



УДК 543.544

Методы определения свойств обращенно-фазовых хроматографических сорбентов (обзор)

Голубицкий Г.Б.

ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Курск

Поступила в редакцию 30.05.2013 г.

Аннотация

Рассмотрены методы определения свойств обращенно-фазовых хроматографических сорбентов, опубликованные в 1990 – 2012 гг. Отдельные источники, отражающие наиболее важные проблемы данной тематики, относятся к более раннему периоду. В обзоре отражены физико-химические, хроматографические методы исследования свойств сорбентов, а также представлены подходы к изучению их стабильности. В настоящее время не существует универсального теста для исследования обращенных фаз, каждый метод имеет свои особенности и области применения. Данное направление имеет большое научное и практическое значение и следует ожидать его развития в будущем.

Ключевые слова: обращенно-фазовые сорбенты, эндкейпинг, гидрофобность, остаточная силанольная активность, селективность по форме, гидрофильно-гидрофобный баланс, хемометрическая обработка данных

Test procedures for reversed-phase high-performance liquid chromatographic packings, published in 1990 – 2012, are reviewed. Some works, concerning the most important problems of this issue, correspond to more recent period. In this review the physical and chemical, chromatographic methods of investigation and approaches to stability evaluation are presented. There is no a universal test for reversed phases evaluation and each method has his own peculiarities and field of application. This area has great scientific and practical importance and one should expect its development in future.

Keywords: reversed-phase packings, endcapping, hydrophobicity, residual silanol activity, shape selectivity, hydrophilic-hydrophobic balance, chemometric treatment of data

Введение

В зарубежной литературе опубликован целый ряд статей обзорного характера, посвященных исследованию свойств обращенно-фазовых хроматографических сорбентов [1–8]. В отечественной периодике обзоров на эту актуальную тему нами не найдено, поэтому предлагаемая статья должна быть интересной и полезной широкому кругу хроматографистов – теоретиков и практиков.

Начало исследованию свойств сорбентов на основе силикагеля положено одним из «пионеров» обращенно-фазовой ВЭЖХ Ш. Хорватом в его классических работах [9,10]. При исследовании зависимости удерживания краун эфиров от

содержания метанола в подвижной фазе (ПФ) на полученной кривой наблюдали минимум. Авторы показали, что данное явление связано с двойственным механизмом удерживания, включающим сольвофобное и силанофильное взаимодействие. Первая составляющая обусловлена взаимодействием гидрофобных частей молекул разделяемых веществ с гидрофобной привитой фазой, вторая объясняется притяжением положительно заряженных ионов и диссоциированных силанольных групп сорбента [9]. Полученный вывод Ш. Хорват и соавторы подтвердили при исследовании удерживания некоторых пептидов. Аналогичный минимум на кривой зависимости удерживания от содержания органического модификатора в ПФ наблюдался не только на сорбентах с привитыми группами С8 и С18, но и на чистом силикагеле. Авторы работы отмечают, что остаточные силанольные группы можно маскировать добавлением в ПФ воды или подходящих аминов, однако указывают, что их влияние следует считать не только мешающим эффектом, но и фактором оптимизации хроматографической селективности [10].

В зависимости от используемого подхода методы исследования сорбентов можно подразделить на физико-химические (ЯМР, ИК-Фурье спектроскопия, Рамановская спектроскопия, термогравиметрия, колориметрия и др.), хроматографические (основаны на изучении характеристик тест-веществ) и хемометрические (используют математические модели и информационные технологии для обработки больших массивов данных, полученных хроматографическими методами). Физико-химические методы больше подходят для исходных сорбентов, поскольку их использование для колонок привело бы к нарушению их целостности и выходу из строя. Вместе с тем, эти методы позволяют получить наиболее точную информацию о физико-химическом строении сорбента (концентрация и тип остаточных силанольных групп и привитых лигандов, содержание органического углерода, размер и форма частиц, площадь поверхности и др.). Хроматографические методы наиболее удобны и наглядны с практической точки зрения, поскольку они не только позволяют оценить наиболее важные свойства сорбента (гидрофобность, остаточная силанольная активность, селективность по форме молекулы сорбата), но и непосредственно определить пригодность исследуемой хроматографической колонки для конкретного разделения. Хемометрические методы обычно рассматривают совместно с хроматографическими, поскольку, как уже указано выше, они основаны на обработке полученных экспериментально данных [4]. Кроме этого, мы сочли целесообразным выделить в отдельный подраздел рассмотрение источников по исследованию стабильности обращенно-фазовых сорбентов в связи с большой практической важностью данного свойства.

