



УДК 541.183.2:543.422

Обобщенные критерии элюирующей способности растворителей в высокоэффективной жидкостной хроматографии

Рудаков О.Б.

Воронежский государственный архитектурно-строительный университет, Воронеж

Рудакова Л.В.

Воронежская государственная медицинская академия, Воронеж

Поступила в редакцию 15.06.2011 г.

Аннотация

Обсуждены возможности применения обобщенных критериев полярности и липофильности в качестве критериев элюирующей силы растворителей при сопоставлении хроматографических свойств подвижных фаз в условиях нормально- и обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Ключевые слова: нормально-фазовая и обращенно-фазовая ВЭЖХ, элюирующая способность, подвижная фаза, растворители, U-образные профили параметров удерживания

The possibility of applying the generalized criteria of polarity and lipophilicity as criteria of eluting strength of solvents by comparing the chromatographic properties of mobile phases in normal- and reversed-phase HPLC is discussed.

Keywords: normal and reversed-phase HPLC, eluting strength, solvents, U-Shaped retention profile

Введение

Условно высокоэффективную жидкостную хроматографию делят на нормально-фазовую (НФ) и обращенно-фазовую (ОФ). В первом случае неподвижная фаза полярная, это, как правило, полярный сорбент на основе немодифицированного («голового») силикагеля, реже оксида алюминия или циркония. Кроме того в режиме нормально-фазовой ВЭЖХ применяют сорбенты, поверхность которых модифицирована полярными функциональными группами (диольной, амино-, нитро- и цианогруппами и др., привитыми на короткий пропильный линкер). В качестве подвижной фазы в этом варианте используют неполярный растворитель (гексан, гептан, изооктан, галогеналканы) с минорной добавкой относительно полярного модификатора (сложные и простые эфиры, спирты и др.). К обращенно-фазовому варианту относят хроматографические системы с неполярными неподвижными фазами, как правило, модифицированными гидрофобными

алкильными (C8-C18), фенильными, перфторированными алкиларильными группами. В этом случае в качестве подвижной фазы используют полярные смеси гидрофильных растворителей с водой или буферными растворами [1-2].

В хроматографической практике появились сорбенты, у которых между силикагелем и привитой гидрофобной группой (C₁₈-, C₈-, Ph- и др.) находится сравнительно полярный фрагмент (специальная полярная вставка), а кроме этого остаточные силанольные группы могут быть эндкепированы не гидрофобизирующим сорбент триметилхлорсиланом для подавления силанольной активности, а соединениями, придающими поверхности сорбента гидрофильные свойства. К такому смешанному типу можно отнести сорбенты Synergy Hydro-RP и Synergy Polar-RP (изготовитель Феноменекс, США) и др. Обращенно-фазовые хроматографические системы с подобными сорбентами обладают повышенной гидрофильной селективностью, сохраняя при этом и метиленовую (гидрофобную) селективность. Эти сорбенты нашли применение, например, в разделении стероидов, пестицидов, афлатоксинов, органических кислот. Наличие и гидрофобных, и гидрофильных функциональных групп на поверхности сорбента вносит элемент непредсказуемости в порядок удерживания полифункциональных сорбатов [1-4].

Известна проблема прогноза элюирующей силы растворителей в НФ и ОФ ВЭЖХ, а также в условиях, как бы, промежуточных между двумя крайними вариантами, например, в условиях гидрофильной хроматографии.

Цель работы – обсудить возможность применения обобщенных критериев полярности (гидрофильности) и липофильности в качестве критериев элюирующей силы подвижных фаз для нормально- и обращено-фазового вариантов ВЭЖХ.

В 70-80-х годах прошлого века были получены эмпирические элюотропные ряды растворителей для хроматографии на «голом» и модифицированном силикагеле - $\varepsilon^o(\text{SiO}_2)$ и $\varepsilon^o(\text{C}_{18})$, на оксиде алюминия и активном угле - $\varepsilon^o(\text{Al}_2\text{O}_3)$ и $\varepsilon^o(\text{C})$ [1,2]. В настоящее время, благодаря усовершенствованным способам получения сорбентов, их хроматографические характеристики изменились и найденные для «старых» сорбентов элюотропные ряды растворителей стали иметь значение качественных приблизительных оценок. «Голый» оксид алюминия и активный уголь практически вышли из употребления, модифицированные органическими функциональными группами оксиды алюминия и циркония не нашли еще широкой коммерческой реализации, появляется все большее количество сорбентов на полимерной основе, для которых установлены свои специфические элюотропные ряды. Наряду с адсорбционным и сольвофобным механизмам удерживания на новых сорбентах могут реализовываться ионообменный, ион-эксклюзионный и квази-нормально-фазовый механизмы [4].

