

4. ОСНОВНЫЕ ВАРИАНТЫ ВЭЖХ

4.1. ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Из всех вариантов ВЭЖХ обращенно-фазовый применяется в настоящее время наиболее широко. Его привлекательность определяется методической простотой и универсальностью, во многих случаях — простотой механизма сорбции и предсказуемостью поведения веществ на основании их строения. Мода на обращенно-фазовую хроматографию стала всеобщей. По разным оценкам, этим методом выполняется сейчас 70—90% всех опубликованных в литературе разделений. В других разделах книги мы попытаемся показать, что следование моде вовсе не обязательно. Отчасти это ясно из приведенной на рис. 2.3 схемы выбора неподвижных фаз. Часто разделение одной и той же смеси можно выполнить на сорбентах различных типов, и нельзя не считаться с тем, что каждый из них может иметь определенные преимущества в смысле селективности или экономичности. Последнее обстоятельство особенно важно при разработке методов препаративного разделения, а также серийных анализов, выполняемых при контроле производства и качества продукции. Поэтому мы считаем, что роль обращенно-фазового метода в ВЭЖХ необоснованно преувеличена. Вероятно, целесообразно было бы применять его всего в 40—60% случаев. Тем не менее ясно, что независимо от колебаний хроматографической моды и точек зрения отдельных специалистов обращенно-фазовая хроматография и ее разновидности сохраняют свое важнейшее значение в арсенале методов разделения.

4.1.1. МЕХАНИЗМ УДЕРЖИВАНИЯ

Термин «обращенно-фазовая хроматография» ввели Говард и Мартин в 1950 г. [205], когда ими было описано разделение жирных кислот с использованием жидкого парафина и *n*-октана в качестве неподвижных фаз. В отличие от других, ранее применявшихся систем распределительной хроматографии здесь неподвижная фаза менее полярна, чем подвижная, что, собственно, и послужило поводом к такому наименованию.

Важнейшую роль в понимании механизма удерживания обращенно-фазовой хроматографии сыграли работы Хорвата и его школы [201—203]. Суть теории Хорвата заключается в следующем. Существует принципиальное различие между процессами сорбции на полярных поверхностях из относительно неполярных растворителей («нормально-фазовый режим») и сорбции из воды либо сильнополярных растворителей на поверхностях неполярных (обращенно-фазовый режим). В первом случае между молекулами сорбата и неподвижных фаз образуются ассоциаты за счет кулоновских взаимодействий или водородных связей. Во втором случае причиной ассоциации на поверхности являются так называемые сольвофобные взаимодействия в подвижной фазе. Для полярных подвижных фаз, в особенности содержащих воду, характерно сильное кулоновское взаимодействие и образование водородных связей между молекулами растворителей. Все молекулы в таких растворителях связаны довольно прочно межмолекулярными силами. Для того чтобы поместить в эту среду молекулу сорбата, необходимо образование «полости» между молекулами растворителя. Энергетические затраты на образование такой «полости» лишь частично покрываются за счет взаимодействия полярных групп в молекуле сорбата с полярными молекулами растворителя. В аналогичном положении по отношению к растворителю находятся и неполярные молекулы неподвижной фазы. С энергетической точки зрения более выгодно такое положение, когда поверхность раздела между полярной средой (растворителем) и неполярными фрагментами неподвижной фазы и молекул сорбата минимальна. Уменьшение этой поверхности и достигается при сорбции (рис. 4.1).

Таким образом, причиной сорбции в обращенно-фазовой хроматографии служит сильное притяжение полярных молекул растворителя одна к другой, как бы «прижимающее» растворенные менее полярные молекулы к неполярной поверхности. Из сказанного следует, что по сравнению с нормально-фазовой хроматографией в обращенно-фазовой роль химической природы неподвижной фазы относительно мала, так как взаимодействие сорбат—сорбент ограничивается слабыми дисперсионными силами.

Детальная интерпретация механизма сорбции на неполярных неподвижных фазах

выполнена Хорватом [201—203] на основе сольвофобной теории [357, 358]. Не останавливаясь на подробностях физико-химических выкладок, приводим лишь основные выводы сольвофобной теории обращенно-фазовой хроматографии.

Связь коэффициента емкости с условиями опыта, свойствами компонентов системы выражает следующее уравнение:

$$\ln k' = \Phi - \frac{\Delta F_{v,a}}{RT} + \frac{\Delta F_{v,s}}{RT} - \frac{N(\lambda - 1)\mu_s^2}{2\lambda v_s RT} DP + \frac{N\Delta A\gamma}{RT} + \frac{4,836N^{1/3}(k^e - 1)V^{2/3}\gamma}{RT} + \ln \frac{RT}{P_0 V} \quad (4)$$

где Φ — логарифм отношения объемов неподвижной и подвижной фаз; $\Delta F_{v,a}$ — изменение свободной энергии при ассоциации компонентов системы, помещенных в газовую фазу; $\Delta F_{v,s}$ — изменение свободной энергии при образовании полости в растворителе и заполнении ее молекулой хроматографируемого соединения; N — число Авогадро; R — газовая постоянная; T — температура; P_0 — давление в колонке; μ_s — дипольный момент сорбата; ΔA — изменение величины неполярной поверхности при сорбции; γ — поверхностное натяжение подвижной фазы; k^e — параметр, учитывающий отличие поверхности полости от плоской поверхности; v_s — объем молекулы сорбата; V — мольный объем подвижной фазы.

Теория предполагает, что объем ассоциата сорбат—сорбент v_{sL} пропорционален объему молекулы сорбата:

$$v_{sL} = \lambda v_s, \quad (4.2)$$

где λ — коэффициент.

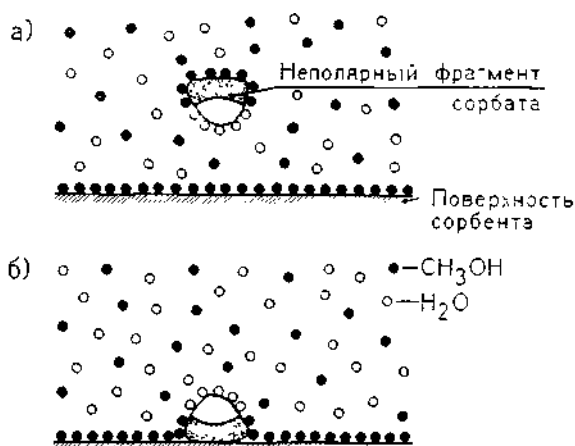


Рис. 4.1. К механизму обращенно-фазовой хроматографии: а — сорбат в растворе; б — сорбат на поверхности неподвижной фазы. Молекулы воды и органического растворителя обозначены светлыми и темными кружками соответственно.

Параметры P и D уравнения (4.1) определяются следующими соотношениями:

$$P = \frac{1}{4\pi\epsilon_0 \left(1 - D \frac{\alpha_s}{v_s}\right)} \quad (4.3)$$

$$D = \frac{2(\epsilon - 1)}{2\epsilon + 1}, \quad (4.4)$$

где ϵ_0 — диэлектрическая проницаемость; α_s — поляризуемость молекулы сорбата.

Уравнение (4.1) выведено авторами с учетом следующих допущений:

— $\Delta F_{v,a}$ определяется только ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями;

- молекулы растворителя, сорбата, неподвижной фазы, а также ассоциаты сорбат-сорбент имеют сферическую форму;
- молекулы растворителя намного меньше молекул неподвижной фазы, а последние намного крупнее молекул сорбатов;
- давление равно 1 атм;
- подвижная фаза несжимаема.

Применительно к некоторым частным случаям уравнение (4.1) может быть представлено в упрощенном виде. Так, для данного сорбата при постоянной температуре зависимость удерживания от состава подвижной фазы выражается уравнением

$$\ln k' = A + BD + C\gamma + D(k^e - 1)V^{2/3}\gamma + E + \ln(RT/P_0V). \quad (4.5)$$

С другой стороны, если состав подвижной фазы и колонка неизменны, коэффициент емкости различных сорбатов может быть найден по уравнению

$$\ln k' = A' + B' \frac{1 - \lambda}{2\lambda} \cdot \frac{\mu_s^2}{v_s} \cdot \frac{1}{(1 - \alpha_s / v_s)} + C' \Delta A \quad (4.5)$$

Из этого краткого изложения теории Хорвата ясно, что, несмотря на достаточно детальное физическое описание процессов, протекающих при обращенно-фазовой хроматографии, полностью априорный расчет удерживания — конечная цель хроматографической теории — остается трудноразрешимой задачей. Трудности такого расчета связаны как с неопределенностью некоторых параметров, так и с отклонениями реальных систем от допущений, сделанных при выводе уравнения (4.1). До сих пор неизвестны примеры априорного расчета параметров удерживания исходя из свойств сорбатов и других компонентов системы. В то же время анализ многочисленных экспериментальных закономерностей обращенно-фазовой хроматографии демонстрирует правильность основных выводов этой теории.

Уже в работе [202] Хорват показал, что для рядов родственных соединений соблюдается зависимость

$$\ln k' = A'' + \frac{N}{RT} \gamma \Delta A \quad (4.7)$$

Из уравнения (4.5) следует, что если мольный объем и параметр k^e постоянны, то удерживание данного вещества линейно связано с поверхностным натяжением подвижной фазы:

$$\ln k' = A''' + B'' \gamma \quad (4.8)$$

где A''' — сумма членов уравнения (4.5), не зависящих от поверхностного натяжения;

$$B'' = \frac{N \Delta A + 4.836 N^{1/3} (k^e - 1) V^{2/3}}{RT} \quad (4.9)$$

Установлено [202], что в водных подвижных фазах, где поверхностное натяжение изменяется за счет добавок хлористого калия, уравнение (4.8) также соблюдается удовлетворительно.

Наконец, в наиболее важном с точки зрения практики случае, когда подвижная фаза состоит из воды и органического растворителя (а часто и солей), параметр B'' уже не может считаться постоянным. Почленным анализом зависимости компонентов уравнения (4.5) от состава подвижной фазы получена зависимость удерживания от состава бинарной подвижной фазы, близкая к экспериментально наблюдаемой.

Обращенно-фазовая хроматография широко применяется не только для разделения нейтральных соединений, но и ионогенных веществ. В принципе, согласно [203], и для таких соединений процесс описывается сольвофобной теорией. Однако сорбаты такого рода существуют в растворе и адсорбированном состоянии как в виде нейтральных молекул, так и в виде ионов. Каждой из этих форм соответствует свое значение коэффициента емкости. В зависимости от pH среды изменяются соотношения различных форм в растворе и коэффициенты емкости — от величин, отвечающих нейтральной молекуле k'_0 , до значений, характерных для иона k'_{-1} . Для одноосновных кислот этот процесс отражает формула

$$k' = \frac{k'_o + k'_{-1} \frac{K_{aM}}{[H^+]_M}}{1 + \frac{K_{aM}}{[H^+]_M}} \quad (4.10)$$

где K_{aM} — константа ионизации кислоты в подвижной фазе; $[H^+]_M$ — концентрация ионов водорода в подвижной фазе.

Аналогично для слабых оснований

$$k' = \frac{k'_o + k'_{+1} \frac{[H^+]_M}{K_{aM}}}{1 + \frac{[H^+]_M}{K_{aM}}} \quad (4.11)$$

где k'_{+1} — коэффициент емкости протонированной формы.

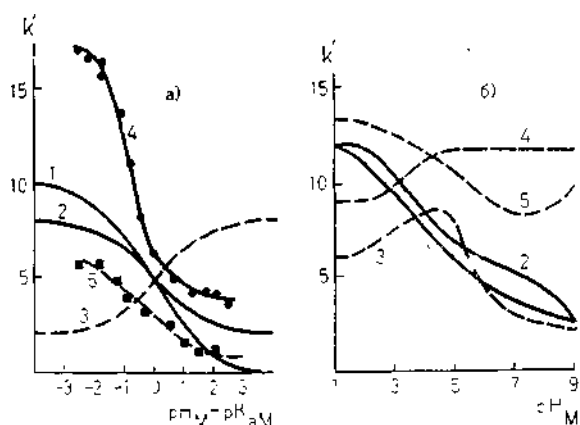


Рис. 4.2. Зависимость k' от pH подвижной фазы: а — одноосновные кислоты и основания; 1—3 расчетные кривые для кислот (1, 2) и основания (3); 4,5 — экспериментальные данные для бензойной (4) и диоксифенилуксус-ной кислот (5); б — расчетные кривые для двухосновных кислот (1, 2) и амфолитов (3—5).