Физико-химические методы

Химическое строение силикагеля и его поверхности может быть изучено и количественно оценено различными физико-химическими (нехроматографическими) методами, например ЯМР. Показано, что при обработке сорбента смесью ацетонитрила с D₂O происходит замещение групп –ОН на –OD. Измеряли сигнал групп Si–OD, прямо пропорциональный концентрации остаточных силанольных групп на поверхности сорбента [11]. Для исследования свойств поверхности силикагеля использовали ЯМР и адсорбцию азота. Показано, что адсорбционные свойства коррелируют с содержанием на поверхности силанольных групп, найденным при помощи ЯМР [12] При помощи ЯМР может быть не только измерена

поверхностная концентрация силанольных групп, но и установлено их строение (изолированные, геминальные, вицинальные), а также определен тип связывания лиганда и эндкейпинга (моно-, ди-, трифункциональный) [4]. ЯМР-исследование также использовали для изучения влияния термической обработки на поверхность силикагеля при оптимизации процесса дериватизации сорбента гидрофобными лигандами [13] и для характеристики сорбента типа С18, полученного с использованием промежуточного гидрида [14]. Получены спектры ЯМР ряда веществ в процессе их сорбции. Показано, что изменения спектров коррелируют со степенью сродства сорбата к неподвижной фазе и с селективностью сорбента по форме молекул разделяемых веществ [15]. Метод ЯМР использован для исследования сорбции ацетонитрила на поверхности обращенно-фазовых сорбентов с различной плотностью покрытия привитой фазой. Наблюдается четкая зависимость соотношения адсорбированного органического растворителя и воды от плотности покрытия [16]. Спектры ЯМР позволяют также судить о подвижности привитых лигандов [17].

Для исследования химического строения поверхности сорбента и структуры привитой неподвижной фазы также широко используется метод ИК-спектроскопии, а наиболее распространенная техника для данной области – инфракрасная спектроскопия диффузного отражения с преобразованием Фурье (DRIFT). Данный метод также позволяет установить тип силанольных групп и химическое строение привитых лигандов [1,4,8,13,14,17,18].

В химии хроматографических сорбентов применяют и Рамановскую спектроскопию. При помощи этого метода исследовали влияние на конформацию привитых групп растворителей [19,20], температуры [21], химического строения лигандов [22]. Показано, что при изменении температуры сорбента в строении привитой фазы типа С18 не происходит изменений, которые характерны для свободного октадекана при его плавлении при 28÷30°C. В то же время, спектральные характеристики поверхности и жидкого растворителя похожи, а их изменение при понижении температуры свидетельствует о повышении степени упорядоченности привитых лигандов [21].

Содержание органического углерода, характеризующее гидрофобность обращенно-фазовых сорбентов, может быть определено с помощью термогравиметрии. Метод основан на нагревании сорбента от 150 до 600°C и контроле соответствующего снижения массы образца. Показано, что при более низких температурах происходит удаление растворителей, при более высоких – конденсация поверхностных силанольных групп [23]. Метод термогравиметрии применяли для определения содержания углерода в сорбентах с привитыми фенильными и пентафторфенильными группами [24], а также при изучении стабильности и содержания силанольных групп в обращенно-фазовых сорбентах [18].

Рентгеновская компьютерная томография, широко используемая в медицине, нашла применение и в химии хроматографических сорбентов для исследования зависимости однородности распределения частиц и гидродинамики слоя от формы зерен (сферические и неправильной формы). Подтверждена более высокая эффективность сорбентов на основе сферических частиц [25].

Для характеристики деталей поверхности сорбентов размером от 1 до 100 нм перспективен метод рассеяния нейтронов. При помощи этого метода возможно определение толщины слоя привитой фазы и ее объемной фракции. Вместе с тем отмечается, что характер рассеяния нейтронов и интерпретация результатов для сорбентов с привитой фазой гораздо сложнее, чем для исходного силикагеля [26].

Конформации привитой фазы типа С18 и сорбция модельного вещества (4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-N-оксил) в присутствии бинарных растворителей (ацетонитрил–вода и метанол–вода) были изучена методом ЭПР. Показано, что при концентрации ацетонитрила выше 50% привитая фаза имеет упорядоченную структуру, а при более низком содержании имеет место коллапс (сложение) лигандов к поверхности сорбента [27].

Для характеристики гибридного сорбента типа С18 использовали метод ДСК. Показано наличие фазового перехода при 90°C [28].

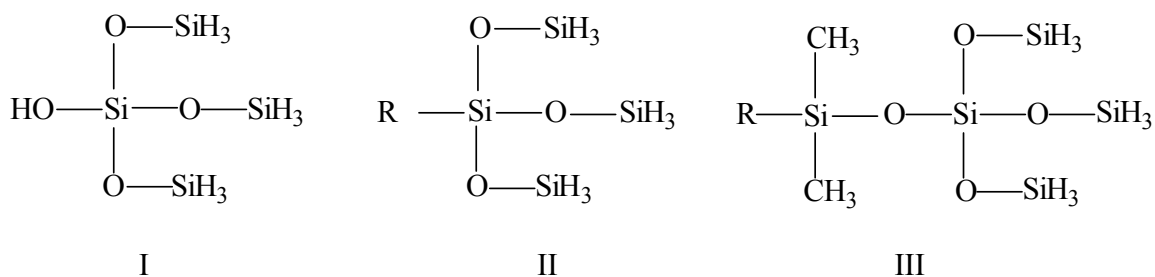
При исследовании сорбции растворителей слоем неподвижной фазы использовали метод микрокалориметрии. Данный подход основан на измерении тепла, выделяющегося при погружении сорбента в растворитель. Показано, что результаты этого метода согласуются со значениями, полученными при помощи хроматографического (динамического) метода [29].