Есть достаточно много примеров, и они постоянно множатся, когда, по мере изменения состава элюентов, конкурирующие механизмы удерживания меняются местами, один механизм начинает превалировать над другим. Это приводит к U-образным зависимостям параметров удерживания от состава подвижной фазы, т.е., элюирующая сила растворителей по одному типу удерживания может падать, а по другому типу – возрастать [5-11].

В связи с тем, что и теоретически и практически границы между разными типами ВЭЖХ существенно размылись, поиск эмпирических элюотропных серий потерял свое первоначальное значение. Вместе с тем сохранилась потребность в удобной единой шкале для разных подвижных фаз (ПФ), которая характеризовала бы их хроматографические свойства, позволяла бы сравнивать между собой не только чистые хроматографические растворители, но и двух- и более компонентные элюенты, в том числе и их элюирующую силу в разных режимах.

Элюирующая способность определяется в первую очередь полярностью растворителей. В условиях НФ ВЭЖХ элюирующая сила возрастает с увеличением полярности ПФ, а в условиях ОФ ВЭЖХ, наоборот, чем выше полярность ПФ, тем меньше ее элюирующая способность.

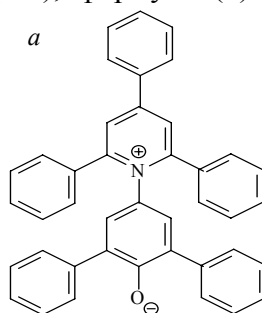
Первым критерием полярности растворителей, который был использован в хроматографии еще ее основоположником Цветом М.С., является диэлектрическая проницаемость ϵ_r . Несовершенством ϵ_r является невозможность с ее помощью описать молекулярные взаимодействия между растворителем и растворенным веществом на молекулярном уровне. Дипольный момент μ , в отличие от ϵ_r , определяет полярность вещества на молекулярном уровне, он характеризует электрические свойства молекулы как системы заряженных частиц. Дипольному моменту сорбата и полярного модификатора уделяет большое внимание в своих теоретических выкладках Сычев С.Н. [12]. Вместе с тем, прямое применение этого параметра как самостоятельной независимой переменной в эмпирических зависимостях «удерживание – дипольный момент модификатора ПФ» позволяет говорить лишь о тенденциях, которые проявляют растворители, молекулы которых обладают высоким или низким дипольным моментом. Чаще всего тесных корреляций с параметрами удерживания дипольный момент ни сорбата, ни модификатора не дает.

Другим широко известным критерием полярности, который относительно успешно применяют в жидкостной хроматографии для оценки элюирующей силы растворителей, является параметр растворимости Гильдебранда δ_T . Он характеризует количество работы, затрачиваемой на отделение молекул растворителя друг от друга. К недостаткам параметра растворимости δ_T с хроматографической точки зрения можно отнести не единичные отклонения прогнозируемой им элюирующей силы от экспериментально наблюдаемой. Снайдер Л., еще в 70-е годы прошлого века предложил использовать параметр полярности P' , который надо определять экспериментально методом газовой хроматографии по подобранным реперным веществам. Этот параметр находят по формуле:

$$P' = \lg K''_e + \lg K''_d + \lg K''_n$$

где $\lg K_i''$ – эмпирически модифицированные коэффициенты распределения стандартных веществ (этанола, диоксана и нитрометана) между паровой фазой и испытуемым растворителем. Индексы e , d и n обозначают этанол, диоксан и нитрометан [1].

В конце прошлого, начале нашего века всё чаще стал применяться в жидкостной хроматографии нормализованный сольватохромный параметр Димрота - Райхардта $E_T(30)$. Он вычисляется на основании спектроскопических измерений взаимодействия растворителя со стандартным N-феноксипиридинийбетаиновым красителем (30-тый в выбранной серии), формула (a):



Энергия электронного перехода полосы переноса заряда характеризует степень полярности растворителя. Чем выше величина $E_T(30)$, тем полярней растворитель. Краситель (a) выступает химическим сенсором, реагирующим на суммарный эффект парциальных полярностей, которые для величины $E_T(30)$ не дифференцированы [15].

