



УДК 543.544:543.45

Рефрактометрические свойства бинарных подвижных фаз для жидкостной хроматографии

Рудаков О.Б., Кудухова И.Г.

Воронежский государственный архитектурно-строительный университет, Воронеж

Рудакова Л.В.

Воронежская государственная медицинская академия, Воронеж

Поступила в редакцию 21.06.2010 г.

Аннотация

Изучены изотермы показателя преломления бинарных подвижных фаз от объемной доли активных растворителей (модификаторов) для нормально- и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Обсуждено влияние температуры на показатель преломления бинарных подвижных фаз гексан – модификатор и вода – модификатор.

Ключевые слова: изотермы показателя преломления, бинарные подвижные фазы, высокоэффективная жидкостная хроматография, гексан, вода, этанол, метанол, изопропанол, ацетонитрил, диоксан, тетрагидрофуран, хлороформ

Isotherms of refraction index of binary mobile phases depending on a volume fraction of active solvents (modifiers) for normal- and reverse-phase high performance liquid chromatography are investigated. Influence of temperature on an index of refraction of binary mobile phases hexane – modifier and water – modifier is discussed.

Keywords: Isotherms of refraction index, binary mobile phases, high performance liquid chromatography, hexane, water, ethanol, methanol, isopropanol, acetonitrile, dioxane, tetrahydrofuran, chloroform

Введение

Рефрактометрические свойства бинарных подвижных фаз для жидкостной хроматографии обсуждены в работах [1-5]. Показано, что учет влияния состава подвижной фазы (ПФ) и температуры позволяет контролировать чувствительность рефрактометрического детектирования. Рефрактометрический детектор (РМД) применяют для определения достаточно широкого спектра аналитов [1]. Для сокращения времени элюирования современные системы ВЭЖХ снабжены термостатами колонок, позволяющими осуществлять ВЭЖХ при повышенных температурах, а показатель преломления жидкостей весьма чувствителен к температуре (увеличение на 1 °С приводит к изменению n на $2-4 \cdot 10^{-4}$ единицы), поэтому представляется полезной информация об изменениях показателя

преломления ПФ при варьировании их состава и температуры термостатирования колонки.

Анализ изотерм $n-\varphi_2$ (где φ_2 – объемная доля модификатора) водных и неводных двойных систем указывает на то, что в большинстве бинарных смесей наблюдается неидеальность, выраженная в неаддитивном изменении показателя преломления при изменении состава системы, то есть наблюдаются относительные отклонения экспериментальных значений n от рассчитанных по аддитивной зависимости. В отдельных случаях они достигают более 4% [1,3].

Целью работы явилось изучение влияния объемной доли ряда модификаторов и температуры на показатель преломления бинарных ПФ как для нормально-фазовой, так и обращенно-фазовой жидкостной хроматографии.

Важность определения эмпирических зависимостей показателя преломления от состава ПФ обусловлена тем, что чувствительность РМД определяется разностью между коэффициентами Δn ПФ и сорбата. В случае использования близких к эквиобъемным бинарных ПФ, нижний предел обнаружения РМД (минимальное изменение показателя преломления, способное вызвать изменение выходного сигнала и достаточное для его надежного распознавания на фоне шумов нулевой линии) может быть заметно искажен, если не будет учтен эффект отклонения n от аддитивности [1,2]. Наконец, по величине показателя преломления двухкомпонентной ПФ можно достаточно точно и аппаратно просто определять концентрацию модификатора, если известна зависимость « n – состав ПФ».

Так как автоматическая дозировка компонентов ПФ в современных хроматографических системах осуществляется подачей в смеситель заданных объемов этих компонентов, за объемную долю модификатора удобно принимать величину, найденную по формуле:

$$\varphi_2 = V_2 / (V_1 + V_2), \quad (1)$$

где V_1 и V_2 – смешиваемые объемы (при заданной температуре) разбавителя (гексана или воды) и модификатора соответственно. Конечно, истинное значение $\varphi_{2,ист} = m_2 \rho_{12} / \rho_2$ (где ρ_{12} – плотность бинарной смеси, m_2 и ρ_2 – масса и плотность модификатора) будет из-за неаддитивного изменения плотности бинарной смеси несколько отличаться от значения, рассчитанного по формуле (1) [1,3,6].