Соответствующие выражения получены также для двухосновных кислот и амфолитов [203]. Зависимость коэффициентов емкости от pH подвижной фазы для одноосновных кислот и оснований имеет сигмоидную форму (рис. 4.2,а), в то время как для двухосновных кислот и амфолитов она более сложна (рис. 4.2,б). Зависимости, подобные приведенным на рис. 4.2, получены и экспериментально. Кривые рис. 4.2,а напоминают кривые титрования, при этом точка перегиба соответствует равенству концентраций нейтральной и заряженной форм. Следовательно, изучение зависимости удерживания от pH подвижной фазы может быть использовано для измерения рК органических кислот и оснований.

На рис. 4.3 представлены данные Хорвата с сотр. [203], демонстрирующие близость величин рК, найденных хроматографически и титриметрически. Видно, что наклон прямой близок к 45° и она стремится к началу координат. Значит, систематическая ошибка хроматографического метода незначительна. Разница между значениями рК одноосновных кислот и оксикислот, измеренными двумя методами, не превышает 0,2 ед. Как и хроматографические методы измерения других физико-химических величин, измерение рК. может оказаться наиболее удобным в случае, когда недоступны вещества достаточной чистоты или растворимость изучаемых соединений мала. Примером такого применения ВЭЖХ является измерение рКа α - и β -изомеров 11-дезоксипростагландина E_1 (рис. 4.4). Адекватность использованной модели проверена на примере каприловой кислоты, для которой величина рКа, найденная в хроматографических опытах и литературе, составляет 4,90 и 4,89 соответственно [29].

57

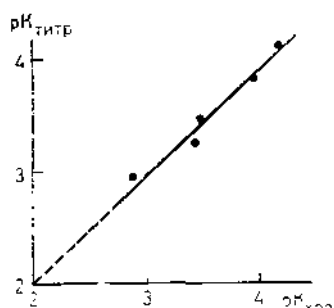


Рис. 4.3. Сопоставление значений рК ароматических одноосновных кислот и оксикислот, определенных хроматографически и титриметрически.

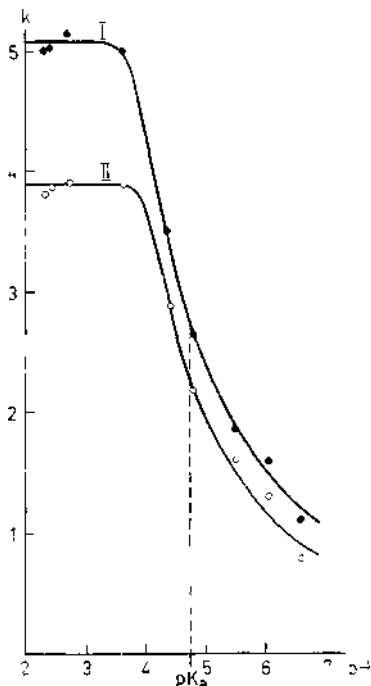


Рис. 44. Зависимость удерживания а-(I) и Р- (II) изомеров 11-дезоксинро-стагландина E\ от рН подвижной фазы; колонка — Зорбакс ODS, подвижная фаза — ацетонитрил—фосфатный б\фер (1:1).

Помимо рН при обращенно-фазовой хроматографии ионогенных соединений следует учитывать также ионную силу подвижной фазы. Этот параметр влияет даже на удерживание нейтральных сорбатов, так как определяет поверхностное натяжение растворителя:

$$\gamma = \gamma_0 + \sigma' I, \quad (4.12)$$

где I — ионная сила; γ_0 — поверхностное натяжение воды; σ' — константа, связанная с природой соли.

Подставив (4.12) в (4.1), нетрудно убедиться, что между $\lg k'$ и I тоже существует линейная зависимость.

Если сорбат ионизирован, необходимо учитывать, что присутствие солей в подвижной фазе влияет также на электростатические взаимодействия. Зависимость удерживания иона от ионной силы подвижной фазы в этом случае описывается уравнением

$$\lg k' = \lg k'^0 + \alpha(BI^{1/3} + CI) + \beta I, \quad (4.13)$$

где k'^0 — коэффициент емкости в подвижной фазе с $I=0$; α, β, B, C — коэффициенты.

Экспериментально установлено [203], что поведение нейтральных веществ в целом следует уравнению (4.12), а для ионов наблюдается зависимость, близкая к (4.13). В то же время нельзя не заметить, что разброс точек отдельных соединений на кривой, соответствующей зависимости $k'=f(I)$, относительно средних кривых весьма велик. Следовательно, уравнения (4.12) и (4.13), так же как основная модель (4.1), отражают лишь общие тенденции, и их использование в практических расчетах затруднительно.

4.1.2. ЗАКОНОМЕРНОСТИ СОРБЦИИ

4.1.2.1. УДЕРЖИВАНИЕ И СТРУКТУРА СОРБЕНТА

Согласно теории Хорвата, углеводородная неподвижная фаза представляет собой пассивный акцептор молекул сорбатов, «прижимаемых» к ней гидрофобными взаимодействиями. Специфические взаимодействия сорбат—сорбент крайне незначительны, и поэтому можно ожидать, что все обращенно-фазовые сорбенты должны проявлять близкие свойства. Действительно, при рассмотрении общих аспектов поведения сорбатов убеждаемся в значительном сходстве всех неполярных неподвижных фаз. Например, при замене одного обращенно-фазового сорбента другим редко удается изменить селективность разделения тех или иных веществ, что так легко достигается заменой компонентов подвижной фазы. В то же время более детальный анализ показывает, что свойства различных обращенно-фазовых сорбентов не идентичны и зависят от ряда причин. Различия между сорбентами можно отнести к одной из двух категорий:

- 1) различия, связанные с разным значением фазового отношения ϕ ;
- 2) различия, связанные со свободной энергией ассоциации сорбат—сорбент.

Различия первой категории обычно выражаются в том, что на разных сорбентах одни и те же сорбаты имеют разные значения k' , но примерно одинаковые — α .

Различия второй категории связаны главным образом с тем, что реальные сорбенты не вполне соответствуют модели идеальной неполярной поверхности по нескольким причинам. Во-первых, степень модификации силанольных групп может быть различной, и не всегда допустимо пренебрегать возможностью прямой сорбции на силикагелевой матрице. Так, в [97] указано, что концентрация силанольных групп на поверхности силикагеля составляет 8—9 мкмоль/м², в то

время как из-за пространственных затруднений плотность модификации алкильными группами не превышает 4 мкмоль/м². Во-вторых, влияние может оказывать структура частично упорядоченного слоя органических лигандов. Этот слой не плоская неполярная поверхность, а скорее разрыхленная приповерхностная зона, заполненная, наряду с модифицирующими лигандами, молекулами растворителя. Способность молекул разделяемых веществ сорбироваться на ее поверхности либо внедряться между отдельными радикалами лигандов, очевидно, будет зависеть от структуры последних. К сожалению, явления такого рода плохо предсказуемы, так что целенаправленно создать обращенно-фазовый сорбент, отличающийся по селективности в желаемом направлении, нелегко. Исследования в этом направлении тем не менее проводятся. Остановимся на некоторых достигнутых результатах.

Ряд авторов исследовали влияние длины цепи алкильных лигандов и процентного содержания углерода в сорбенте на удерживание. В работе [254] отмечено увеличение k' фенолов с ростом длины цепи. Это увеличение наиболее выражено при длине цепи 1—4 атома углерода, при дальнейшем росте цепи наблюдается тенденция к стабилизации k' . К аналогичным выводам пришли также и другие авторы [63, 127, 196, 283, 349]. В противоположность этим данным в работе [195] показано, что прогрессирующий рост удерживания наблюдается и для сорбентов, модифицированных длинными алкильными цепями.

В работе Танаки с соавт. [399] сопоставлены силикагели, модифицированные органическими радикалами общей формулы $—Si(CH_3)_2—(CH_2)_2—R$, где R — алкил, циклогексил, циклогексенил, фенил, нафтил, пиренил. Наряду с сольвофобным эффектом и сольватацией в подвижной фазе установлена определенная роль таких процессов в неподвижной фазе, как стерическое распознавание, π — π -взаимодействие. Плоские молекулы сорбатов сильнее удерживаются неподвижными фазами, содержащими плоские фрагменты. Ароматические лиганды придают сорбенту несколько большую полярность, чем у алкилсиликагелей. Аналогичное наблюдение сделано в работе [282]: циклогексилсиликагель предпочтительнее сорбирует циклические соединения, чем алифатические. В работе [298] проведено сравнение величин удерживания веществ различной полярности на фенил-, бензил-, фенэтил- и октилсиликагелях. Показано сходство всех арилсиликагелей и их отличие от октилсиликагеля. Незначительные различия между арилсиликагелями связаны с различиями в фазовых отношениях соответствующих колонок.

Наблюдаемые различия в селективности могут определяться не только самим сорбентом, но и типом органического модификатора подвижной фазы [397]. Так, плоские ароматические молекулы сильнее удерживались октадецилспликагелем, по сравнению с октилсиликагелем, лишь в том случае, когда подвижная фаза содержала метанол. Если же в качестве органического растворителя использовали ацетонитрил, селективность этих неподвижных фаз была близкой.

Для оценки селективности сорбента может быть использована система стандартных веществ, подобная системе Роршайдера. Предложенные Смитом [363] константы удерживания рассчитываются путем сравнения поведения ряда веществ — стандартов в хроматографии и при распределении в системе гексан—вода. Однако уже при простом сопоставлении индексов удерживания, приведенных в этой работе, видно, что четыре испытанные колонки обладают несколько различающейся селективностью (рис. 4.5). Силикагель, модифицированный фенильными радикалами, сильно отличается от алкилсиликагелей. Однако и последние различаются между собой по селективности. Так, крезол, ацетофенон и нитробензол удовлетворительно разделяются на сорбенте Гиперсил SAS. На Гиперсиле ODS не делятся крезол и ацетофенон, а на Магнусиле C22 — нитробензол и ацетофенон.

Меландер с соавт. [301] исследовали обширные экспериментальные данные по удерживанию на силикагелях, модифицированных углеводородными радикалами. Целью работы было пролить свет на энергетику удерживания. Поведение сорбатов на двух колонках сравнивали с помощью уравнения

$$\lg k'_A = a + b \lg k'_B, \quad (4.14)$$

где k'_A и k'_B — коэффициенты емкости на сорбентах А и В соответственно. Значения коэффициента b указывают на степень термодинамической близости процессов в двух системах. Если $b=1$, то, согласно сольвофобной теории, процессы идентичны. Значение $b \neq 1$ указывает на сходство физико-химических процессов. Наконец, отсутствие корреляции между $\lg k'_A$ и $\lg k'_B$

означает, что помимо сольвофобных взаимодействий имеют место взаимодействия с остаточными силанольными группами. Как правило, корреляция между $I_{gk'_A}$ и $I_{gk'_B}$ хорошая; следовательно, основной вклад в различия удерживания вносят различия в фазовом отношении. Отсутствие корреляции характерно для подвижных фаз, содержащих мало воды, и особенно в случае сорбатов основной природы. Видимо, в этих случаях сольвофобный механизм уже не является доминирующим, и в результате вероятность существенных различий между сорбентами резко возрастает.