Приведенные выше критерии проанализированы в качестве критериев полярности и элюирующей силы в работах [1,2,13,14,15]. Они устанавливают похожие в большей или меньшей степени порядки изменения полярности растворителей, т.е. между разными шкалами полярности (элюотропными рядами) прослеживаются приближенные корреляции (рис.1).

Вместе с тем, в отдельных случаях некритичное использование того или иного конкретного критерия может приводить к промахам в оценке хроматографических свойств ПФ, так как ни один из них не учитывает в полной мере всего комплекса взаимодействий и явлений, сопутствующих хроматографическому процессу.

Рудаковым О. в работе [14] предложен редуктивный критерий полярности P_N , который получен путем обобщения нормализованных параметров P' , δ_T , ε_r и $E_T(30)$ большого числа растворителей (табл.1.). Для практического удобства максимальное значение критерия полярности для воды приняли равным 100, а минимальное значение P_N для декана приравняли нулю. Этот критерий характеризует не только полярность в целом, но и гидрофильность (химическое сродство к воде), в частности. Он хорошо вписывается в экспериментальный миксотропный ряд, который используется, например, в жидкостно-жидкостной экстракции [2,3].

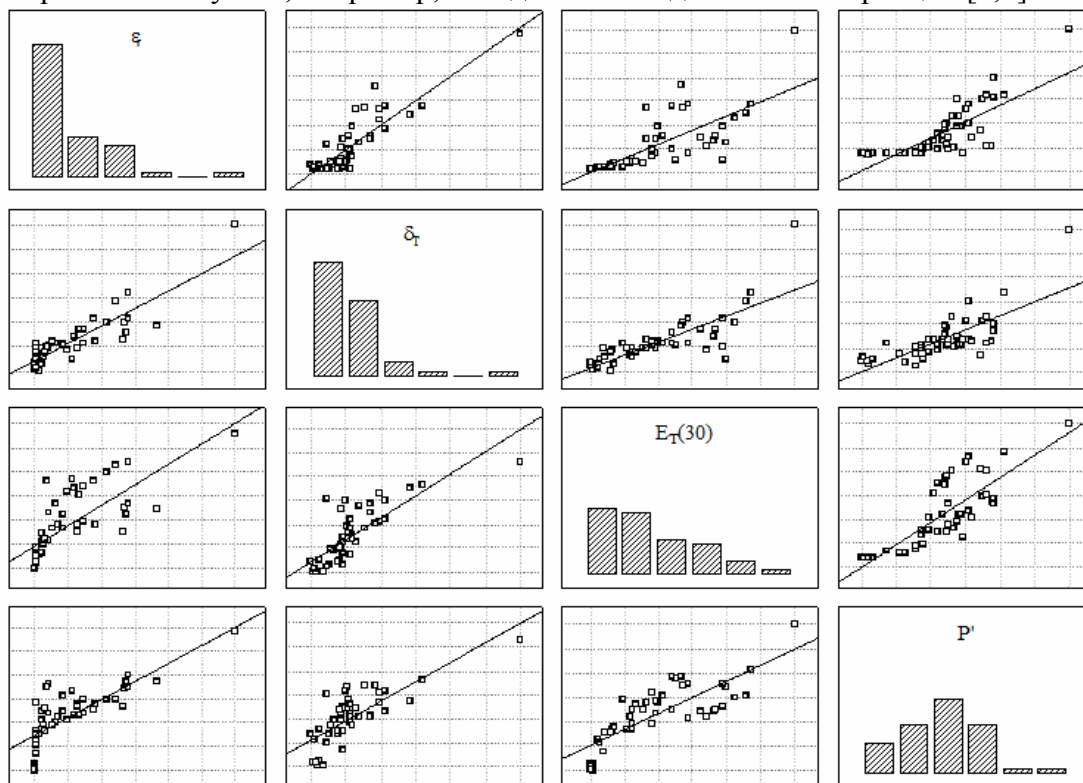


Рис. 1. Матричный график и гистограммы плотности распределения переменных, характеризующие корреляции между критериями полярности P' , δ_T , ε_r и $E_T(30)$ для 48 растворителей