Недаром на заре эпохи ВЭЖХ предлагалось составлять ПФ гравиметрическим методом [7]. Однако для хроматографистов более привычно оперировать регистрируемой хроматографом аддитивной величиной φ_2 , поэтому в данной работе величины n_{12} соотнесены не с истинными значениями $\varphi_{2,ист}$, как в работе [3], а с исходными объемными долями модификаторов, смешиваемых с разбавителем.

Эксперимент

Показатель преломления измеряли рефрактометром Аббе (ИРФ-454), за результат принимали среднеарифметическое трех параллельных измерений. Погрешность определения n рефрактометром ИРФ-454 составляла $\pm 2.5 \cdot 10^{-4}$, точность термостатирования – ± 0.2 °С. Шкала показателей преломления рефрактометра рассчитана для температуры 20 °С, при повышении температуры измерения изменяется коэффициент преломления стекла измерительной призмы. В данной работе температурный поправочный коэффициент для стекла призмы не учитывали.

Результаты и их обсуждение

Зависимости, представляемые в публикациях в виде графиков носят, как правило, демонстрационный характер, они не применяются в качестве номограмм на бумажных носителях. Так, на рис. 1 представлены примеры полученных нами 3D-графиков для наиболее часто применяемым в хроматографической практике бинарных смесей растворителей. Графики наглядно в общем виде показывают, как изменяется показатель преломления в зависимости от состава и температуры для той или иной бинарной системы. Для того чтобы иметь возможность использовать опубликованные результаты исследований в химико-инженерной практике, иллюстраций недостаточно, необходимо привести либо табличные данные, которые являются первичной информацией, либо получить алгебраические выражения, адекватно описывающие наблюдаемые эффекты. Регрессионный анализ экспериментальных данных сворачивает информацию, делает ее пригодной для дальнейших расчетов, интерполяций, экстраполяций и интерпретаций, поэтому в работе была проведена компьютерная экспертиза полученных данных.

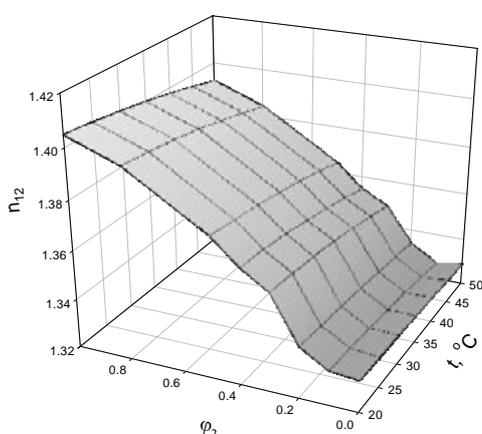
В [3-4] уже показано, что для бинарных смесей растворителей изотермы $n_{12}=f(\varphi_2)$ адекватно описываются полиномиальным уравнением третьей степени:

$$n_{12}=n_1+\alpha n_1\varphi_2+(\beta n_2-\alpha n_1-n_1)\varphi_2^2+(n_2-\beta n_2)\varphi_2^3, \quad (2)$$

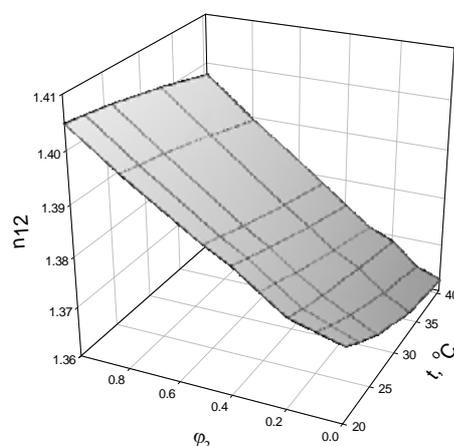
где α и β эмпирические коэффициенты; n_1 и n_2 – показатели преломления разбавителя и модификатора, соответственно; φ_2 – объемная доля модификатора. Уравнение (2) ограничивает зависимость при $\varphi_2=0$ или 1 значениями n исходных смешиваемых растворителей.