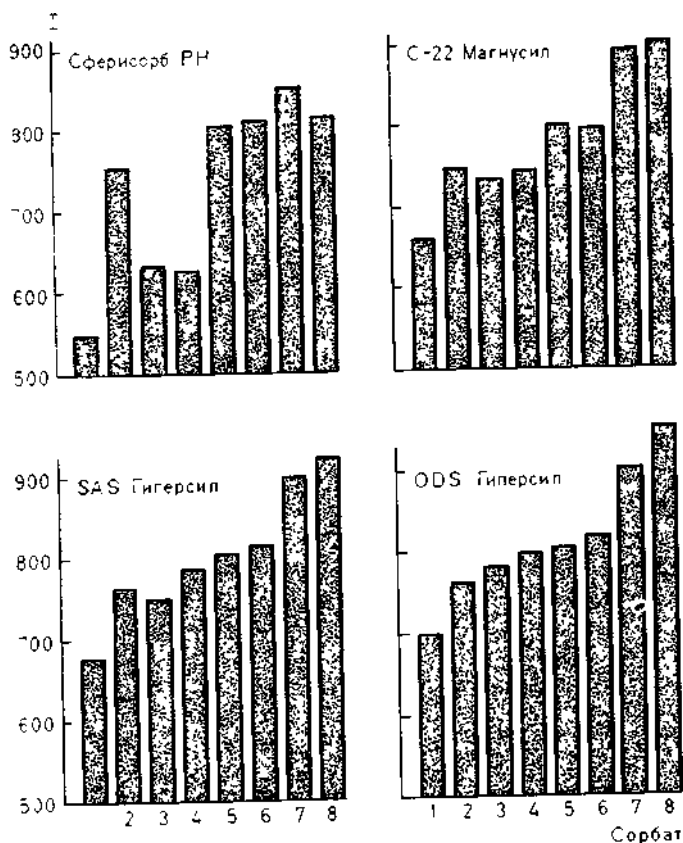


Рис 4.5 Индексы удерживания стандартных соединений на четырех сорбентах 1 — бензиловый спирт, 2 — бензальдегид; 3 — фенолэтанол; 4 — п-крезол; 5 — ацетофенон; 6 — нитробензол, 7 — метилбензоат; 8 — фенолэтиловый эфир.

Данный подход был использован в работе [246] для оценки степени близости механизмов сорбции на силикагелях, модифицированных фенильными, этильными, октальными и октадецильными радикалами. Механизмы сорбции монозамещенных производных бензола различны, и это различие возрастает по мере роста различий в строении лиганда.

Таким образом, не вызывает сомнений, что роль неподвижной фазы в обращенно-фазовой хроматографии не всегда столь пассивна, как предполагает сольвофобная теория. Тем не менее варьирование неподвижных фаз с целью оптимизации селективности разделения в обращенно-фазовом режиме применяется редко. Обычно этой цели добиваются варьированием состава подвижной фазы.

Обсуждавшиеся выше исследования выполнены в основном на рядах сорбентов, заведомо отличающихся по характеру неполярного лиганда. С точки зрения практики не менее важно рассмотреть вопрос, насколько могут отличаться по сорбционным свойствам материалы, формально идентичные по типу лигандов. Такой вопрос встает перед хроматографистом, когда необходимо воспроизвести опубликованную в литературе методику. Следует также иметь в виду, что даже разные серии материалов одной и той же марки могут быть не вполне идентичными. Оценка идентичности, детальная характеристика колонок и сорбентов являются поэтому необходимым этапом при освоении опубликованных методик или разработке новых. Без этого невозможно, в частности, внедрение стандартизованных методик в контроль производства, технический контроль продукции. Хроматографическая литература изобилует примерами, показывающими неидентичность номинально близких сорбентов (см., например, [296, 354, 416]). Однако общепринятой комплексной методики стандартизации обращенно-фазовых сорбентов по их свойствам пока нет. Во многих случаях изготовители характеризуют только кинетико-динамические свойства колонки — эффективность, проницаемость, асимметрию пиков на примерах сорбатов с почти идеальными хроматографическими свойствами. С такой точкой зрения нельзя согласиться, так как при этом без внимания остаются все вопросы, связанные с селективностью, термодинамическими свойствами сорбента. Воспроизводимость хроматографических разделений разнообразных веществ может быть предсказана на основании

оценки воспроизводимости наиболее важных свойств:

- абсолютной удерживающей способности;
- способности к разделению гомологов («метиленовая селективность»);
- селективности при разделении неполярных и полярных веществ;
- удерживания и симметрии пиков кислот и оснований;
- способности к «силанофильному удерживанию», отражающей вклад немодифицированных силанольных групп.

Таблица 4.1

Смеси для испытания обращенно-фазовых сорбентов и составы подвижных фаз

Номер смеси	Состав	Подвижная фаза
I	Нитрат натрия Бензол Толуол Фенилэтиловый спирт Фенилуксусная кислота	Ацетонитрил — 0,1 М фосфатный буфер, pH 2,5 (50:50)
II	Нитрат натрия Пиридин Фенилаланин Резорцин	Ацетонитрил — 0,1 М фосфатный буфер, pH 2,5 (10:90)
III	Нитрат натрия Нафталин Нафтол	Ацетонитрил — вода (75:25)

Охарактеризовать перечисленные показатели, разумеется, можно только хроматографическими методами, выполнив серию экспериментов с соответствующим образом подобранными смесями стандартных соединений. Для характеристики абсолютной удерживающей способности можно использовать коэффициент емкости бензола, для оценки «метиленовой селективности» — удерживание толуола по отношению к бензолу. Селективность при разделении полярных относительно гидрофобных веществ можно охарактеризовать удерживанием фенилуксусной кислоты и фенилэтанола.

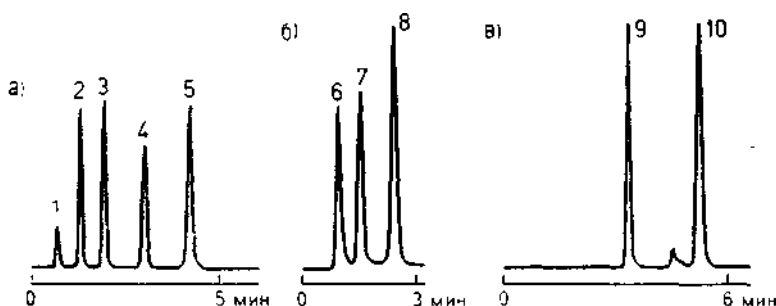


Рис. 4.6. Хроматограммы испытательных смесей: I(а), II(б), III(в). Сорбаты: 1 — нитрат натрия; 2 — фенилуксусная кислота; 3 — фенилэтиловый спирт; 4 — бензол; 5 — толуол; 6 — пиридин; 7 — фенилаланин; 8 — резорцин; 9 — нафтол; 10 — нафталин.

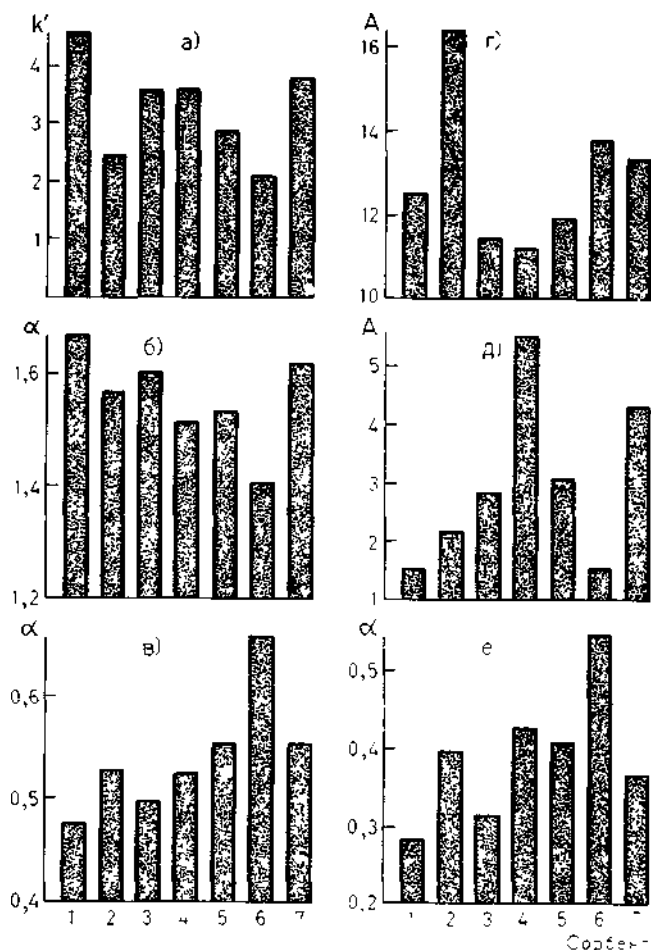


Рис. 4.7. Сравнение сорбентов: 1 — Силасорб SPH C18; 2 — Силасорб CIS, 3 — Зорбакс ODS; 4 — Зорбакс C8, 5 — Ультропак RP18; 6 — Ультропак RP8; 7 — Ультросфер ODS-PTH. Испытания а — коэффициент емкости бензола; б — селективность разделения толуола и бензола; в — селективность разделения фенолэтанола и бензола; г — асимметрия пика толуола, д — асимметрия пика пиридина; е — селективность разделения нафтола и нафталина.

Для характеристики поведения гидрофильных соединений можно использовать смесь пиридина, фенилаланина, резорцина. Силанофильное удерживание проявляется чаще всего в подвижных фазах, содержащих небольшое количество воды; следовательно, для оценки этого эффекта необходимо взять гидрофобные соединения, например нафталин и нафтол. Из перечисленных соединений можно составить три стандартные смеси и каждую из них хроматографировать в своей подвижной фазе (табл. 4.1). Конечно, выполнение этих экспериментов требует определенного времени, однако результат — ценная информация, объективно характеризующая данную партию сорбента, — оправдывает затраченные усилия. На рис. 4.6 приведены хроматограммы испытательных смесей, а на рис. 4.7 в виде диаграммы представлены результаты испытаний семи сорбентов. Среди испытанных сорбентов нет ни одной пары идентичных.

4.1.2.2 . УДЕРЖИВАНИЕ И СТРОЕНИЕ МОЛЕКУЛ СОРБАТОВ

Согласно уравнению (4.6), при постоянных условиях хроматографирования удерживание различных сорбатов определяется следующими факторами:

- дипольным моментом сорбатов;
- объемом их молекул;
- поляризуемостью;
- уменьшением площади неполярной поверхности при сорбции.

Числовые значения этих параметров, а также коэффициентов уравнения (4.6) известны далеко не в полном объеме. Поэтому прямое использование данного уравнения для расчета

удерживания пока неосуществимо, во всяком случае для сложных молекул сорбатов, представляющих наибольший практический интерес. В то же время теоретическое выявление роли упомянутых факторов послужило основой для многочисленных моделей удерживания, связывающих коэффициенты емкости с доступными структурными параметрами или физико-химическими свойствами сорбатов. Эти модели имеют большое практическое значение при интерпретации хроматограмм, выборе условий разделения. Полученные с их помощью результаты в совокупности убедительно подтверждают сольвофобную теорию обращенно-фазовой хроматографии.

Систематические исследования удерживания обычно проводятся в таких условиях, когда максимальное число параметров уравнения (4.6) сохраняет постоянные значения. Фактически при этом решается задача интерпретации и прогнозирования не абсолютных, а относительных величин удерживания в рамках определенных (иногда довольно узких в смысле разнообразия структур) классов веществ. Этот подход, являющийся, разумеется, вынужденным компромиссом, в то же время служит единственной тактикой исследований, приводящей уже в настоящее время к важным результатам. Используемый принцип моделирования в общем виде может быть выражен уравнением

$$R_i = R_0 + aS_i, \quad (4.14)$$

где R_i — параметр удерживания или какая-либо его функция, чаще всего $\lg k'$; R_0 — постоянная составляющая параметра R , общая для рассматриваемого множества соединений; S_i — параметр, описывающий существенные для хроматографического поведения особенности структуры сорбата i ; a — коэффициент.

В зависимости от вида параметра S_i модели удерживания могут быть отнесены к одной из трех групп.

В *простых аддитивных моделях* S_i есть сумма инкрементов удерживания, выраженная непосредственно в единицах R_i :

$$S_i = \sum n_j s_j, \quad (4.15)$$

где s_j — инкремент R_i , отвечающий структурному фрагменту j ; n_j — число структурных фрагментов j в молекуле сорбата i . Разумеется, в этом случае $a=1$.