Термин *редуктивный* подчеркивает основной смысл критерия – сокращение (редукция) числа переменных, используемых в оценке полярности. В рамках безразмерной обобщенной шкалы полярности P_N достигается эффект сглаживания аномально низких или, наоборот, высоких значений полярности отдельных растворителей, обусловленных специфической чувствительностью того или иного критерия к одной из парциальных полярностей. Этот критерий тесно коррелирует с эмпирическими параметрами элюирующей силы растворителя как на «голом» силикагеле, так и на силикагеле, модифицированном группами C_{18} – параметрах $\varepsilon^o(SiO_2)$ и $\varepsilon^o(C_{18})$ соответственно. В [14] показано, что для оценки полярности (элюирующей силы) смешанных ПФ можно с достаточно хорошим приближением использовать аддитивные значения P_N .

Для объемов удерживания V_R и факторов удерживания, как правило, в условиях ОФХ хорошо соблюдаются линейные зависимости:

$$\log V_R = a_i - b_i \varphi_2, \quad (1)$$

$$\log k = a_j - b_j \varphi_2, \quad (2)$$

где $a_{i,j}$ и $b_{i,j}$ – эмпирические коэффициенты, индивидуальные для разных модификаторов и сорбатов. Аналогичные зависимости (3) наблюдаются, если вместо концентраций модификаторов взять обобщенный критерий полярности [14]:

$$\log V_R = a_k + b_k P_N, \quad (3)$$

где a_k и b_k – также эмпирические коэффициенты, а P_N суммарная полярность ПФ, выраженная редуктивным (обобщенным) критерием полярности:

$$P_N = 100(1 - \varphi_2) + P_2 \varphi_2, \quad (4)$$

где $P_1 = 100$ – редуктивный критерий полярности воды, а P_2 – редуктивный критерий полярности модификатора, при этом коэффициенты a_k и b_k для смесей ацетонитрил – вода и метанол – вода, близки, они найдены с хорошей корреляцией также для обобщенной базы данных по удерживанию сорбатов в метанольных и ацетонитрильных ПФ, что и следовало ожидать, если обобщенный критерий действительно выполняет свою функцию [14].

По предложению Снайдера Л. элюирующая сила растворителя в ОФ ВЭЖХ определяется из экспериментальных линейных зависимостей логарифмов факторов удерживания от объемной доли органического модификатора в ПФ [1]:

$$\log k = \log k_1 - S \varphi_2, \quad (5)$$

где k_1 – фактор удерживания при использовании воды в качестве ПФ; φ_2 – объемная доля органического модификатора в ПФ. Коэффициент S является одной из мер элюирующей силы в ОФ ВЭЖХ. Недостатком уравнения (5) является то, что оно удовлетворительно соблюдается только в узком интервале $\Delta \varphi_2 = 0.3$ [1].

Вместе с тем, между коэффициентом S и редуктивным критерием P_N для индивидуальных растворителей, как показано в работе [2,14], существует достаточно тесная корреляция

$$S = 5.39 - 0.05 P_N \quad (6)$$

В случае элюирующей силы в ОФ ВЭЖХ для воды $S = 0$. В связи с этим мы предлагаем сделать обратную нормировку для редуктивного критерия полярности и получить на его основе новый элюотропный ряд для обращенно-фазовой хроматографии (табл.1):

$$R_L = 100 - P_N \quad (7)$$

Назовем полученный критерий редуктивным липофильным и обозначим его символом R_L . Максимальное значение этого критерия принадлежит декану ($R_L = 100$), липофильность воды равна нулю.