Регрессионный анализ, выполненный нами, показал, что зависимости (2) описывают точнее, чем ранее предложенные биномиальные регрессии, весь массив экспериментальных данных. В табл. 1 и 2 приведены найденные для 7 нормально-фазовых и 3 обращенно-фазовых систем эмпирические коэффициенты α и β .

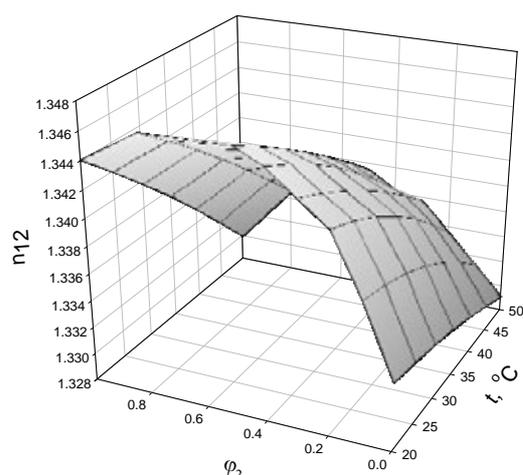
Коэффициенты α для обращенно-фазовых бинарных систем имеют положительные значения и варьируют в диапазоне 0.0086-0.0425. С увеличением температуры на 30 градусов они уменьшаются в 2-3 раза. Для нормально-фазовых систем гексан – модификатор наблюдаются различные тренды: как увеличение, так и уменьшение положительного или отрицательного значения коэффициента α , т.е. зависимости могут иметь как выпуклый, так и вогнутый профиль.