В моделях типа «удерживание—свойство» S_i представляет собой какое-либо, чаще всего нехроматографическое свойство сорбата. Этот тип моделей основан на том, что особенности строения в рамках ограниченных множеств сорбатов влияют на ряд других химических параметров аналогично их влиянию на удерживание.

Наконец, в моделях типа «удерживание—строение» S_i является какой-либо формальной, математической функцией строения сорбата. В этом случае указанный параметр может не иметь непосредственного физического смысла, но должен отражать такие важные для обращенно-фазовой хроматографии свойства, как площадь гидрофобной поверхности молекулы, сорбата и (или) полярность.

4.1.2.2.1. АДДИТИВНЫЕ МОДЕЛИ УДЕРЖИВАНИЯ

Представления о $\lg k'$ как об аддитивной величине широко распространены и используются хроматографистами на практике, как только накапливается достаточное количество экспериментальных данных, пригодных для оценки s_i . Многие хроматографисты пользуются своими системами инкрементов. И даже если они не отличаются полнотой, их привлечение делает интерпретацию хроматограмм и поиск условий разделения более осознанными. В то же время в литературе имеется немало данных, позволяющих получить более или менее полные наборы S_i .

Из величин удерживания монозамещенных производных бензола, опубликованных в [52, 169, 336, 396], мы вычислили десять наборов инкрементов s_i . Условия экспериментов [52, 169, 336, 396] приведены в табл. 4.2, а полученные нами значения s_i — в табл. 4.3. Разумеется, указанные величины можно считать грубо ориентировочными хотя бы потому, что они могут зависеть не только от типа неподвижной фазы и органического растворителя, но и от концентрации последнего. Для практического использования этих инкрементов необходимо иметь представление о масштабах межлабораторной воспроизводимости подобных величин. Для этого можно сопоставить найденные инкременты между собой с помощью линейных уравнений

$$s_{ij} = a + bs_{i,k}, \quad (4.16)$$

где индексы j и k отвечают определенному набору условий хроматографического эксперимента; a и b — коэффициенты. Естественно, в идеальном случае, при полной идентичности систем, $a = 0$, $b = 1$. Параметры уравнения (4.16) приведены в табл. 4.4. Значение a действительно довольно близко к нулю, в то время как b может отличаться от единицы довольно сильно. Коэффициенты корреляции обычно превышают 0,98, среднеквадратичное отклонение данных от прямой (4.16) — между 0,03 и 0,13. Отсюда следует, что при использовании табличных значений можно столкнуться с ошибками двух видов. В одних случаях погрешность будет определяться разницей в удерживающей способности систем (отличие b от 1), в других — спецификой поведения структурных фрагментов (величина a).

Таблица 4.2

Характеристика условий исследования удерживания монозамещенных производных бензола

Условный номер набора данных	Сорбент	Подвижная фаза	Литература
1	Хромегабонд	Метанол — вода (6:4)	[336]
2	Лихросорб С8	Метанол — вода (1:1)	[52]
3	То же	Ацетонитрил — вода (4:6)	[52]
4	"	Тетрагидрофуран — вода (37:63)	[52]
5	Октилсиликагель, модифицированный дополнительно триметилхлорсиланом (3,4 мкмоль/м ²)	Метанол — вода (1:1)	[396]
6	Октилсиликагель (3,3 мкмоль/м ²)	То же	[396]
7	Октилсиликагель (2,4 мкмоль/м ²)	"	[396]
8	Октилсиликагель, модифицированный дополнительно триметилхлорсиланом (3,4 мкмоль/м ²)	Ацетонитрил — вода (3:7)	[396]
9	То же	Тетрагидрофуран — вода (25:75)	[396]
10	Октилсиликагель*	Метанол — вода*	[169]

* Данные по удерживанию экстраполированы к соотношению метанол—вода 35:65.

Согласно данным табл. 4.3, среднеквадратичное расхождение между величинами s_i , измеренными разными авторами и в различных условиях, имеет порядок 0,1, на основании чего можно сделать общий вывод о пределах надежности априорной оценки удерживания с помощью уравнения (4.15). Если игнорировать фактические различия между применяемой обращенно-фазовой системой и той, для которой найдены значения s_i , ошибка в расчете $\lg k'$ может составить 0,1 п, где п — число структурных фрагментов. Этот довольно пессимистический вывод не означает, что зависимость (4.15) бесполезна для практики, в частности, потому, что игнорировать различия в свойствах систем вовсе не обязательно, их можно учитывать, например, с помощью уравнений типа (4.16). Кроме того, каждый экспериментатор для своей системы может получить свой, уточненный набор инкрементов. Примером такого подхода является расчет k' бифункциональных производных бензола по набору инкрементов, рассчитанному для монофункциональных производных из работы [336]. Полученные данные мы сравнили с экспериментально найденными значениями k' из той же работы (рис. 4.8). Последние вполне удовлетворительно согласуются с расчетом.

Таблица 4.4

Корреляция между величинами s_i , найденными из различных наборов экспериментальных данных

j	k	а	ь	г	а
Набор 1	Набор 2	0,05	0,99	0,986	0,065
1	5	0,03	0,94	0,993	0,039
1	10	0,13	0,83	0,936	0,134
2	0	0,01	1,17	0,982	0,072
2	10	0,06	0,80	0,982	0,048
5	10	0,07	0,67	0,985	0,053
3	8	0,07	1,40	0,993	0,052
4	9	0,12	1,60	0,998	0,025

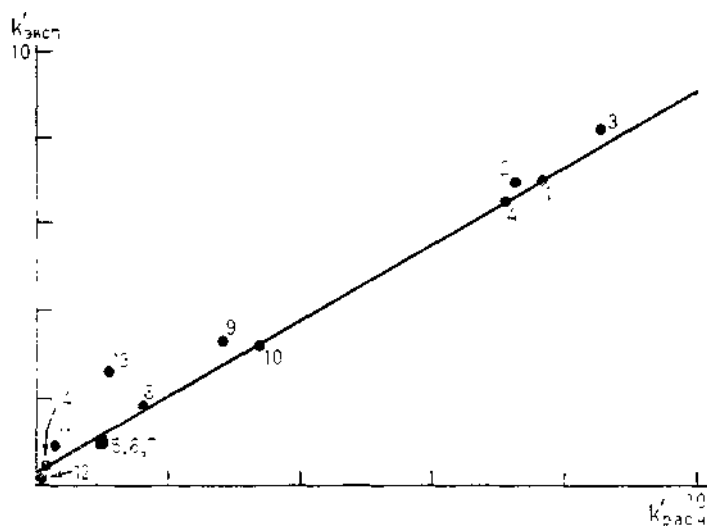


Рис. 4.8. Сопоставление удерживания бифункциональных производных бензола, рассчитанного из инкрементов набора 1, с экспериментальными данными из [336]: 1— о-ксилол, 2 — п-хлортолуол; 3 — п-бромтолуол; 4 — п-дихлорбензол; 5 — п-крезол; 6 — о-крезол; 7 — м-крезол; 8 — п-этилфенол; 9 — п-нитротолуол; 10 — о-нитротолуол; 11 — м-нитротолуол; 12 — п-нитробензилбромид; 13 — п-аминофенол; 14 — п-гидроксибензальдегид

Кроме того, даже ориентировочный расчет с погрешностью $\lg k'$ около 0,1 на каждый инкремент позволяет чисто расчетным путем ответить на следующие вопросы:

— далеко ли будут расположены на хроматограмме пики соединений с заданной структурой;— каков ожидаемый порядок их элюирования;

— какова должна быть концентрация органического компонента подвижной фазы, чтобы обеспечить приемлемое удерживание данного вещества.

Приведенный выше пример относился к соединениям, довольно сильно различающимся по полярности, а использованный простейший метод расчета величин удерживания игнорировал изомерию дизамещенных бензолов. В подобных случаях уже небольшого числа инкрементов достаточно для расчета величин удерживания разнообразнейших соединений. Естественно, столь универсальная модель не может быть одновременно и самой точной. Системы инкрементов, аналогичные приведенной, могут быть разработаны и для более узких классов веществ. Разумеется, и надежность априорных расчетов в этих случаях выше. Так, например, в работе [355] изучено поведение желчных кислот, выявлены вклады в удерживание, отражающие не только наличие тех или иных структурных фрагментов, но и их пространственное расположение и степень ненасыщенности.

В работе [90] методом ВЭЖХ изучено поведение ряда биологически важных производных фенилэтиламина и аминокислот и найдены инкременты удерживания, отвечающие окси-, метокси- и металльной группам в различных положениях. Показано, что данные, полученные на одном сорбенте, могут быть перенесены на другой, если состав подвижной фазы в обоих случаях одинаков.

В работе [47] детально изучено поведение большого числа замещенных пуринов. Найдены величины s_i для ряда характерных заместителей в различных положениях. Прогнозирующая способность полученной модели проверена на 62 соединениях, не входивших в первоначальный массив для определения s_i . Достигнутый в этой работе результат следует отнести к числу лучших опубликованных прогнозов удерживания: среднее отклонение расчетных значений $\lg k'$ от экспериментальных составило около 0,1.

Разработана [84] аддитивная схема для представления структуры полиядерных ароматических соединений и их алкильных производных. Схема применена для расчета удерживания в режиме обращенно-фазовой хроматографии на октадецилсиликагелях, а также для хроматографии на обычном силикагеле и силикагеле, модифицированном пирролидинопропильными группами. Расчетные величины k' отличались от экспериментальных в среднем на 20%.

Таким образом, аддитивные схемы расчета в принципе позволяют добиться практически приемлемой надежности прогнозирования удерживания. В каждом конкретном случае, однако, хроматографист сам должен решить, с какой целью предполагается проводить расчеты, не требует ли эта цель недостижимой точности прогноза, оправдаются ли затраты труда (иногда немалые) на получение нужного набора инкрементов.

4.1.2.2.2. МОДЕЛИ «УДЕРЖИВАНИЕ-СВОЙСТВО»

Из моделей этого типа наиболее популярны уравнения, связывающие коэффициенты емкости, измеряемые в хроматографической системе, с коэффициентами распределения (чаще всего в системе октанол—вода). Применение системы октанол—вода вызвано тем, что она широко используется для оценки биологической активности и для нее существует детально разработанная методика аддитивного расчета коэффициентов распределения исходя из строения веществ [327]. Работы этого направления преследуют обычно одну из двух противоположных целей:

1) на основании логарифмов коэффициентов распределения, найденных опытным или расчетным путем, рассчитать величины удерживания;

2) из величин удерживания, измеренных хроматографически, рассчитать коэффициенты распределения.

При решении первой задачи особенно привлекательна возможность использования аддитивного расчета логарифмов коэффициентов распределения, который в настоящее время разработан лучше, чем непосредственные аддитивные расчеты коэффициентов емкости. С другой стороны, применение хроматографии открывает новые возможности для измерения коэффициентов распределения, в особенности гидрофобных соединений либо веществ, недоступных в чистом виде. Решение обеих задач базируется на линейной зависимости между логарифмами коэффициентов распределения и коэффициентов емкости:

$$\lg k' = a + b \lg P_{i,j}, \quad (4.17)$$

где $P_{i,j}$ — коэффициент распределения вещества между фазами i и j .

Приведем некоторые примеры исследований такого рода. Купманс и Реккер [264] на примере алкилбензолов и полиядерных ароматических соединений рассмотрели связь между величинами удерживания и коэффициентами распределения. Последние они определяли: 1) экспериментально; 2) по аддитивной схеме Реккера [327]; 3) по способу Лео—Ганча [176]. Наилучшие результаты обеспечил расчетный метод Реккера, по то время как способы Лео—Ганча и экспериментальный привели к значениям $\lg P$, хуже коррелированным с хроматографическими параметрами.

Корреляция между $\lg k'$ и $\lg P$ продемонстрирована также для йодаминокислот [193], изомерных спиртов и простых эфиров [137], производных пиридазинона [80], барбитуратов [434]. В работах [172, 174] расчетные значения $\lg P$ использованы для прогнозирования удерживания ароматических и желчных кислот. Отклонения расчетных значений k' от экспериментально измеренных составили в среднем около 10%.