Таблица 1. Обобщенные критерии P_N и R_L для хроматографических растворителей

Обобщенные критерии для растворителей	P_N	R_L
декан	0	100
изооктан	0.32	99.68
пентан	0.45	99.55
циклогексан	0.71	99.29
гексан	0.85	99.15
гептан	1.44	98.56
триэтиламин	6.24	93.76
тетрахлорметан	7.29	92.71
сероуглерод	8.25	91.75
диизопропиловый эфир	9.02	90.98
диэтиловый эфир	11.73	88.27
толуол	12.07	87.93
бензол	13.44	86.56
хлорбензол	16.65	83.35
бромэтан	16.72	83.28
тетрагидрофуран	21.00	79.00
1,4-диоксан	21.71	78.29
этилацетат	21.84	78.16
хлороформ	22.00	78.00
метиленхлорид	23.04	76.96
1,2-дихлорэтан	24.88	75.12
1-октанол	28.85	71.15
бутанон	29.03	70.97
пиридин	29.04	70.96
трет-бутанол	29.12	70.88
1-пентанол	31.25	68.75
бензонитрил	31.72	68.28
ацетон	32.18	67.82
нитробензол	33.00	67.00
1-бутанол	36.29	63.71
2-пропанол	36.72	63.28
уксусная кислота	38.45	61.55
1-пропанол	39.09	60.91
диметилфосфамид	42.88	57.12
этанол	43.97	56.03
ацетонитрил	44.66	55.34
нитрометан	46.72	53.28
диметилсульфоксид	48.41	51.59
метанол	54.34	45.66
этиленгликоль	62.77	37.23
формамид	83.83	16.17
вода	100	0

Между коэффициентом S для обращенно-фазовых модификаторов и критерием R_L соблюдается хорошая корреляция (коэффициент парной корреляции $r=0.93$, $n=8$)

$$S=0.056R_L \quad (8)$$

Элюирующая сила бинарной ПФ вода-модификатор будет определяться простым линейным выражением, удобным в хроматографической практике:

$$R_L = R_{L2}\varphi_2, \quad (9)$$

где R_{L2} - элюирующая сила модификатора, а φ_2 его объемная доля.

Редуктивный липофильный критерий R_L предпочтительней в качестве характеристики элюирующей силы в ОФ ВЭЖХ, чем обратный ему критерий полярности P_N , так как мы имеем дело с прямой зависимостью, а в расчетах исчезает параметр воды.

Сложнее ситуация с элюирующей силой в условиях НФ ВЭЖХ. В этом случае она изменяется по зависимостям, далеким от линейных. Если в качестве шкалы, отражающей изменение полярности бинарного элюента взять аддитивные значения P_N , объемы удерживания фенолов можно адекватно описать уравнением инверсии 2-го порядка [3,5]

$$V_R = V_M + a/P + b/P^2, \quad (10)$$

где V_M - мертвый объем, a и b - эмпирические коэффициенты, P - суммарная полярность, выраженная обобщенным критерием полярности и рассчитанная по аддитивному уравнению

$$P = \sum \varphi_i P_i, \quad (11)$$

где φ_i - объемная доля i -го компонента подвижной фазы, а P_i - его полярность P_N .

Если исходить из обоснованного предположения, что с увеличением объемной доли ацетонитрила (или другого органического модификатора) вклад распределительного механизма сорбции в величину V_R возрастает, а вклад гидрофобной составляющей, напротив, падает, результирующее значение V_R можно представить в виде суммы вкладов:

$$V_R = (1-x)V_{NP} + xV_{RP}, \quad (12)$$

где V_{NP} - составляющая объема удерживания, обусловленная нормально-фазовым распределительным механизмом сорбции, V_{RP} - составляющая объема удерживания, обусловленная гидрофобным механизмом сорбции, x - коэффициент, зависящий от свойств хроматографической системы сорбат - элюент - сорбент [5].

С учетом выражений (1),(10),(12) и экспериментальных данных, по которым свободный эмпирический коэффициент уравнения (1) близок или равен величине мертвого объема, получим:

$$V_R = (1-x)(V_M + a/P + b/P^2) + x10^{(\log V_M + dP)} \quad (13)$$

При $x=0$ уравнение (13) вырождается в уравнение (10), т.е. объем удерживания лимитируется нормально-фазовым механизмом сорбции, при $x=1$ уравнение (10) преобразуется в уравнение (1), т.е. величина объема удерживания будет определяться обращенно-фазовым механизмом сорбции.

Как показано в [5], уравнение (13) адекватно описывает экспериментальные данные, полученные в условиях и НФ, и ОФ ВЭЖХ, в том числе и U-образные зависимости. Эмпирические коэффициенты уравнения (13), найденные методом компьютерной оптимизации, позволяют выявить силанольную активность сорбента, установить долю объема удерживания дифильного сорбата, обусловленную нормально-фазовым распределительным или гидрофобным механизмом сорбции.