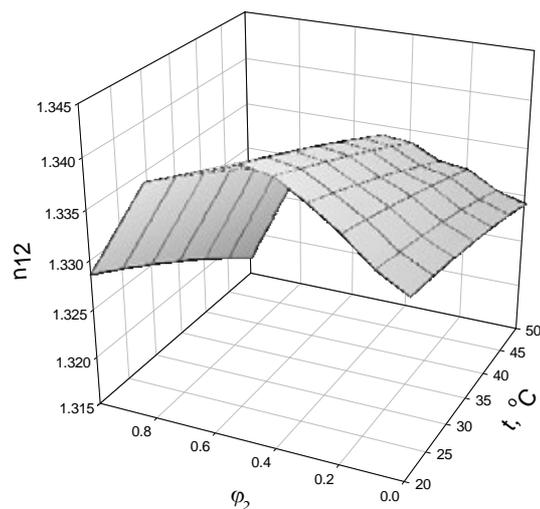
1) вода – ТГФ



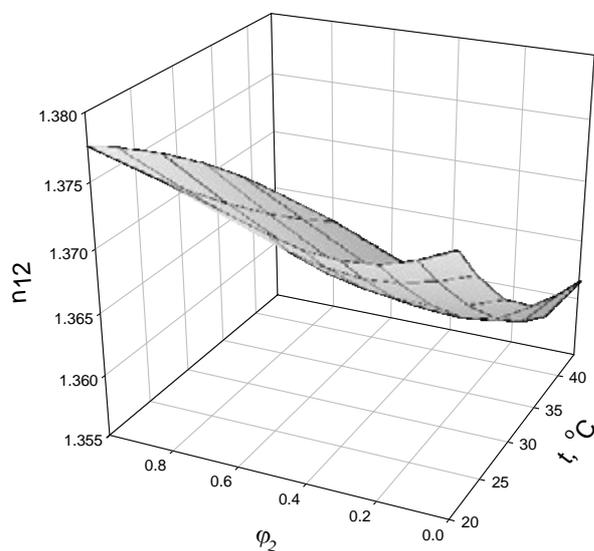
2) гексан – ТГФ



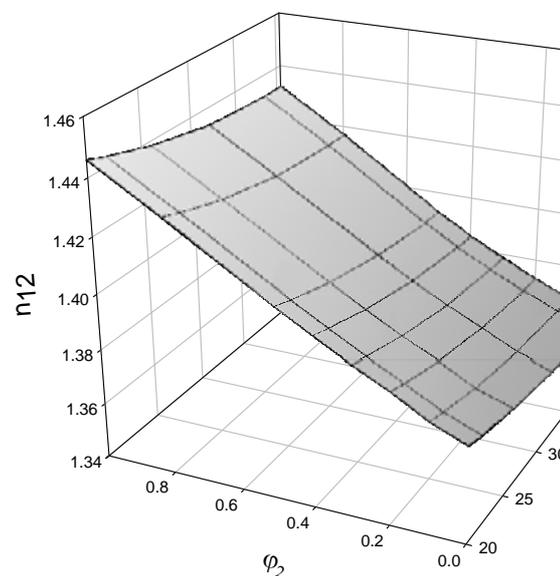
3) вода - ацетонитрил



4) вода - метанол



5) гексан - изопропанол



б) гексан – хлороформ

Рис. 1. Примеры зависимостей n_{12} от состава бинарной смеси и температуры

Таблица 1. Значения эмпирических коэффициентов α и β уравнения (2) для определения n_{12} по изотермам показателя преломления бинарных систем гексан – модификатор при разных температурах

Модификатор	Температура	Показатель преломления		Коэффициенты уравнения (2)	
		n_1	n_2	$\alpha \times 10^2$	$\beta \times 10$
Этанол	20	1.3749	1.3611	-2.23	10.09
	22	1.3728	1.3604	-2.12	10.07
	26	1.3691	1.3589	-1.89	10.04
	32	1.3651	1.3565	-1.68	10.02
	39	1.3626	1.3534	-1.55	10.03
	41	1.3624	1.3524	-1.62	10.05

Изопропанол	20	1.3749	1.3776	-1.19	10.12
	23	1.3718	1.3764	-1.03	10.09
	28	1.3675	1.3740	-0.95	10.07
	34	1.3643	1.3711	-1.25	10.11
	39	1.3627	1.3680	-1.85	10.20
	44	1.3615	1.3646	-2.32	10.29
Диоксан	20	1.3749	1.4224	1.89	10.14
	21	1.3738	1.4219	2.11	10.13
	25	1.3699	1.4200	2.82	10.09
	30	1.3662	1.4174	3.25	10.09
	35	1.3637	1.4147	3.24	10.12
	40	1.3625	1.4118	2.74	10.20
Диэтиловый эфир	20	1.3749	1.3526	-2.90	10.04
	27	1.3687	1.3462	-1.84	10.00
	32	1.3653	1.3427	-1.47	10.00
	37	1.3631	1.3404	-1.57	10.00
ТГФ	20	1.3749	1.4050	0.90	10.12
	23	1.3723	1.4044	1.33	10.09
	26	1.3691	1.4035	1.84	10.05
	33	1.3646	1.4011	2.33	10.01
	41	1.3624	1.3978	2.17	10.00
Этилацетат	20	1.3749	1.3724	-1.84	10.04
	22	1.3728	1.3702	-1.47	10.02
	27	1.3683	1.3656	-0.77	10.00
	32	1.3651	1.3622	-0.51	10.00
	37	1.3631	1.3602	-0.62	10.00
	41	1.3624	1.3595	-1.02	10.00
Хлороформ	20	1.3749	1.4459	4.24	10.07
	22	1.3731	1.4434	4.06	10.09
	26	1.3691	1.4381	3.69	10.11
	32	1.3651	1.4333	3.24	10.15
	39	1.3627	1.4316	2.91	10.17
	41	1.3624	1.4318	2.83	10.17

Характер наблюдаемых зависимостей определяется природой гомо- и гетеромежмолекулярных взаимодействий в данных бинарных системах. Если гетеромежмолекулярные взаимодействия между молекулами разбавителя и модификатора (образование водородных связей между молекулами воды и метанола) сильно конкурируют с гомомолекулярными взаимодействиями между одинаковыми молекулами (водородные связи вода – вода, метанол – метанол) изотермы «свойство – состав» имеют характер выпуклых кривых с эффектом синергизма. Если молекулы разбавителя (например, гексана) слабо взаимодействуют с более полярными молекулами (например, изопропанола), затрудняют взаимодействие между гидроксильными группами молекул спирта, этот эффект приводит к противоположному, но более слабо выраженному эффекту.