Интерпретация удерживания дизамещенных хальконов как функции парциальных констант гидрофобности по Ганчу и Реккеру представлена в работе [427]. Коэффициенты корреляции для предложенных моделей составили 0,94—0,98.

Естественно, уравнение (4.17) является весьма приближенным уже хотя бы потому, что в нем не учитываются различная селективность хроматографических систем и отличия селективности этих систем от классических систем распределения жидкость—жидкость. Отклонения от (4.17) нередки, в особенности если рассматривать группы соединений, сильно отличающихся не только гидрофобными фрагментами, но и характером функциональных групп. Поэтому продолжают поиски моделей, связывающих $\lg P$ и $\lg k'$ более корректно. Так, в работе [169] показано, что корреляция существенно улучшается, если вместо $\lg k'$, применяемого в смесях метанол—вода, использовать параметр $\lg k'_w$ — величину, экстраполированную к нулевой концентрации органического компонента подвижной фазы. Высказывается также сомнение в применимости метода Реккера для характеристики полизамещенных ароматических соединений.

В работах [411, 412] для оценки $\lg P$ предложено использовать не только $\lg k'_w$, но и параметр, характеризующий чувствительность величин удерживания к изменению концентрации органического растворителя в подвижной фазе.

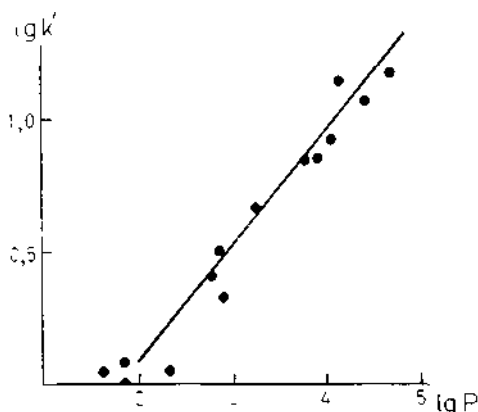


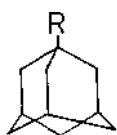
Рис. 4.9 Зависимость удерживания монофункциональных производных адамантана от строения, опосредованного через расчетный параметр $\lg P$. Сорбент — Силасорб С18, подвижная фаза — ацетонитрил— вода (7:3).

Дополнительные трудности возникают при использовании уравнения (4.17) для оценки гидрофобности ионогенных соединений. В этом случае кроме экстраполяции к $\lg k'_w$ необходимо ввести поправку и получить значение $\lg k''_w$ — гипотетический параметр неионизированной формы. В работе [124] при исследовании 25 оснований — лекарственных веществ получено следующее соотношение:

$$\lg P_{ow} = 1,142(\pm 0,212)\lg k''_w - 0,998(\pm 0,876), \quad (4.18)$$

где $\lg P_{ow}$ — логарифм коэффициента распределения в системе октанол—вода. Это уравнение описывает экспериментальные данные с коэффициентом корреляции 0,94.

На рис. 4.9 представлена корреляция между $\lg k'$ и $\lg P$, рассчитанными по [327] для 14 монозамещенных производных адамантана [33] общей формулы



$R = -H, -Cl, -Br, -CH_2Cl, -CH_2Br, -OH, -CH_2OH, -CN, -COCH_3, -COOCH_3, -COOC_2H_5, -NHCHO, -NHCOCH_3, -CONH_2.$

Из рисунка видно, что данная модель удовлетворительно описывает поведение соединений рассматриваемого ряда.

В работе [5] сделана попытка с помощью уравнения (4.17) описать величины удерживания пептидов — фрагментов кортикотропина, имеющих не более одной свободной концевой группы. Структура изученных соединений и их расчетные значения $\lg P$ приведены в табл. 4.5. Полученные значения коэффициентов a и b уравнения (4.17), а также параметры, характеризующие корреляцию, представлены в табл. 4.6, А. Корреляция между $\lg k'$ и $\lg P$ не может быть признана удовлетворительной. Наибольшие погрешности аппроксимации соответствуют пептидам с незащищенными концевыми группами. Это можно объяснить тем, что вклады этих полярных функциональных групп в баланс гидрофильных и гидрофобных свойств в системе, состоящей из водного раствора ацетонитрила и химически связанных групп $C_{18}H_{37}$, отличаются от аналогичного вклада для системы октанол—вода. Следовательно, возникает необходимость коррекции инкрементов $\lg P$. Для этого можно попытаться по экспериментальным данным рассчитать значения инкрементов f_i^* для характерных полярных функциональных групп пептидных соединений. Такие инкременты составляют: для $-CHCONH-$ —0,40; $-COOH_{\text{пепт}}$ — 2,33; $-MH_{2\text{пепт}}$ —2,05. Эти значения, специфические для веществ пептидной природы, позволили с помощью параметра $\lg P^*$ значительно лучше описать поведение этой группы веществ в обращенно-фазовых системах (табл. 4.6, Б). Необходимость модификации инкрементов f_i , приведенных в работе Реккера [327] применительно к условиям обращенно-фазовой хроматографии, может возникать и в других случаях, так как вклад заместителя все же зависит от типа основной структуры, куда этот заместитель вводится. Например, при исследовании тетрагидрофурилзамещенных производных 5-фторурацила — аналогов известных противоопухолевых препаратов — установлено, что их хроматографическое поведение отличается от ожидаемого исходя из инкрементов Реккера. Найденные значения модифицированных инкрементов гидрофобности приведены в табл. 4.7. Относительная гидрофобность почти всех заместителей в тетрагидрофурановом кольце значительно выше таковой для заместителей в алифатическом ряду

Таблица 4.5

Параметры гидрофобности некоторых синтетических фрагментов кортикотропина

Соединение	$\lg P$	$\lg P^*$
Z-Ser-Tyr-OMe	0.784	1,414
Z-Ser-Tyr-N ₂ H ₃	-1.860	-1,230
Z-Ser-Tyr-OEt	1.314	1,944
Z-Val-Gly-OEt	1.634	2,264
Z-Pro-Val-Gly-OEt	1.614	2,874
Z-Ser-Tyr-Ser-Met-ONb	0.880	2,770
Z-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu (OBzl) -His-Phe-ONb	1.808	5,588
Boc-Glu(OBzl)-His-Phe-ONb	4.108	5,368
Z-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBzl)-His-Phe-Arg(NO ₂)-Trp-Gly-ONb	-0.972	4,698
Boc-Arg(NO ₂)-Trp-Glv-ONb	0,400	1.660
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-ONb	0.131	0,761
Boc-Ser-Met-ONb	1.642	2,271
Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-OBzl	5.414	6,044

2HCl-H-Glu (OBzl) -His-Phe-ONb	2,680	3,94
2HCl-H-His-Phe-ONb	1.702	2,332
H-Lys(Z)-Lys(Z)-OBzl	3.986	4,616
Z-Ser-Tyr-Ser-Met-OH	-2,499	-0.719
Boc-Lys(Z)-Pro-Val-Gly-OH	0.259	2,149
Boc-Lys (Z) -Pro-Val-Gly-Lys (Z) -Lvs (Z) -OH	2.415	5,565
Z-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu (OBzl) -His-Phe-OH	-1.571	2,209
Z-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBzl)-His-Phe-Arg(NO2)- Trp-Gly-OH	-4.351	1,319

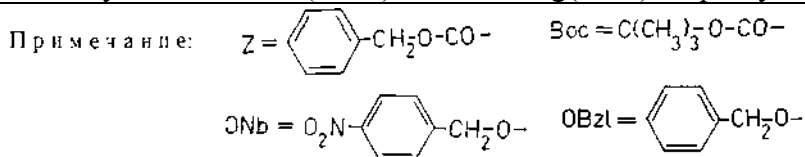


Таблица 4.6

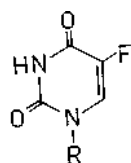
Параметры уравнений (4.17) для пептидов

Концентрация ацетонитрила, об. %	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i>	<i>n</i>	σ
А					
55	-0,273	0,107	0,627	20	0,307
50	-0,047	0,124	0,622	21	0,357
45	0,132	0,137	0,585	21	0,433
40	0,620	0,121	0,599	15	0,429
35	0,616	0,06	0,280	16	0,43
Б					
50	-0,595	0,230	0,962	12	0,131
45	-0,534	0,277	0,970	12	0,141
35	0,091	0,219	0,843	8	0,170

Примечание: А — в качестве $\lg P_{i,j}$, взят расчетный параметр для системы октанол—вода по Реккеру; Б — в качестве $\lg P_{i,j}$ взят параметр, рассчитанный по модифицированным инкрементам.

Таблица 4.7

Влияние заместителей в тетрагидрофурановом кольце на гидрофобность производных 5-фторурацила



R	Фрагмент i	f_i заместителей	
		по [327]	в хроматографическом эксперименте
1	2	3	4
	— Cl	-0,12	0,87
	— Cl; — CH ₃	0,41	1,55

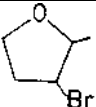
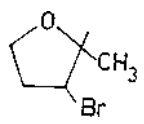
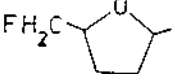
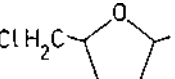
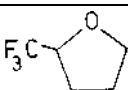
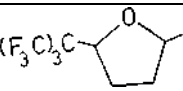
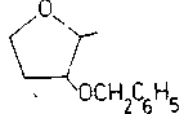
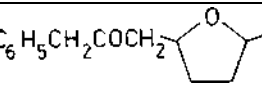
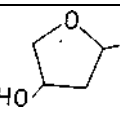
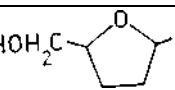
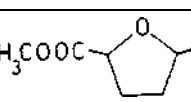
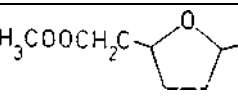

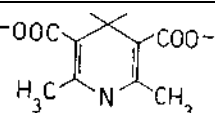
	— Br	0,10	0,80
	— Br; — CH ₃	0,62	1,71
	-CH ₂ F	0,11	0,46
	-CH ₂ Cl	0,59	1,0
	-CF ₃	0,58	1,11
	-C(CF ₃) ₃	2,25	2,27
	— OCH ₂ C ₆ H ₅	0,66	1,78
	— CH ₂ OCH ₂ C ₆ H ₅	1,37	2,16
	-OH	-1,67	-0,30
	-CH ₂ OH	-1,14	-0,07
	— COOCH ₃	-0,78	-0,57
	— CH ₂ COOH ₃	-0,24	0,69

Таблица 4.8

Инкременты величин гидрофобности для производных 1,4-дигидропиридина [34]

Структурный фрагмент	f_i по [327]	f_i^* в эксперименте
— CH ₃	0,70	0,99
-C ₆ H ₅	1,69	0,87
	—	0,19
— NO ₂ (в положении 5-фуранового кольца)	-0,08	0,36
	—	1,04

Аналогичным образом найдены структурные инкременты гидрофобности в ряду производных 1,4-дигидропиридинов (табл. 4.8). Использование инкрементов, приведенных в

табл. 4.8, для расчетов $\lg P$ существенно улучшает корреляцию удерживание— структура сорбата [34].

Экспериментальное определение $\lg P$ чревато ошибками, связанными с недостижением равновесия, а также наличием примесей в исследуемом образце. Хроматографический метод определения $\lg P$ свободен от этих потенциальных источников погрешности.

Для применения хроматографии с целью определения $\lg P$ в системе октанол—вода необходимо:

— на основании величин $\lg k'$ и достоверных значений $\lg P$ для веществ-стандартов найти коэффициенты уравнения (4.17);

— измерить для изучаемых веществ $\lg k'$ в идентичных условиях и рассчитать искомый параметр по уравнению

$$\lg P = \frac{\lg k' - a}{b} \quad (4.19)$$

В качестве системы ij в уравнении (4.17) может выступать не только система двух несмешивающихся жидкостей, но и другая хроматографическая система. В этом случае можно связать непосредственно коэффициенты емкости в системах 1 и 2:

$$\lg k'_1 = a + b \lg k'_2. \quad (4.20)$$

В работе [398] показано существование такой зависимости между удерживанием на разных сорбентах при неизменном составе подвижной фазы либо на одном и том же сорбенте при разных составах подвижных фаз.