Заключение

Для описания влияния состава и элюирующей силы подвижной фазы на удерживание сорбатов, для сопоставления хроматографических систем в условиях нормально- и обращенно-фазовой, а также гидрофильной хроматографии, для интерпретации U-образных зависимостей параметров удерживания от состава подвижной фазы в качестве единой шкалы могут быть использованы обобщенные критерии полярности (гидрофильности) и липофильности растворителей.

Список литературы

1. Схунмакерс П. Оптимизация селективности в хроматографии. М.: Мир, 1989. 399 с.
2. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В., Филиппов А.А., Селеменов В.Ф., Приданцев А.А. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии. – Воронеж: Водолей, 2004. 528 с.
3. Рудаков О. Б., Рудакова Л.В. Гидрофобно-гидрофильный баланс жидкостных хроматографических систем. Бутлеровские сообщения. 2011. Т.24. №2. С.22.
4. Сычев К.С. Практическое руководство по жидкостной хроматографии. М. : Техносфера, 2010. 272 с.
5. Рудаков О.Б. Высокоэффективная жидкостная хроматография фенолов в полярной подвижной фазе на аминопропильном силикагеле. Журнал физич. химии, т. 78. №12, 2004, с. 2268.
6. Sarker M., Duff K.J. “U-Shaped” Retention Profile as an Indicator of the Level of Silanol Activity of HPLC Silica Phases (<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/12000/11910.pdf>)
7. Nichthäuser J., Stepnowski P. Retention Mechanism of Selected Ionic Liquids On a Pentafluorophenylpropyl Polar Phase: Investigation using RP-HPLC. Journal of Chromatographic Science, V. 47, N3, 2009, p. 247.
8. Lämmerhofer M., Richter M., Wu J., Nogueira R., Bicker W., Lindner W. Mixed-mode ion-exchangers and their comparative chromatographic characterization in reversed-phase and hydrophilic interaction chromatography elution modes. Journal of Separation Science. 2008, V. 31, N14, 2572.
9. Bicker W., Wu J., Lindner W., Hydrophilic interaction chromatography in non-aqueous elution mode: Evaluation of an alternative separation concept for polar analytes on silica-based non-charged polar stationary phases. Journal of Separation Science. 2008, 31 N16-17, 2971.
10. Bicking M.K.L., Henry R.A. A Global Approach to HPLC Column Selection Using Reversed Phase and HILIC Modes: What to Try When C18 Doesn't Work. LG&GC North America, 2010. V.28, №3, p. 234.
11. Prus W., Vander Heyden Y., Vankeerberghen P., Kus P., Massart D.L., Kowalska T. Modelling of solute retention in the reversed-phase high-performance liquid chromatography system with the chemically bonded 3-цианопропил stationary phase. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 1999. №47, p. 253.
12. Сычев С.Н. Полуэмпирическая теория удерживания в нормально-фазовой ВЭЖХ на адсорбционно-модифицированном силикагеле. Сорбционные и хроматографические процессы. 2003. Т. 3. Вып. 4. С. 446.

13. Рудаков О.Б., Селеменев В.Ф., Сезин И.М., Аристов И.В., Данилова Е.В. Хемометрический подход в оценке элюирующей способности подвижных фаз в ВЭЖХ. Сорбционные и хроматографические процессы. 2001. Т.1. №6. С.1053.

14. Рудаков О.Б. Седишев И.П. Обобщенный критерий полярности растворителей как средство управления хроматографическим процессом. Известия РАН. Серия химическая. 2003,1, 52.

15. Райхардт, К. Растворители и эффекты среды в органической химии. – М.: Мир, 1991. 763 с.

Рудакова Людмила Васильевна – к.х.н., доцент кафедры фармацевтической химии и клинической фармации Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н. Бурденко, Воронеж, тел. (473) 2208185

Рудаков Олег Борисович – д.х.н., профессор, зав. кафедрой физики и химии Воронежского государственного архитектурно-строительного университета, Воронеж

Rudakova Lyudmila V. – k.kh.n., assistant professor of the chair of pharmaceutical chemistry and clinical pharmacy of Voronezh state medical academy, 394000, Voronezh, e-mail: vodoley65@mail.ru

Rudakov Oleg B. – professor, head of the chair of physics and chemistry of Voronezh state university of architecture and civil engineering, Voronezh