Адсорбция этанола, 2-изопропанола, ацетонитрила и тетрагидрофурана на сорбентах на основе силикагеля изучена методом минорных возмущений. Метод основан на инъектировании исследуемого растворителя в поток элюента, состав которого отличен от данного растворителя и регистрации возмущения базовой линии, характер которого зависит от параметров адсорбции этого растворителя. Показано, что при помощи данного метода можно охарактеризовать степень гетерогенности поверхности сорбента, т.е. отношение площади поверхности, занятой остаточными силанольными группами, к площади, покрытой привитыми органическими лигандами [30].

Представляет интерес исследование зависимости свойств некоторых обращенно-фазовых сорбентов от давления прессования при изготовлении колонок. Показано, что при возрастании давления прессования внешняя порозность сорбента снижается при сохранении постоянной внутренней порозности. При этом удерживание ряда тест-веществ (ацетон, бензилацетат, бензиловый спирт, м-крезол, 2,6-диметилфенол, метилбензоат, 3-фенил-1-пропанол, урацил) и эффективность колонки линейно возрастают. Порозность сорбента определяли при помощи инверсионной эксклюзионной хроматографии [31].

Универсальный физико-химический метод – метод элементного анализа использовали при исследовании неподвижных фаз с привитыми фенильными и пентафторфенильными группами для определения их химического состава [24].

Важная характеристика межмолекулярного взаимодействия модифицированной поверхности сорбентов с молекулами сорбата и подвижной жидкой фазой, правильная оценка которой позволяет управлять хроматографическим процессом – гидрофильно-гидрофобный баланс (ГГБ) хроматографической системы. Для экспериментального определения ГГБ предложено выбирать модельные соединения I–III с такими же функциональными группами, как у привитой фазы:



Определяли логарифм коэффициента распределения этих веществ в системе н-октанол – вода, который характеризует данное свойство [32].

Хроматографические методы

С практической точки зрения для оценки свойств сорбентов более удобны и наглядны хроматографические методы. Эти методы не только дают качественную и (или) количественную характеристику сорбента, но и позволяют наметить конкретные пути оптимизации хроматографической селективности. Большинство хроматографических методов основано на оценке относительного удерживания двух или трех тест-веществ. Как правило, эти вещества значительно отличаются по гидрофобности и (или) величине положительного заряда их молекул. В первом случае отношение величин удерживания характеризует гидрофобность сорбента, во втором – его остаточную силанольную активность. В работах [11,33–35] систематизированы и кратко охарактеризованы такие методы. В качестве тест-веществ в них используют 2,3-дигидроксинафталин и 2,7-дигидроксинафталин (характеристика содержания металлов), урацил (маркер «мертвого» объема), пиридин [35], нафталин-сульфоокислоты [36,37], амитриптилин [38], лития нитрат [39,40] (остаточная силанольная активность), парацетамол, гидрохлорид фенилэфрина, малеат хлорфенирамина, 4-аминофенол, 4-хлорацетанилид, 4-нитрофенол [41], ацетофенон, анизол, 2,3-диметилфенол, диметилфталат [42] для определения других свойств.

Проведено сравнительное исследование селективности сорбентов типа С18 и С8 в условиях изменяющейся крутизны градиента и температуры колонки. В качестве тест-веществ использовали смесь девяти сорбатов и двух внутренних стандартов, удерживание которых определяли при различных комбинациях температуры и времени градиента [43–46]. Такие работы, безусловно, имеют практическую ценность, однако результаты скорее применимы не для систематизации свойств сорбентов, а для непосредственной оптимизации разделения.

Использование хемометрической обработки

В ряде работ свойства обращенно-фазовых сорбентов исследовали хемометрическими методами [47–54]. Эти методы основаны на математической обработке большого массива данных по удерживанию группы веществ с разными свойствами (кислоты, основания, нейтральные вещества, т.д.). Удерживание вещества с теми или иными свойствами характеризует определенное свойство сорбента: например, основания – остаточную силанольную активность, нейтрального вещества – гидрофобность. Определенное свойство исследуемого сорбента описывается функцией, представляющей сумму нескольких слагаемых. Каждое из таких слагаемых характеризует то или иное физико-химическое свойство (ионные и дисперсионные взаимодействия сорбатов и неподвижной фазы, образование водородных связей и др.) и оценивается по удерживанию вещества, обладающего соответствующими свойствами [51–53]. Одной из разновидностей таких методов можно считать исследование линейных зависимостей энергии сольватации. В этих методах удерживание группы тест-веществ на определенном сорбенте изучают при нескольких разных составах ПФ. Изменение соответствующей

функции при смене растворителя характеризует определенное свойство сорбента [49,50]. В других методах этой группы для оценки свойств сорбента получают количественные зависимости удерживания от структурных характеристик сорбатов. Каждое используемое тест вещество при этом характеризуют набором дескрипторов, отражающих физико-химические свойства, связанные с удерживанием (дипольный момент, избыточная электронная плотность, доступная для воды площадь молекулы) [47,54]. Хемометрические методы исследования свойств сорбентов имеют скорее теоретическое, чем прикладное и практическое значение. Для получения необходимой информации необходимо собрать огромный массив экспериментальных данных, что требует больших затрат времени и материальных средств. Число таких методов, ничем принципиальным не отличающихся один от другого, может быть огромным: в сущности, любое химическое соединение в той или иной степени подходит на роль тест-вещества.