Некоторые другие физико-химические свойства сорбатов, связанные с их гидрофобностью или определяющие ее, также могут использоваться для интерпретации хроматографических данных. Так, в работе [95] установлено существование корреляции между растворимостью алифатических спиртов в воде и их величинами $\lg k'$.

В работе [244] предложено уравнение

$$\lg k' = a\pi + b(\text{HA}-\text{HD}) + c, \quad (4.21)$$

где π — константа гидрофобности заместителя; HA — число электроноакцепторных групп в молекуле сорбата; HD — число электронодонорных групп. Константы a , b , c определенным образом зависят от состава подвижной фазы. Среднеквадратичное отклонение расчетных значений $\lg k'$ от экспериментальных для двузамещенных производных бензола составляет 0,1.

В работе [245] выявлена корреляция между величинами молекулярной поляризуемости a_s и коэффициентами емкости полядерных ароматических углеводов:

$$\lg k' = l a_s + m, \quad (4.22)$$

где l , m — константы. Сделана также попытка обнаружить связь между удерживанием и ионизационными потенциалами. Отсутствие такой связи привело авторов к выводу, что в данном случае взаимодействие сорбат—сорбент определяется преимущественно индукционными, а не дисперсионными взаимодействиями. Однако в этом исследовании игнорировалась роль взаимодействий в подвижной фазе, что применительно к обращенно-фазовому режиму вряд ли допустимо.

4.1.2.2.3. МОДЕЛИ «УДЕРЖИВАНИЕ—СТРУКТУРА»

Модели этой группы устанавливают связь между удерживанием и строением сорбатов, выраженным с помощью тех или иных структурных дескрипторов. Во многих случаях логарифм коэффициента емкости линейно связан с числом повторяющихся структурных фрагментов:

$$\lg k' = a + bn. \quad (4.23)$$

Таблица 4.9

Параметры уравнений (4.24) для некоторых гомологических рядов.

Условия хроматографирования: колонка Зорбакс ODS, подвижная фаза — ацетонитрил—вода (6:4) [35]

Класс соединений	a	b	r	n	σ
Алканы	-0,352	0,197	0,9999	5	0,004
Алкилбензолы	-0,594	0,144	0,9873	11	0,033

3) каждому атому присваивается число χ_b , соответствующее числу связей этого атома с другими атомами (кроме атомов водорода);

4) для каждой связи скелета рассчитывается ее связуемость

$$\chi_b = \frac{1}{\sqrt{\delta_i \delta_j}} \quad (4.26)$$

Таблица 4.10

Связь между индексами связуемости и параметрами $\lg P$ для системы, октанол—вода

Класс соединений	a	b	r	σ
Карбоновые кислоты	-1,41±0,11	0,927 + 0,03	0,996	0.122
Сложные эфиры	-1,71 ±0,04	0,996 ±0,03	0,999	0,060
Простые эфиры	-1,30±0,19	0,964 ±0,07	0,976	0.080
Спирты	-1,53±0,09	0,966±0,03	0,997	0,151
Амины	-1,51±0,12	0,977 + 0,04	0,979	0,179
Кетоны	-1,16±0,09	0,982 + 0,03	0.993	0,094
Углеводороды	0,406±0,09	0,884 + 0,03	0,975	0,160
Все соединения, кроме углеводородов	-1,48 ±0,04	0,950+0,01	0,986	0,152

5) рассчитывается индекс связуемости всей молекулы

$$\chi = \sum_n \chi_b \quad (4.27)$$

где n — суммарное число связей между атомами скелета.

При расчете индексов связуемости циклических соединений вводится поправка —0,5 единицы на каждое замыкание цикла. Наличие в молекуле двойных или тройных связей увеличивает связуемость соответствующих атомов на 1 или 2 соответственно. Так, связуемость атома углерода фрагмента $=\text{CH}_2$ равна двум, кислорода карбонильной группы — двум, ацетиленового углерода $\text{HC}\equiv$ — трем.

В табл. 4.10 приведены параметры уравнений, связывающих индекс связуемости с величиной $\lg P$ для системы октанол— вода [308]:

$$\lg P = a + b\chi \quad (4.28)$$

Почти во всех случаях корреляция хорошая. Более того, одним уравнением могут быть объединены не только соединения одного класса, но и вообще все рассматриваемые в данной работе полярные соединения, так как погрешность аппроксимации при их объединении в одну группу возрастает незначительно. Параметр b во всех случаях близок к единице. Это согласуется с тем, что вклады одного метиленового звена в системах $\lg P$ и χ близки между собой (0,53 и 0,50 соответственно). Средняя величина свободного члена a для полярных веществ примерно на 2 меньше, чем для углеводородов. Отсюда следует, что уменьшение углеводородного скелета на четыре метиленовых звена приблизительно так же влияет на гидрофобность, как введение одной полярной функциональной группы. Этот вывод также согласуется со средними значениями инкрементов параметра $\lg P$ и, как показано далее (см. главу 7), может быть положен в основу простейшей системы оценки гидрофобности и удерживания в условиях обращенно-фазовой хроматографии.

Из уравнений (4.28) и (4.17) вытекает, что между удерживанием и индексами связуемости можно ожидать существования линейной зависимости (4.25). Эта зависимость продемонстрирована для различных условий обращенно-фазовой хроматографии и различных классов соединений: N-алкилбензамидов [436], барбитуратов [74, 434], спиртов [95, 255], третичных алкилбензамидов [433], дансиламидов [277], алкилбензолов [244, 361], полиядерных ароматических углеводородов [212, 243].

Согласно основным выводам [308] относительно связи индекса связуемости с коэффициентами распределения, эта система может быть использована не только для оценки влияния углеводородного скелета, но и описания вклада полярных функциональных групп. При этом, если речь идет о полифункциональных сорбатах, должен быть также рассмотрен вопрос о взаимном влиянии полярных фрагментов молекул. В работе [36] показано, что величины $\lg k'_1$, экстраполированные к содержанию ацетонитрила в подвижной фазе ($\lg k'_1$) 1 моль/л (см. 4.1.2.4 и [35]), коррелированы с индексами связуемости соединений одного класса (табл. 4.11)

$$\lg k'_1 = a + b\chi \quad (4-29)$$

Поскольку параметр χ отражает главным образом размер молекул сорбатов, его увеличение ведет к увеличению удерживания. В то же время вклад полярных групп в гидрофильность молекул сорбатов также может быть выражен в единицах индекса связуемости. Для этой цели предложен топологический индекс гидрофобности χ_H [36]:

$$\chi_H = \chi + \sum_i (\delta\chi_i) \quad (4-30)$$

Таблица 4.11

Параметры уравнения (4.29)

Класс соединений	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i>	<i>n</i>	σ
Алканы	1,461	1,668	0,9976	5	0,08
Алкилбензолы	1,129	1,122	0,9802	11	0,13
Сложные эфиры	-2,088	1,441	0,9981	5	0,05
Кетоны	-1,588	1,367	0,9998	5	0,02
Спирты	-1,763	1,176	0,9965	8	0,10

где $\delta\chi_i$ — поправки к индексу связуемости, соответствующие структурным фрагментам, повышающим гидрофильность соединений. Значения $\delta\chi_i$ для некоторых структурных фрагментов следующие:

—C ₆ H ₅	-1,6
= C = O	-3,1
—COO—	-3,3
—OH	-3,5

Эти инкременты, а также уравнения (4.29) и (4.30) позволяют прогнозировать коэффициенты емкости хроматографически не изученных монофункциональных соединений с относительной погрешностью не более 25% [36]. В то же время расчет по (4.30) величин полифункциональных соединений приводил впоследствии к заниженной в десятки и сотни раз величине k' . Установлено, что взаимное влияние полярных функциональных групп в молекуле проявляется даже при их значительной удаленности.

Отклонение χ_H от аддитивности $\Delta\chi_H$ прямо пропорционально числу функциональных групп n_f и среднему расстоянию между ними r_{cp} .

$$\Delta\chi_H = a_0 + a_1 n_f + a_2 r_{cp} \quad (4.31)$$

Данное уточнение позволило существенно повысить надежность прогнозирования коэффициентов емкости полифункциональных полупродуктов синтеза простагландинов [23].

Связь между площадью поверхности молекул сорбатов и их удерживанием продемонстрирована в [95] на примере спиртов, в [435] — на примере N-алкилбензамидов. В работах [95, 173, 361] обсуждается связь lgk' с объемом молекул.

Шаброн с соавт. [337] предложили корреляционный фактор F для описания поведения ароматических и гидроароматических соединений, содержащих также алкильные заместители. Численное значение фактора F равно числу двойных связей в молекуле плюс число первичных и вторичных атомов углерода минус 0.5 на каждое неароматическое кольцо. Результаты работы [212] показывают, что для данного класса веществ параметр F дает вполне приемлемую точность прогноза k' .

В некоторых работах для описания связи между строением и удерживанием используются функции нескольких переменных. Так, в [191] для описания поведения полиядерных ароматических углеводородов предложено уравнение

$$lgI = a_0 + a_1 n_a + a_2 \chi + a_3 V + a_4 M_1 + a_5 M_2, \quad (4.32)$$

где n_a — число ароматических колец; χ — индекс связуемости кластера; V — мольный объем сорбата; M_1 — наименьший главный момент инерции; M_2 — отношение главных моментов инерции.

Уравнение (4.32) использовано для прогнозирования величины lgI . Отклонение предсказанных значений от экспериментально измеренных в среднем составило около 0,2.

В работе [448] для аналогичных целей использовано уравнение

$$lgI = a_0 + a_1 \chi + a_2 L, \quad (4.33)$$

где L — фактор, характеризующий отношение максимальной длины молекулы к ширине.

Факторы F и L использованы совместно в модели удерживания полиядерных ароматических углеводородов [248].

Линейная функция ван-дер-ваальсовых объемов, энергий ассоциации за счет образования π -комплексов и водородных связей предложена для описания удерживания ароматических кислот [171]. Показано, что параметры распределения электронной плотности монозамещенных ароматических соединений также линейно связаны с коэффициентами емкости [253].

4.1.2.3. УДЕРЖИВАНИЕ И ТЕМПЕРАТУРА КОЛОНКИ

Как любое другое химическое равновесие, равновесие сорбции в хроматографической системе определяется известным соотношением химической термодинамики

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ, \quad (4.34)$$

где ΔG° , ΔH° , ΔS° — стандартное изменение парциальной мольной величины свободной энергии, энтальпии и энтропии соответственно.

Объединив уравнения (4.34) и (1.2), получим зависимость коэффициента емкости от температуры:

$$\ln k' = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \varphi \quad (4.35)$$

Влияние температуры на величины удерживания представляет интерес с нескольких точек зрения. Во-первых, уравнение (4.35) является ключевым соотношением, позволяет от величин удерживания перейти к термодинамическим параметрам и выяснить некоторые аспекты механизма сорбции. Во-вторых, применение жидкостной хроматографии для аналитических це-

лей требует достижения максимально возможной воспроизводимости величин удерживания, и поэтому важно знать, в какой мере изменения температуры колонки способны повлиять на результаты процесса. Эта же информация необходима и в связи с тем, что работа при повышенной температуре колонок — удобное средство уменьшения вязкости подвижной фазы, снижения давления в колонке и повышения эффективности разделения. В-третьих, необходимо ответить на вопрос, может ли изменение температуры колонки служить средством изменения селективности разделения.

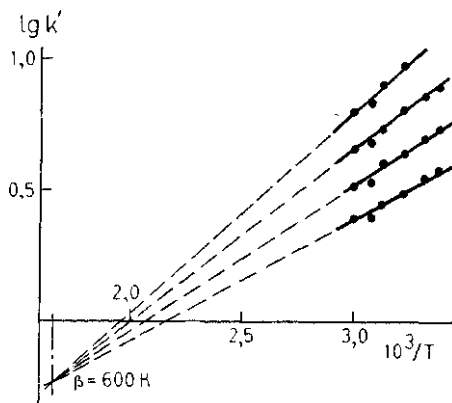


Рис. 4.10. Характерная зависимость удерживания ряда соединений, сорбируемых по одинаковому механизму, от температуры колонки. Данные из [292].