Коэффициент β для большинства систем имеет положительные отклонения от 1 на величину, не превышающую 8%. Иногда эти отклонения в пределах погрешностей регрессионного анализа незначимы и уравнение (2) вырождается в биномиальную модель, предложенную в работе [2].

Касательно влияния температуры на рефрактометрические свойства бинарных систем отметим, что в [4] установлено, что в диапазоне 21-41 °С зависимости $n_{12} = f(t)$ для смесей гексан – модификатор достаточно хорошо описываются линейными уравнениями (коэффициент парной корреляции $R=0.977-0.998$):

$$n_i = a - bt_i \quad (3)$$

где n_i – показатель преломления чистых и смешанных растворителей при температуре t_i . Анализ этих уравнений в [5] показал, что для чистых растворителей характерны собственные значения коэффициентов a и b температурной зависимости (3), а для их смесей наблюдаются промежуточные величины. Для чистой воды также применяют известную линейную зависимость:

$$n_i = n_{20} - \gamma(t_i - 20), \quad (4)$$

где n_{20} – показатель преломления жидкости при 20 °С, на которую рассчитана шкала рефрактометра; коэффициент $\gamma = 0.8 \cdot 10^{-4}$ град⁻¹.

Вместе с тем, анализ температурных зависимостей n бинарных систем вода–модификатор в диапазоне 25-50 °С, полученных в работе [5] показывает, что они нелинейны в этом интервале температур и применять уравнения типа (3) или (4) можно либо в более узких интервалах температур, либо в качестве первого приближения.

Учитывая результаты измерений в настоящей работе, было предложено применение более точного параболического уравнения, учитывающего наблюдающиеся отклонения от линейности (см. табл. 3 и 4):

$$n_i = n_{20} - \gamma(t_i - 20) + \omega(t_i - 20)^2, \quad (5)$$

С увеличением в системе гексан – модификатор объемной доли сравнительно сильно полярного модификатора (например, спирта) коэффициент γ уменьшается до значений характерных для чистого модификатора, если полярность модификатора мала (эферы, хлороформ), наблюдается нелинейное изменение величины γ с экстремумом, характерным для каждого модификатора. Минимальное значение температурного коэффициента γ характерно для воды, если пренебречь величиной ω , его величина близка температурному коэффициенту для чистой воды, найденному по линейной зависимости (4). Коэффициент ω для нормально-фазовых систем имеет, как правило, положительное значение и примерно на порядок больше, чем для обращенно-фазовых систем, для которых он имеет отрицательное значение.

Таблица 2. Значения эмпирических коэффициентов α и β уравнения (2) для определения n_{12} по изотермам показателя преломления бинарных систем вода – модификатор при разных температурах

Модификатор	Температура	Показатель преломления		Коэффициенты уравнения (2)	
		n_1	n_2	$\alpha \times 10^2$	$\beta \times 10$
Метанол	20	1.3330	1.3286	1.55	10.31
	25	1.3326	1.3269	1.34	10.33
	30	1.3321	1.3251	1.13	10.34
	35	1.3315	1.3232	0.94	10.35
	40	1.3308	1.3212	0.77	10.37
	45	1.3300	1.3191	0.68	10.38
	50	1.3291	1.3169	0.46	10.40

Ацетонитрил	20	1.3330	1.3441	4.25	9.83
	25	1.3326	1.3422	4.08	9.83
	30	1.3321	1.3396	3.83	9.85
	35	1.3315	1.3375	3.50	9.88
	40	1.3308	1.3350	3.10	9.93
	45	1.3300	1.3320	2.62	9.98
	50	1.3291	1.3298	2.06	10.05
ТГФ	20	1.3330	1.4050	3.01	10.82
	25	1.3326	1.4035	2.88	10.82
	30	1.3321	1.4030	2.66	10.82
	35	1.3315	1.4000	2.35	10.83
	40	1.3308	1.3975	1.94	10.84
	45	1.3300	1.3948	1.71	10.54
	50	1.3291	1.3925	0.86	10.88

Таблица 3. Значения эмпирических коэффициентов γ и ω уравнения (5) для бинарных систем гексан – модификатор