С практической точки зрения необходимо, чтобы свойства того или иного сорбента, определенные в одной лаборатории, воспроизводились в любой другой. Показано, что для выполнения этого условия необходимо строго поддерживать определенную температуру ПФ и колонки с помощью жидкостного термостата, состав ПФ должен точно контролироваться, а ее приготовление следует осуществлять по весу [55].

Таким образом, большинство опубликованных методов основано на исследовании удерживания, как минимум, двух тест-веществ при определенных хроматографических условиях. На этом фоне представляются оригинальными методы, в котором используется только одно тест-вещество. В интервале рН подвижной фазы 2,0÷11,0 ионное состояние четвертичного аммониевого основания (бритилиум тозилат) не изменяется, поэтому его удерживание зависит только от концентрации на поверхности сорбента ионизованных силанольных групп. Следовательно, степень зависимости удерживания этого вещества от рН ПФ характеризует величину остаточной силанольной активности используемого сорбента [56]. Предложен новый оригинальный метод оценки остаточной силанольной активности, основанный на исследовании влияния концентрации буферной составляющей ПФ на удерживание тест-вещества дифенгидрамина. Для практического использования данного теста достаточно определить коэффициенты емкости тест-вещества для концентраций дигидрофосфата калия в подвижной фазе 0,04М и 0,01М, рассчитать разность $\ln k$ и разделить ее на разность концентраций. Метод позволяет дифференцировать обращенно-фазовые сорбенты на две большие группы при анализе основных соединений. Первая группа имеет выраженную силанольную активность и показывает снижение удерживания при росте концентрации буфера, вторая имеет противоположную зависимость, поскольку гидрофобные свойства преобладают [57,58].

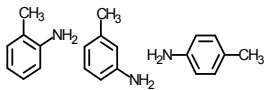
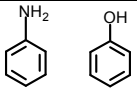
С точки зрения используемых при тестировании условий оригинальные методы с использованием сверхкритической флюидной хроматографии. Речь идет о так называемом «каротиноидном тесте». Показано, что при условиях сверхкритической флюидной хроматографии (подвижная фаза (15:85) метанол–диоксид углерода при 25°C и 15 МПа) удерживание транс-изомера β -каротина характеризует гидрофобность исследуемого обращенно-фазового сорбента, удерживание зеаксантина – силанольную активность, а разделение цис- и транс-изомеров β -каротина – селективность сорбента по форме разделяемых веществ [59,60].


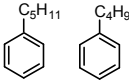
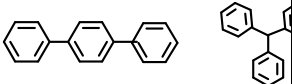
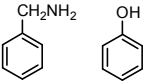
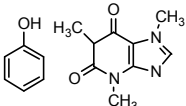
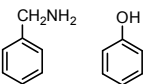
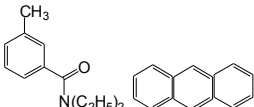

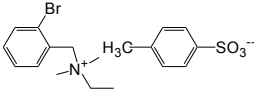
В табл. приведены некоторые наиболее распространенные хроматографические методы оценки остаточной силанольной активности и (или) гидрофобности обращенно-фазовых сорбентов и их характеристики.

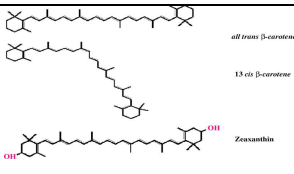
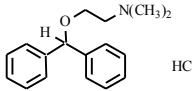
Исследование стабильности

Водные подвижные фазы с $\text{pH} \geq 8$ вызывают разрушение сорбентов на основе силикагеля. Экспериментально показано, что основной процесс, приводящий к деструкции – не гидролиз привитой фазы, а растворение силикагеля. При этом, однако, тип привитых лигандов влияет на скорость данного процесса. Исследование проводили путем колориметрического определения растворенных силикатов по реакции образования силикомолибдатного комплекса в подвижной фазе с $\text{pH} \approx 10$ на ее выходе из колонки. Доказано, что более стабильны неподвижные фазы с плотно упакованными мономерными диметил-С18 лигандами по сравнению с фазами с объемными диизопропил- и диизобутил- лигандами, покрытие которыми имеет меньшую плотность. Также установлено, что высокоочищенные силикагели растворяются в щелочных растворах быстрее, чем сорбенты, содержащие соединения алюминия, железа цинка и других элементов. Кроме того, использование ПФ на основе ацетонитрила продляет жизнь сорбента по сравнению с метанолом [61]. Для оперативной оценки стабильности обращенной фазы использовали тестовую смесь, содержащую ацетон, бензонитрил, бензол, толуол и нафталин. Определяли влияние ПФ, содержащих метанол и карбонат натрия с pH 8,4; 8,2; 10,1 на удерживание тест-веществ, высоту пиков и их асимметрию [62]. Для изучения стабильности обращенно-фазового сорбента также может быть использована смесь лекарственных средств основной природы (пиндолол, метопролол, оксипренолол, пропранолол), имеющих pK в диапазоне 9,5÷9,7. Старение сорбента происходило при действии смеси (1:1) ацетонитрил–0,017М фосфатный буферный раствор с pH 11. Показано, что при замене ацетонитрила на метанол стабильность сорбента возрастает. К аналогичному результату приводит использование буферных веществ органической природы по сравнению с неорганическими фосфатами. Для продления срока службы колонок более эффективно использование предколонок, заполненных немодифицированным силикагелем по сравнению с предколонками на основе обращенно-фазовых сорбентов [63].