Рассмотрим некоторые аспекты термодинамики сорбции в обращенно-фазовой хроматографии. В работе [292] установлено, что для этого режима характерно проявление компенсационного эффекта, который выражается линейной зависимостью между параметрами ΔH° и ΔS° и свидетельствует о сходстве физико-химических процессов в рассматриваемом ряду соединений. Компенсационный эффект выражается уравнением

$$\Delta H^\circ = \beta \Delta S^\circ + \Delta G_\beta^\circ, \quad (4.36)$$

где ΔG_β° — изменение свободной энергии взаимодействия при температуре p . В случае, когда такое компенсационное поведение наблюдается, значения β и ΔG_β° являются константами, β называется температурой компенсации. Семейства графиков Аррениуса для рассматриваемого класса веществ пересекаются при экстраполяции в точке с координатами $1/\beta$ и $\Delta G_\beta^\circ/RT$ (рис. 4.10).

Уравнение (4.36) может быть преобразовано для такого типа процессов в

$$\Delta G_T^\circ = \Delta H^\circ \left(1 - \frac{T}{\beta}\right) + \frac{T \Delta G_\beta^\circ}{\beta} \quad (4.37)$$

где ΔG_T° — изменение свободной энергии сорбции при температуре хроматографического разделения. Согласно этому уравнению, в случае компенсационного поведения графики $\Delta G_T^\circ = f(\Delta H^\circ)$ либо $\lg k' = f(\Delta H^\circ)$ представляют собой прямые линии, из углового коэффициента которых может быть рассчитана температура компенсации.

Согласно работе [292], в координатах $\lg k' - \Delta H^\circ$ прямая линия наблюдается для соединений, значительно различающихся по структуре: например, ароматических кислот, замещенных гидантоинов, производных бензола и фенилуксусной кислоты. Значения β , найденные в этой работе для веществ различных классов, различаются не слишком сильно, что свидетельствует об идентичности механизмов сорбции. Из данных по удерживанию, приведенных в работах [173, 310], мы нашли значения еще для нескольких классов соединений (табл. 4.12). Погрешность определения величины β , насколько можно судить по данным [292], около ± 100 К; значит, механизмы сорбции всех рассмотренных классов веществ в основном одинаковы.

Компенсационные закономерности вообще довольно характерны для обращенно-фазовой хроматографии, из чего следует вывод, что с повышением температуры колонки все параметры удерживания должны не только уменьшаться по абсолютной величине (так как $\Delta H^\circ < 0$), но и сближаться между собой. Во всяком случае, это должно быть справедливо для веществ близкого строения. Экспериментальное подтверждение сказанного приводится на рис. 4.11, где данные из

[173] переработаны нами в виде зависимости относительных удерживаемых объемов от температуры колонки. Общая тенденция заключается в повышении селективности разделения при снижении температуры колонки. Для некоторых пар соединений этот эффект достаточно выражен (нафталин—бензол, додециловый спирт—пентан), для других минимален (бутилбензол—пентан, йодбензол—бромбензол). Следовательно, возможность изменения селективности необходимо иметь в виду, варьируя температуру колонки. В то же время ясно, что изменение температуры вряд ли способно привести к радикальным изменениям селективности, например обращению порядка элюирования. Этой цели несомненно проще можно добиться, заменив один органический модификатор подвижной фазы другим.

Таблица 4.12

Температуры компенсации

Класс соединений	Неподвижная фаза	Подвижная фаза	β К	Литературный источник, из которого взяты β или данные для расчета β (*)
Ароматические кислоты	Сферисорб ODS	Фосфатный буфер (pH 2,0), 6% ацетонитрила	647	[292]
Замещенные гидантоины, аллантоин и фенилуксусная кислота	Партисил ODS-2	Фосфатный буфер (pH 7,0), 30% ацетонитрила	596	[292]
Замещенные производные бензола	Лермафаза ODS	Метанол — вода (4:6)	639	[292]
Диэтаноламиды карбоновых кислот	Хитачи Гель 3011	Метанол — вода (97:3)	615	[310]*
Полиядерные ароматические углеводороды	Гиперсил ODS	Ацетонитрил — вода (80:20)	582	[173]*
Спирты	То же	То же	761	[173]*
Алканы	То же	То же	744	[173]*

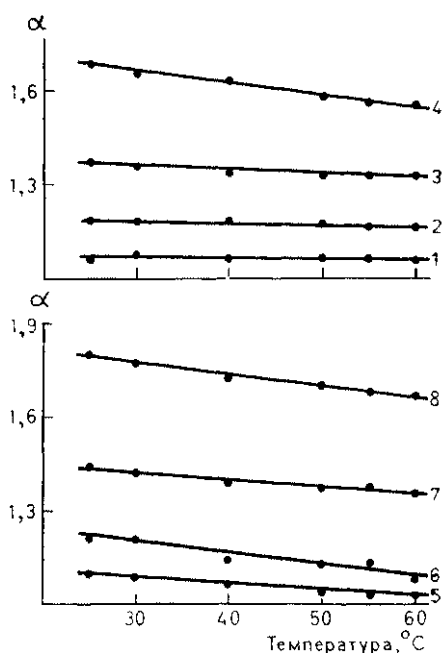


Рис. 4.11. Зависимость относительных удерживаемых объемов от температуры колонки. Пары веществ: 1 — бутилбензол—пентан; 2 — йодбензол—бромбензол; 3 — толуол—бензол; 4 — нафталин—бензол; 5 — деканол—флуорен; 6 — додеканол—гексан; 7 — гексан—пентан; 8 — 1,2-дихлор-бензол—бензол.

В то же время, если коэффициенты емкости используются для целей качественного анализа либо изучения физико-химических закономерностей, с их зависимостью от температуры нельзя не считаться. Общее представление о величине этого эффекта можно получить с помощью параметра

$$V = \frac{(k'_1/k'_2) - 1}{T_2 - T_1}, \quad (4.38)$$

где k'_2 и k'_1 — коэффициенты емкости при температурах T_2 и T_1 ($T_2 > T_1$). Данный параметр характеризует изменение коэффициента емкости при изменении температуры колонки на 1° . Как явствует из табл. 4.13, изменение температуры на 1° влечет за собой изменение удерживания в среднем на 2%. Следовательно, без термостатирования колонки трудно добиться долговременной воспроизводимости величин удерживания, и использование термостатов для колонок в составе жидкостных хроматографов — не роскошь, а настоятельная необходимость.

Таблица 4.13

Величины V

Сорбат	Неподвижная фаза	Подвижная фаза	V	Литературный источник, откуда позаимствованы k'_1, k'_2
Инозин	Зорбакс ODS	Метанол : 0,02 М фосфатный буфер, pH 5,5 (5:95)	0,028	[451]
Гуанозин	То же	То же	0,034	[451]
Моноэтаноламид стеариновой кислоты	Хитачи 3011	Метанол : вода (97:3)	0,036	[310]
Диэтаноламид пальмитиновой кислоты	То же	То же	0,025	[310]
Антрацен	Гиперсил ODS	Ацетонитрил : вода (80:20)	0,014	[173]
Хлорбензол	То же	То же	0,009	[173]
Додециловый спирт	То же	То же	0,019	[173]
Ацетофенон	Октилсиликагель	Метанол : вода (50:50)	0,019	[139]
Толуол	То же	То же	0,024	[139]
Толуол	То же	Метанол : вода (60:40)	0,022	[139]
3,4-Дигидрофенил-уксусная кислота	Сферисорб ODS	Ацетонитрил : 0,05 М фосфатный буфер pH 2,0 (6:94)	0,028	[292]
4-Гидроксифенил-уксусная кислота	То же	0,05 М фосфатный буфер	0,015	[292]

4.1.2.4. УДЕРЖИВАНИЕ И СОСТАВ ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ

Приступая к обсуждению влияния концентрации органического компонента подвижной фазы на величины удерживания, целесообразно более подробно остановиться на состоянии алкилсиликагеля, находящегося в равновесии с бинарным водно-органическим растворителем. Уже из самых общих представлений ясно, что молекулы органического растворителя обладают большим сродством к алкильным лигандам, чем вода. Поэтому следует ожидать их преимущественного концентрирования в приповерхностном слое, адсорбции на органических лигандах неподвижной фазы. При этом в зависимости от состава подвижной фазы и строения сорбента, вероятно, возможно образование как мономолекулярного слоя органического растворителя, так и более толстых слоев неподвижной фазы, состоящих из цепей органического лиганда, «пропитанных» молекулами органического компонента подвижной фазы. С другой стороны, если концентрация органического растворителя в подвижной фазе мала, сорбент ею не смачивается [350]. В этом легко может убедиться каждый, насыпав на поверхность воды щепотку сорбента. Ряд авторов высказали предположение, что в таком случае радикалы органических лигандов плотно прижимаются к поверхности силикагелевой матрицы или даже образуют своего рода переплетения, микроскопические капельки на поверхности силикагеля. При увеличении концентрации органического компонента цепи алкильных лигандов постепенно распрямляются, слой их становится более рыхлым, пока, наконец, не достигается полное смачивание подвижной фазой.

Процессы сорбции органических модификаторов из бинарных подвижных фаз были предметом специальных исследований. Вопрос этот представляет не только теоретический интерес, но и практический, так как сорбционная иммобилизация органических растворителей может влиять на фазовое отношение колонки и тем самым вносить неопределенность в величины t_0 , V_0 и, следовательно, k' [294].

В работах [290, 291] показано, что обращенно-фазовые материалы сорбируют из бинарных растворителей значительные количества органического модификатора. Так, максимальное количество поглощаемого метанола составляет 2% от массы сорбента, ацетонитрила и тетрагидрофурана — до 10%. Эти цифры сопоставимы с типичными концентрациями органических лигандов в сорбенте, а значит, в определенных условиях неподвижная фаза фактически почти наполовину может состоять из органического модификатора.

Установлено [360], что сорбция метанола и ацетонитрила может быть причиной серьезных погрешностей при определении объема подвижной фазы в колонке и, следовательно, величины V_0 . Величина V_0 уменьшается с увеличением концентрации ацетонитрила от 0 до 50% приблизительно на 12%, а при дальнейшем увеличении концентрации ацетонитрила остается постоянной [453]. По мере увеличения концентрации ацетонитрила увеличивается его процентное содержание и объем в адсорбированной фазе (рис. 4.12). Содержание ацетонитрила в указанной фазе сильно зависит также от удельной поверхности сорбента [452].

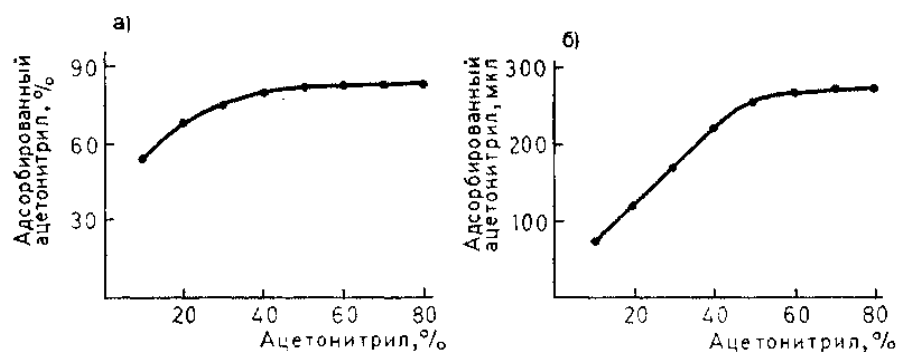


Рис. 4.12. Адсорбция ацетонитрила на поверхности Гиперсила С8 в зависимости от состава подвижной фазы. Колонка 4,6x150 мм. *a* — содержание ацетонитрила (%) в адсорбированной фазе; *б* — количество (мкг) адсорбированного ацетонитрила на поверхности сорбента

Роль адсорбированного растворителя и наиболее правильный в методическом отношении способ измерения I_0 являются предметом продолжающейся дискуссии в литературе. Одна из последних рекомендаций на этот счет [129] предусматривает применение для определения t_0 дейтерированной воды, метанола, ацетонитрила при рефрактометрическом детектировании и нитрометана — при детектировании по УФ-поглощению.