Модификатор, температурный диапазон (С°)	φ_2	$\gamma \times 10^4$	$\omega \times 10^4$
Этанол, 20-41	0	11.2	0.25
	0.1	10.4	0.23
	0.2	10	0.22
	0.3	9.5	0.21
	0.4	9.1	0.18
	0.5	8.6	0.15
	0.8	6.9	0.11
	1	3.5	-0.03
Изопропанол, 20-44	0	11.2	0.25
	0.1	10	0.17
	0.2	9.6	0.15
	0.3	9.5	0.14
	0.4	9.2	0.13
	0.5	8.5	0.1
	0.8	6.8	0.05
	1	3.9	-0.07
Хлороформ, 20-41	0	11.2	0.25
	0.1	12.2	0.28
	0.2	13.5	0.29
	0.3	14.1	0.31
	0.4	14.0	0.29
	0.5	14.1	0.30
	0.8	15.1	0.39
	1	15.5	0.42
Этилацетат, 20-41	0	11.2	0.25
	0.1	8.4	0.15
	0.2	6.9	0.08
	0.3	5.9	0.04
	0.4	6.2	0.04
	0.5	5.6	0.04
	0.8	8.4	0.13
	1	11.6	0.26

Диоксан, 20-40	0	11.2	0.21
	0.1	7.4	0.08
	0.2	6.6	0.08
	0.3	4.9	0.03
	0.4	4.8	0.02
	0.5	4.8	0.02
	0.8	3.5	-0.02
	1	4.7	-0.03
ТГФ, 20-41	0	11.2	0.25
	0.1	8.5	0.15
	0.2	6.3	0.08
	0.3	5.4	0.04
	0.4	5.9	0.04
	0.5	5.4	0.04
	0.8	5.9	0.04
	1	2.2	-0.07
Диэтиловый эфир, 20-37	0	11.2	0.25
	0.1	8.4	0.15
	0.2	6.9	0.08
	0.3	5.9	0.04
	0.4	5.5	0.04
	0.5	5.6	0.04
	0.8	8.4	0.13
	1	11.6	0.26

Таким образом, рефрактометрические свойства бинарных систем изменяются от состава подвижной фазы неаддитивно, иногда с синергетическими эффектами. Температурные эффекты носят также нелинейный, но с менее выраженной нелинейностью, характер.

Между экспериментальными данными из разных литературных источников наблюдаются некоторые расхождения, которые не носят принципиального характера. Они обусловлены зачастую не только погрешностями измерения показателя преломления рефрактометром, точностью подготовки состава смешанного растворителя (учитывался или нет объемный эффект при смешивании, влиял ли на измерения эффект изменения состава смеси за счет испарения более летучего компонента – или нет), флуктуациями температуры при термостатировании, но и разным качеством использованных индивидуальных растворителей.

Обсуждая на конференциях хроматографического сообщества состояние этого вопроса, известный ученый Ревельский И.А. считает практически все результаты определения физико-химических параметров индивидуальных, а тем более смешанных растворителей заведомо неверными, так как при их нахождении не учитывается наличие не обнаруженных или неизвестных примесей [8]. Например, в любом органическом растворителе есть хотя бы следы влаги. Во время элюирования через слой сорбента, который был хотя бы один раз в эксплуатации, оператор будет иметь дело с подвижной фазой, в которую попадет вода из неподвижной фазы, а значит, рефрактометрический детектор измерит показатель измененной подвижной фазы. Таким образом, эта проблема, безусловно, существует и проф. Ревельский в принципе прав. Однако в наших исследованиях мы исходим из того, что в практической работе хроматографисты имеют дело не с идеальными (абсолютно

чистыми) растворителями, а с «реальными» смесями. Иметь информацию о том, как изменяются их физико-химические свойства от состава основных компонентов, даже не зная эффекта минорных примесей или неучтенных минорных артефактов, все же необходимо, полагая, что «истина где-то рядом».