Таблица. Некоторые методы определения остаточной силанольной активности и (или) гидрофобности обращенно-фазовых хроматографических сорбентов

Метод	Тест-вещества	Условия	Критерии		Лит.
			Расчет	Что характеризует	
1	2	3	4	5	6
Энгельгардта		(55:45) CH ₃ OH–H ₂ O	$k_{i+1}/k_i < 1,3$	Пригодность для разделения оснований при выполнении указанного условия	11,33, 47
		—	$k_1 < k_2$ $t_{r1}/t_{r2} < 1,3$	—	

1	2	3	4	5	6
Эрби, Танака		(4:1) CH ₃ OH–H ₂ O	k	Степень покрытия поверхности привитой фазой	6,34
		—«—	k_1/k_2	Гидрофобная селективность (гидрофобность) – содержание органического углерода в НФ	
		—«—	k_2/k_1	Селективность по форме	
		0,02M KH ₂ PO ₄ pH 2,7 в смеси (3:7) CH ₃ OH–H ₂ O	k_1/k_2	Кислотная ионообменная емкость – кислотная активность силанольных групп	
		(3:7) CH ₃ OH–H ₂ O	k_2/k_1	Емкость по водородным связям – количество доступных силанольных групп и степень эндкейпинга	
		0,02M KH ₂ PO ₄ pH 7,6 в смеси (3:7) CH ₃ OH–H ₂ O	k_1/k_2	Общая ионообменная емкость – общая силанольная активность	
Уол- терса		1)CH ₃ CN 2)(65:35) CH ₃ CN–H ₂ O	1) k_1/k_2 2) k_1/k_2	1) Остаточная силанольная активность 2) Гидрофобность	111
Хорвата		ПФ+(C ₂ H ₅) ₃ N	$k_0=k_1+k_2$ $k_2=$ $f(c(C_2H_5)_3N)$	k1–гидрофобный вклад в удерживание k2– силанофильный вклад в удерживание	9 9,10
Нейе		Градиент от 10 до 80 % CH ₃ CN+ буферный раствор рН 2,0÷11,0	$k=f(pH)$	Остаточная силанольная активность	556

1	2	3	4	5	6
«Каротиноидный» тест		(15:85) CH ₃ OH–CO ₂ (сверхкрит.) 25°C; 15 МПа	k_1 k_3 (зеаксантин) k_1/k_2 (транс/цис)	Абсолютная гидрофобность Силанольная активность Селективность по форме	559,60
Метод вариации ионной силы ПФ		(36:64) CH ₃ CN – 0,04М и 0,01М растворы KH ₂ PO ₄	$a \approx \Delta \ln k / \Delta c$ (KH ₂ PO ₄)	Остаточная силанольная активность и (или) гидрофобность	557,58

Заключение

В диссертационной работе [64] Сформулированы общие требования к тестам для определения остаточной силанольной активности обращенно-фазовых сорбентов. Отмечается, что тест должен быть:

- быстрым и эффективным для использования в промышленных лабораториях;
- использовать доступные тест-вещества;
- использовать вещества, физико-химические свойства которых отражают проблему хроматографического анализа;
- устойчивым в отношении значений получаемых параметров.

Следует отметить, что требуемые характеристики можно отнести не только к методам оценки остаточной силанольной активности, но и к методам определения других свойств обращенно-фазовых сорбентов. То же можно отнести и к выводу авторов о том, что «не существует универсальной процедуры для тестирования». В то же время в большом ряду рассмотренных методов наиболее полно удовлетворяют указанным выше требованиям методы оценки остаточной силанольной активности с использованием бретилиума тозилата [56] или дифенгидрамина [57,58].

Не вызывает сомнения тот факт, что методы определения свойств хроматографических сорбентов имеют большое научное и практическое значение. Следует ожидать развития данного направления и большого количества публикаций по этой теме в будущем.

Список литературы

1. Visky D. 4 Column characterization and selection (HPLC method development for pharmaceuticals. Separation science and technology. V. 8) // Edited by S. Ahuja, H. Rasmussen. Amsterdam, Boston, Heidelberg et. al. : Elsevier Inc., 2007. P. 85–109 .
2. Engelhardt H., Low H., Gotzinger W. Chromatographic characterization of silica-based reversed phases. Review // J. Chromatogr. 1991. V. 544. P. 371–379.
3. Rogers S.D., Dorsey J.G. Chromatographic silanol activity test procedures: the quest for a universal test. Review // J. Chromatogr. A. 2000. V. 892. N 1–2. P. 57–65.
4. Vervoort R.J.M., Debets A.J.J., Claessens H.A., Cramers C.A., de Jong G.J. Optimisation and characterisation of silica-based reversed-phase liquid chromatographic

systems for the analysis of basic pharmaceuticals. Review // *J. Chromatogr. A.* 2000. V. 897. N. 1–2. P. 1–22.

