effect of pressure on retention of small molecules using reversed-phase ultra-high-pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2008; 1209: 195-205. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.021>

рассчитанное по удерживанию гомологов, позволяет сохранить постоянство инкрементов (как разности логарифмов факторов удерживания), приходящихся на одну метиленовую группу. Таким образом, для веществ, удерживающихся по абсорбционному и по адсорбционному механизмам необходимо использовать различные мертвые времена.

### 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.

7. Deineka V.I., Chulkov A.N., Blinova I.P. Dependence of the solute retention on the column pressure in reversed-phase HPLC. *Mendeleev Commun.* 2023; 33: 436-437. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2023.04.044>
8. 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)
9. Berendsen G.E., Schoenmakers P.J., de Galan L., Vigh G., Varga-puchony Z., Inczédy J. On the Determination of the Hold-Up Time in Reversed Phase Liquid Chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 1980; 3: 1669-1686. <https://doi.org/10.1080/01483918008064759>
10. Krstulović A.M., Colln 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>
11. 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>
12. Perry P.R., Coym J.W. Comparison of common mobile-phase volume markers with



- polar-group-containing reversed-phase stationary phases. *J. Sep. Sci.* 2010; 33: 2310-2315. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000176>
13. 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>
14. Tijssen R., Schoenmakers P.J., Böhmer M.R., Koopal L.K., Billiet H.A.H. Lattice models for the description of partitioning/adsorption and retention in reversed-phase liquid chromatography, including surface and shape effects. *J. Chromatogr. A.* 1993; 656: 135-196. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)80801-E](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)80801-E)
15. 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>
16. Burzhinskaya T.G., Deineka V.I., Deineka L.A., Selemenev V.F. Chromatographic determination of zeaxanthin in some varieties of *Capsicum annum*. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy.* 2022. 22(1): 12-20. <https://doi.org/10.17308/sorp-chrom.2022.22/9016> (in Russ.)
17. Sentell K.B., Dorsey J.G. On the calculation of the stationary phase volume in reversed phase chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 1988; 11: 1875-1885. <https://doi.org/10.1080/01483918808069031>
18. Subirats X., Casanovas L., Redón L., Rosés M. Effect of the solvent on the chromatographic selectivity in reversed-phase and HILIC. *Adv. Sample Preparat.* 2023; 6: 100063. <https://doi.org/10.1016/j.sample.2023.100063>
19. 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>
20. Bayer E., Paulus A., Peters B., Laupp G., Reiners J. Albert K. Conformational behavior of alkyl chains of reversed phases in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1986; 364: 25-27. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)96192-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)96192-2)

### 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](mailto: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.