Таблица 4. Значения эмпирических коэффициентов γ и ω уравнения (5) для бинарных систем вода – модификатор

Модификатор, температурный диапазон (С°)	φ_2	$\gamma \times 10^4$	$\omega \times 10^4$
метанол, 20-50	0	0.7	-0.02
	0.1	1	-0.02
	0.2	1.6	-0.01
	0.3	2.2	-0.01
	0.4	2.3	-0.01
	0.5	2.4	-0.01
	0.8	2.9	-0.01
	1	3.3	-0.02
ацетонитрил, 20-50	0	0.7	-0.02
	0.1	0.8	-0.05
	0.2	1.5	-0.05
	0.3	1.9	-0.03
	0.4	2.0	-0.04
	0.5	2.5	-0.02
	0.8	3.4	-0.02
	1	4.1	-0.02
ТГФ, 20-50	0	0.7	-0.02
	0.1	0.8	-0.05
	0.2	1.1	-0.04
	0.3	1.5	-0.07
	0.4	1.7	-0.08
	0.5	2.0	-0.07
	0.8	2.1	-0.07
	1	2.2	-0.07

Заключение

Рассмотренные в статье эмпирические зависимости показателя преломления от объемной доли модификаторов в бинарных растворителях и от температуры расширяют базу научных данных по физико-химическим свойствам подвижных фаз, применяемых в ВЭЖХ. Количественные характеристики этих зависимостей позволяют прогнозировать и учитывать неаддитивность рефракционных свойств и влияние температуры на показатель преломления. Результаты исследования могут быть использованы при оптимизации качественного и количественного состава, при сопоставлении и интерпретации хроматографических свойств нормальных и обращенных подвижных фаз.

Авторы выражают благодарность к.х.н. Кривневой Г.Г. за участие в экспериментальных измерениях

Список литературы

1. Рудаков О.Б., Востров И.А., Филиппов А.А., и др. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии. - Воронеж: Водолей, 2004. 528 с.
2. Рудаков О.Б., Хрипушин В.В., Селеменев В.Ф., и др. Рейтинг растворителей для ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием //Теория и практика сорбционных процессов, 1998. № 24. с. 82.
3. Рудаков О.Б., Селеменев В.Ф. Показатель преломления бинарных подвижных фаз для высокоэффективной жидкостной хроматографии //Журнал физической химии, 1999, т. 73, № 12, с. 2242.
4. Рудаков О.Б., Кривнева Г.Г., Рудакова Л.В. Изотермы показателя преломления бинарных растворителей для нормально-фазовой жидкостной хроматографии // Конденсированные среды и межфазные границы, 2009, т. 11, № 2, с. 141.
5. Openhaim G., Grushka E. Temperature-dependent refractive index issues using a UV-visible detector in high-performance liquid chromatography//Journal of Chromatography A, 2002, № 942, p. 63.
6. Рудаков О.Б., Соколов М.И., Рудакова Л.В. Плотность бинарных подвижных фаз для высокоэффективной жидкостной хроматографии //Журнал физической химии, 1999, т. 73, № 7, с. 1165.
7. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии/Под. ред. А. Хеншен и др. М.: Мир. 1988. 688 с.
8. Рудаков О.Б., Рудакова Л.В., Подолина Е.А., Барсукова Л.Г. Изотермы коэффициентов проницаемости бинарных подвижных фаз для жидкостной хроматографии// Журнал физической химии, 2009, т.83, № 11, с. 2165.

Рудаков Олег Борисович - д.х.н., профессор, зав. кафедрой химии Воронежского государственного архитектурно-строительного университета, Воронеж, тел. (4732) 717617

Рудакова Людмила Васильевна - к.х.н., доцент кафедры фармацевтической химии Воронежской государственной медицинской академии, Воронеж, тел. (4732) 208185

Кудухова Инга Гайзовна – аспирант кафедры химии, Воронежский архитектурно-строительный университет, Воронеж

Rudakov Oleg B. - Professor, head of the chair of chemistry of Voronezh state university of architecture and civil engineering, Voronezh, rudakov@vgasu.vrn.ru

Rudakova Lyudmila V. – k.kh.n., the senior lecturer of the chair of pharmaceutical chemistry of the Voronezh state medical academy, Voronezh

Kudukhova Inga G. – graduate student, Voronezh state university of architecture and civil engineering, Voronezh, rudakov@vgasu.vrn.ru