5. Claessens H.A., van Straten M.A. Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. Review // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1060. N. 1–2. P. 23–41.

6. McCalley D.V. The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: Some possible approaches for improved separations. Review // *J. Chromatogr. A.* 2010. V. 1217. N. 6. P. 858–880.

7. Snyder L.R., Dolan J.W., Carr P.W. The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity. Review // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1060. N. 1–2. P. 77–116.

8. Nawrocki J. The silanol group and its role in liquid chromatography. Review // *J. Chromatogr. A.* 1997. V. 779. N. 1–2. P. 29–71.

9. Nahum A., Horváth C. Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases: I. Dual retention mechanism in reversed-phase chromatography // *J. Chromatogr. A.* 1981. V. 203. P. 53–63.

10. Bij K.E., Horváth C., Melander W.R., Nahum A. Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases II. Irregular retention behavior and effect of silanol masking // *J. Chromatogr. A.* 1981. V. 203. P. 65–84.

11. Scholten A.B., Claessens H.A., de Haan J.W., Cramers C.A. Chromatographic activity of residual silanols of alkylsilane derivatized silica surfaces // *J. Chromatogr. A.* 1997. V. 759. N. 1–2. P. 37–46.

12. Berezniński Y., Jaroniec M., Gangoda M.E. Characterization of silica-based octyl phases of different bonding density Part II. Studies of surface properties and chromatographic selectivity // *J. Chromatogr. A.* 1998. V. 828. N. 1–2. P. 59–73.

13. Sunseri J. D., Cooper W.T., Dorsey J.G. Reducing residual silanol interactions in reversed-phase liquid chromatography. Thermal treatment of silica before derivatization // *J. Chromatogr. A.* 2003. V. 1011. N. 1–2. P. 23–29.

14. Pesek J.J., Matyska M.T., Yu R.J. Synthesis and characterization of endcapped C18 stationary phases using a silica hydride intermediate // *J. Chromatogr. A.* 2002. V. 947. N. 2. P. 195–203.

15. Carrara C., Lopez C., Caldarelli S. Chromatographic-nuclear magnetic resonance can provide a prediction of high-pressure liquid chromatography shape selectivity tests // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1257. P. 204–207.

16. Buszewski B., Bocian Sz., Felinger A. Excess isotherms as a new way for characterization of the columns for reversed-phase liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1191. N. 1–2. P. 72–77.

17. Srinivasan G., Meyer C., Welsch N., Albert K., Müller K. Influence of synthetic routes on the conformational order and mobility of C18 and C30 stationary phases // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1113. N. 1–2. P. 45–54.

18. Kohler J., Kirkland J.J. Improved silica-based column packings for high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr.* 1987. V. 385. P. 125–150.

19. Doyle C.A., Vickers T.J., Mann C.K., Dorsey J.G. Characterization of C18-bonded liquid chromatographic stationary phases by Raman spectroscopy: the effect of mobile phase composition // *J. Chromatogr. A.* 2000. V. 877. N. 1–2. P. 25–39.

20. Pemberton J.E., Ho M., Orendorff C.J., Ducey M.W. Raman spectroscopy of octadecylsilane stationary phase conformational order. Effect of solvent // *J. Chromatogr. A.* 2001. V. 913. N. 1–2. P. 243–252.

21. Doyle C. A. , Vickers T.J., Mann C.K., Dorsey J.G. Characterization of C18-bonded liquid chromatographic stationary phases by Raman spectroscopy: the effect of temperature // *J. Chromatogr. A.* 2000. V. 877. N. 1–2. P. 41–59.

22. Doyle C. A., Vickers T.J., Mann C.K., Dorsey J.G. Characterization of C18-bonded liquid chromatographic stationary phases by Raman spectroscopy. Effect of ligand type // *J. Chromatogr. A*. 1997. V. 779. N. 1–2. P. 91–112.
23. Lumley B., Khong T.M., Perrett D. The characterisation of chemically bonded chromatographic stationary phases by thermogravimetry // *Chromatographia*. 2004. V. 60. N. 1/2. P. 59–62.
24. Ashu-Arrah B.A., Glennon J.D., Albert K. Synthesis, characterisation and chromatographic evaluation of pentafluorophenyl and phenyl bonded silica phases prepared using supercritical carbon dioxide as a reaction solvent // *J. Chromatogr. A*. 2013. V. 1273. P. 34–43.
25. Schmidt I., Minceva M., Arlt W. Selection of stationary phase particle geometry using X-ray computed tomography and computational fluid dynamics simulations // *J. Chromatogr. A*. 2012. V. 1225. P. 141–149.
26. Sander L.C., Wise S.A. Shape selectivity in reversed-phase liquid chromatography for the separation of planar and non-planar solutes // *J. Chromatogr. A*. 1993. V. 656. N. 1–2. P. 335–351.
27. Ottaviani M. F., Leonardis I., Cappiello A., Cangiotti M., Mazzeo R., Trufelli H., Palma P. Structural modifications and adsorption capability of C18-silica/binary solvent interphases studied by EPR and RP-HPLC // *J. Coll. Interface Sci*. 2010. V. 352. N. 2. P. 512–519.
28. Liu Y., Grinberg N., Thompson K.C., Wenslow R.M., Neue U.D., Morrison D., Walter T.H., O’Gara J.E., Wyndham K.D. Evaluation of a C18 hybrid stationary phase using high-temperature chromatography // *Analyt. Chim. Acta*. 2005. V. 554. N. 1–2. P. 144–151.
29. Buszewski B., Bocian S., Rychlicki G., Vajda P., Felinger A. Study of solvent adsorption on chemically bonded stationary phases by microcalorimetry and liquid chromatography // *J. Coll. Interface Sci*. 2010. V. 349. N. 2. P. 620–625.
30. Gritti F., Kazakevich Y.V., Guiochon G. Effect of the surface coverage of endcapped C18-silica on the excess adsorption isotherms of commonly used organic solvents from water in reversed phase liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2007. V. 1169. N. 1–2. P. 111–124.
31. Guan-Sajonz H., Guiochon G. Effect of packing pressure on the performance of C18 reversed-phase liquid chromatographic columns // *J. Chromatogr. A*. 1996. V. 743. N. 2. P. 247–259.
32. Рудаков О.Б., Рудакова Л.В. Гидрофобно-гидрофильный баланс жидкостных хроматографических систем // *Бутлеровские сообщения*. 2011. Т.24. №2. С. 22–32.
33. McCalley D.V., Brereton R.G. High-performance liquid chromatography of basic compounds. Problems, possible solutions and tests of reversed-phase columns // *J. Chromatogr. A*. 1998. V. 828. N. 1–2. P. 407–420.
34. Euerby M.R., Petersson P. Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns using principal component analysis // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 994. N. 1–2. P. 13–36.
35. Visky D., Vander H.Y., Iványi T., Baten P., De Beerc J., Kovács Z., Noszál B., Roets E., Massart D.L., Hoogmartens J. Characterisation of reversed-phase liquid chromatographic columns by chromatographic tests. Evaluation of 36 test parameters: repeatability, reproducibility and correlation // *J. Chromatogr. A*. 2002. V. 977. N. 1. P. 39–58.
36. Jandera P., Novotná K., Beldean-Galea M.S., Jísa K. Retention and selectivity tests of silica-based and metal-oxide bonded stationary phases for RP-HPLC // *J. Sep. Sci*. 2006. V. 29. N. 6. P. 856–871.

37. Jandera P., Bunceková S., Halama M., Novotná K., Nepras M. Naphthalene sulphonic acids – new test compounds for characterization of the columns for reversed-phase chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2004. V. 1059. N. 1–2. P. 61–72.

38. Gritti F., Guiochon G. Effect of the density of the C₁₈ surface coverage on the adsorption mechanism of a cationic compound and on the silanol activity of the stationary phase in reversed phase liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2006. V. 1132. N. 1–2. P. 51–66.

39. Méndez A., Bosch E., Rosés M., Neue U.D. Comparison of the acidity of residual silanol groups in several liquid chromatography columns // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 986. N. 1. P. 33–44.

40. Herrero-Martínez J.M., Méndez A., Bosch E., Rosés M. Characterization of the acidity of residual silanol groups in microparticulate and monolithic reversed-phase columns // *J. Chromatogr. A*. 2004. V. 1060. N. 1–2. P. 135–145.

41. Marín A., Barbas C. Systematic comparison of different functionality columns for a classical pharmaceutical problem // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006. V. 40. N. 2. P. 262–270.

42. Nyiredy S., Szűcs Z., Szepesy L. Stationary-phase optimized selectivity LC (SOS–LC): separation examples and practical aspects // *Chromatographia*. 2006. Suppl. 13. V. 63. P. S3–S9.

43. Dolan J.W., Snyder L.R., Blanc T. Selectivity differences for C18 and C8 reversed-phase columns as a function of temperature and gradient steepness. II. Minimizing column reproducibility problems // *J. Chromatogr. A*. 2000. V. 897. N. 1–2. P. 51–63.

44. Zhu P. I., Dolan J. W., Snyder L. R. Combined use of temperature and solvent strength in reversed-phase gradient elution. II. Comparing selectivity for different samples and systems // *J. Chromatogr. A*. 1996. V. 756. N. 1–2. P. 41–50.

45. Zhu P.I., Dolan J.W., Snyder L.R., Hill D.W., Van Heukelem L., Waeghe T.J. Combined use of temperature and solvent strength in reversed-phase gradient elution. III. Selectivity for ionizable samples as a function of sample type and pH // *J. Chromatogr. A*. 1996. V. 756. N. 1–2. P. 51–62.

46. Zhu P.I., Dolan J.W., Snyder L.R., Djordjevic N.M., Hill D.W., Lin J.-T., Sander L.C., Van Heukelem L. Combined use of temperature and solvent strength in reversed-phase gradient elution. IV. Selectivity for neutral (non-ionized) samples as a function of sample type and other separation conditions // *J. Chromatogr. A*. 1996. V. 756. N. 1–2. P. 63–72.

47. Kaliszan R., Van Straten M.A., Markuszewski M., Cramers C.A., Claessens H.A. Molecular mechanism of retention in reversed-phase high-performance liquid chromatography and classification of modern stationary phases by using quantitative structure–retention relationships // *J. Chromatogr. A*. 1999. V. 855. N. 2. P. 455–486.

48. Schmitz S.J., Zwanziger H., Engelhardt H. Characterization of reversed phases by chemometric methods // *J. Chromatogr. A*. 1991. V. 544. P. 381–391.

49. Tan L.C., Carr P.W., Abraham M.H. Study of retention in reversed-phase liquid chromatography using linear solvation energy relationships. I. The stationary phase // *J. Chromatogr. A*. 1996. V. 752. N. 1–2. P. 1–18.

50. Sándi A., Nagy M., Szepesy L. Characterization of reversed-phase columns using the linear free energy relationship. III. Effect of the organic modifier and the mobile phase composition // *J. Chromatogr. A*. 2000. V. 893. N. 2. P. 215–234.

51. Wilson N.S., Nelson M.D., Dolan J.W., Snyder L.R., Wolcott R.G., Carr P.W. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography. I. A general quantitative relationship // *J. Chromatogr. A*. 2002. V. 961. N. 2. P. 171–193.

52. Wilson N.S., Nelson M.D., Dolan J.W., Snyder L.R., Carr P.W. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography II. Effect of a change in conditions // *J. Chromatogr. A*. 2002. V. 961. N. 2. P. 195–215.
53. Wilson N.S., Dolan J.W., Snyder L.R., Carr P.W., Sander L.C. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography III. The physico-chemical basis of selectivity // *J. Chromatogr. A*. 2002. V. 961. N. 2. P. 217–236.
54. Baczek T., Kaliszan R., Novotná K., Jandera P. Comparative characteristics of HPLC columns based on quantitative structure-retention relationships (QSRR) and hydrophobic-subtraction model // *J. Chromatogr. A*. 2005. V. 1075. N. 1–2. P. 109–115.
55. Smith R.M., Subba Rao P.V., Dube S., Shah H. Problems of the interlaboratory transferability of the measurement of the properties of a reversed-phase HPLC column // *Chromatographia*. Suppl. V. 57. 2003. P. S27–S37.
56. Neue U.D., Phoebe C.H., Tran K., Cheng Y.-F., Lu Z. Dependence of reversed-phase retention of ionizable analytes on pH, concentration of organic solvent and silanol activity // *J. Chromatogr. A*. 2001. V. 925. N. 1–2. P. 49–67.
57. Голубицкий Г.Б., Иванов В.М. Метод оценки остаточной силанольной активности обращенно-фазовых хроматографических сорбентов // *Журн. аналит. химии*. 2008. Т. 63. № 4. С. 388–395.
58. Голубицкий Г.Б. Способ определения остаточной силанольной активности обращенно-фазовых хроматографических сорбентов // Пат. 2334982 Российская Федерация. Опубл. 27.09.08. Бюл. № 27. 8 с.
59. Lesellier E., Tchaplal A. A simple subcritical chromatographic test for an extended ODS high performance liquid chromatography column classification // *J. Chromatography A*. 2005. V. 1100. N. 1. P. 45–59.
60. Lesellier E., Tchaplal A. Use of carotenoids in the characterization of octadecylsilane bonded columns and mechanism of retention of carotenoids on monomeric and polymeric stationary phases // *J. Chromatogr. A*. 1993. V. 645. N. 1. P. 29–39.
61. Kirkland J.J., van Straten M.A., Claessens H.A. High pH mobile phase effects on silica-based reversed-phase high-performance liquid chromatographic columns // *J. Chromatogr. A*. 1995. V. 691. N. 1–2. P. 3–19.
62. Fonseca D.A., Gutierrez H.R., Collins K.E., Collins C.H. Rapid method for evaluating reversed-phase high-performance liquid chromatography column stability // *J. Chromatogr. A*. 2004. V. 1030. N. 1–2. P. 149–155.
63. Kirkland J.J., van Straten M.A., Claessens H.A. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of basic compounds at pH 11 with silica-based column packings // *J. Chromatogr. A*. 1998. V. 797. N. 1–2. P. 111–120.
64. Rogers S.D. Chromatographic silanol activity tests: the development of a comprehensive test procedure // Diss. doct.philos. The Florida state university, 2003. 120 p.

Голубицкий Григорий Борисович – д.х.н.,
начальник отдела новых технологий ОАО
«Фармстандарт-Лексредства», Курск

Golubitckiy Grigoriy B. – doctor of sciences
(chemistry), the head of new technologies
department of JSC “Pharmstandard-Leksredstva”,
Kursk, e-mail: iirogirg@narod.ru