Зависимость величин удерживания от количественного состава подвижной фазы следует уже из основополагающих работ по теории обращенно-фазовой хроматографии [202, 203]. Так, для оценки влияния концентрации органического растворителя в принципе могло бы быть использовано уравнение (4.5). Однако это математическое описание достаточно сложно и требует знания физико-химических параметров системы, которые нелегко найти в литературе либо определить экспериментально. Поэтому чаще всего пользуются упрощенными моделями, приводящими к вполне удовлетворительным результатам.

Яндера и Хурачек [219] предложили уравнение

$$\lg k' = a - mc + pc^2 \quad (4.39)$$

где a , m , p — коэффициенты; c — объемная концентрация более сильного растворителя. Физический смысл коэффициентов раскрыт с помощью теории параметров растворимости Хильдебранда:

$$a = \left(\lg \frac{V_s}{V_m} + \frac{V_x}{2,3RT} \right) [(\delta_x - \delta_a)^2 - (\delta_s - \delta_x)^2]; \quad (4.40)$$

$$m = \frac{2V_x}{2,3RT} (\delta_x - \delta_a) (\delta_b - \delta_a); \quad (4.41)$$

$$p = \frac{V_x}{2,3RT} (\delta_b - \delta_a)^2, \quad (4.42)$$

где δ_x , δ_s , δ_a , δ_b — параметры растворимости сорбата, сорбента, слабого и сильного компонента подвижной фазы соответственно, V_x — мольный объем сорбата; V_s и V_m — объемы неподвижной и подвижной фаз; R — газовая постоянная; T — абсолютная температура.

Впоследствии на основе теории индекса взаимодействия [230] также было получено выражение, формально идентичное (4.40), однако с другими значениями параметров a , m , p :

$$a = \lg \left(\frac{V_s}{V_m} \right) + \frac{V_x I_{H_2O} c_m}{2,3RT} (I_{H_2O} c_m - I_x c_x); \quad (4.43)$$

$$m = \frac{V_x c_m}{2,3RT} (2I_{H_2O} c_m - I_x c_x) (I_{H_2O} - I_{орг}); \quad (4.44)$$

$$p = \frac{V_x c_m^2}{2,3RT} (I_{H_2O} - I_{орг})^2, \quad (4.45)$$

где I_x , I_{H_2O} , $I_{орг}$ — индексы взаимодействия сорбата, воды и органического модификатора соответственно; c_m и c_x — константы, экспериментально определяемые из величин удерживания стандартных соединений.

Аналогичная модель предложена в работах [255, 341, 405].

Уравнение (4.39) довольно редко используется для описания и прогнозирования экспериментальных данных, поскольку влияние члена pc^2 сказывается лишь тогда, когда рассматривается очень широкий диапазон c . Практически при измерении коэффициентов емкости нецелесообразно выходить за пределы $1 > k' > 20$, а этим пределам отвечает довольно ограниченный диапазон c . Поэтому подавляющее большинство исследователей используют простейшее выражение

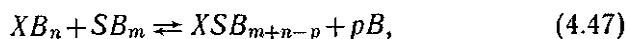
$$\lg k' = a - mc, \quad (4.46)$$

где $a = k'_w$ — коэффициент емкости, экстраполированный к нулевому содержанию органического растворителя в подвижной фазе. Как правило, уравнение (4.46) превосходно описывает экспериментальные данные, и обнаружить кривизну зависимости $\lg k' - \lg c$ не так легко.

Другой подход к описанию зависимости удерживания от концентрации органического модификатора основан на гипотезе о сольватации сорбата и сорбента [307]. Предположим, что:

- 1) молекула сорбата X в растворе сольватирована n молекулами органического растворителя (XB_n);
- 2) неподвижная фаза сольватирована m молекулами органического растворителя (SB_m);
- 3) при сорбции часть сольватирующих молекул растворителя B высвобождается в подвижную фазу.

Соответствующее уравнение может быть записано в виде



где XSB_{m+n-p} — сорбированный комплекс; p — число молекул растворителя B , высвобождающееся при сорбции. Константа равновесия может быть найдена как

$$K_p = \frac{[XSB_{m+n-p}][B]^p}{[XB_n][SB_m]}. \quad (4.48)$$

Коэффициент емкости определяется как произведение коэффициента распределения на фазовое отношение:

$$k' = \frac{[XSB_{m+n-p}]}{[XB_n]} \cdot \frac{V_s}{V_m}. \quad (4.49)$$

Подставив (4.48) в (4.49), получим

$$k' = \frac{K_p [SB_m] V_s}{[B]^p V_m}; \quad (4.50)$$

$$\lg k' = \lg K_p + \lg [SB_m] + \lg (V_s/V_m) - p \lg [B]. \quad (4.51)$$

Считая, что при достаточно большой концентрации органического растворителя величины $[SB_m]$ и V_s/V_m постоянны, получим простейшее линейное уравнение

$$\lg k' = b - p \lg C, \quad (4.52)$$

где p имеет ясный физический смысл — число молекул органического растворителя, вытесняемое с поверхности сорбента одной молекулой сорбата. Смысл свободного члена b в этом уравнении иной, чем в (4.46). Он соответствует логарифму коэффициента емкости при концентрации органического растворителя 1 моль/л. Подчеркнем, что по определению константы равновесия в уравнении (4.48) используется не объемная, а молярная концентрация растворителя B .

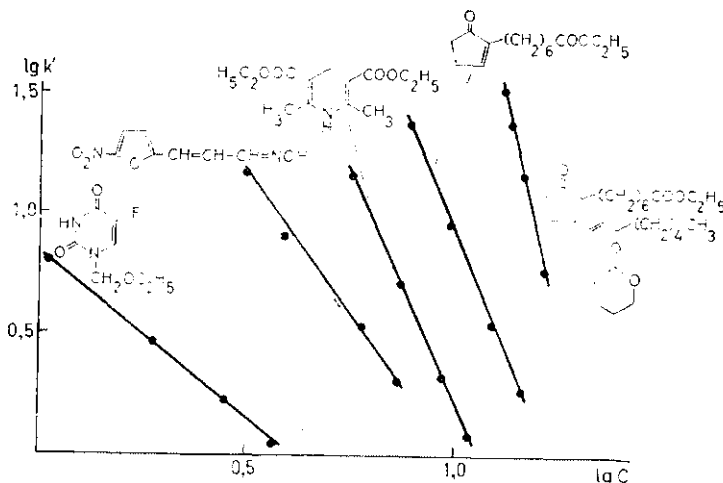


Рис. 4.13. Зависимость удерживания органических веществ — представителей различных классов от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе.

Уравнение (4.52) используется в литературе значительно реже, чем (4.46), однако, по нашему мнению, для пренебрежения им нет достаточных оснований. Мы использовали уравнение (4.52) для описания удерживания самых разнообразных классов соединений — алканов, алкилбензолов, алифатических кетонов, спиртов, производных адамантана, дигидропиридина, 5-фторурацила, циклопентанона, пептидов. Некоторые примеры зависимостей (4.52) представлены на рис. 4.13. Во всех случаях отклонение экспериментальных данных от прямых (4.52) было сопоставимо с погрешностью определения lgk' . В пользу уравнения (4.52) свидетельствует также то обстоятельство, что числовые значения коэффициента p находятся в качественном соответствии со сравнительными размерами молекул сорбатов и органических модификаторов. Так, по данным [307], при элюировании бензола его молекула вытесняет около 6 молекул метанола, 4,5 молекулы этанола, 3 молекулы пропанола-2. В табл. 4.14 приведены параметры уравнения (4.52) для углеводов, алкилбензолов и различных кислородсодержащих соединений. В качестве неподвижной фазы использован Зорбакс ODS, подвижная фаза состояла из ацетонитрила и воды в различных соотношениях. В гомологических рядах введение двух метиленовых групп приводило к увеличению параметра p примерно на единицу, что соответствует сравнительным размерам молекулы ацетонитрила и фрагмента —CH₂—CH₂—. Независимо от того, какая из двух простейших зависимостей удерживания от состава подвижной фазы теоретически более строга, обе они имеют большое практическое значение, так как позволяют, при известных величинах удерживания для двух составов подвижных фаз, прогнозировать поведение при произвольном соотношении концентраций воды и органического растворителя. При этом зависимости (4.46) и (4.52) часто соблюдаются настолько хорошо, что возможна не только интерполяция удерживания между двумя крайними составами подвижной фазы, но и экстраполяция по уравнениям

$$\lg k'_1 = \lg k'_1 + \frac{c_i - c_1}{c_2 - c_1} (\lg k'_2 - \lg k'_1); \quad (4.53)$$

$$\lg k'_i = \lg k'_1 + \frac{\lg C_i - \lg C_1}{\lg C_2 - \lg C_1} (\lg k'_2 - \lg k'_1). \quad (4.54)$$

На основании анализа имеющихся экспериментальных данных можно полагать, что уравнения (4.46) и (4.52) одинаково хорошо описывают удерживание в тех случаях, когда сорбаты достаточно гидрофобны и, следовательно, хроматографирование происходит при высоких (например, выше 40%) концентрациях органического растворителя. Выяснить, какая из двух моделей лучше, мешает и то чисто математическое обстоятельство, что при больших c объемная концентрация и логарифм молярной концентрации с высокой точностью линейно коррелированы между собой. Так, для ацетонитрила в диапазоне 5—95% коэффициент корреляции составляет 0,933, в диапазоне 45—90% — 0,996, в диапазоне 5—45% — 0,958.

В табл. 4.15 представлены параметры уравнений (4.46) и (4.52) для n -алканов и статистические критерии, характеризующие соответствие экспериментальных данных этим уравнениям. Видно, что качество описания величин удерживания обеими моделями практически одинаково.

В случае менее гидрофобных сорбатов, которые хроматографируют в подвижных фазах, содержащих органический растворитель в меньших концентрациях, уравнение (4.52) приводит к лучшим результатам. В табл. 4.16 и 4.17 представлены величины lgk' для производных 1,4-дигидропиридина и 5-фторурацила. Условно разделив эти данные на две группы — более и менее гидрофобные соединения, — можно сопоставить качество описания данных уравнениями (4.46) и (4.52). Согласно результатам табл. 4.18, при малых концентрациях ацетонитрила (первые 11 строк) уравнение (4.52) обладает выраженными преимуществами.

Таблица 4.14

Параметры уравнения (4.52) для алканов, алкилбензолов и кислородсодержащих соединений

Вещество	b	P	r	n	σ	F
Пентан	5,593	-4,415	0,999	4	0,007	2525
Гексан	6,253	-4,842	0,999	5	0,011	3593
Гептан	7,041	-5,368	0,999	5	0,016	2001
Октан	8,027	-6,054	0,999	4	0,012	1637
Нонан	8,874	-6,623	0,999	4	0,015	1244
Бензол	3,268	-2,856	0,994	4	0,008	1616
Толуол	3,845	-3,238	0,999	4	0,007	2562
Этилбензол	4,440	-3,655	0,999	4	0,011	1344
н-Пропилбензол	4,918	-3,986	0,998	4	0,016	710
н-Бутилбензол	5,246	-4,211	0,999	4	0,012	1337
о-Ксилол	4,307	-3,543	0,999	4	0,012	1082
м- Ксилол	4,404	-3,598	0,998	4	0,015	709
п-Ксилол	4,404	-3,598	0,998	4	0,015	709
Кумол	4,937	-4,004	0,999	4	0,015	875
1,2,4-Триметилбензол	4,879	-3,907	0,999	4	0,015	828
1,2,4,5-Тетраметилбензол	5,341	-4,194	0,999	4	0,017	694
1-Метил-4-трет-бутилбензол	5,866	-4,611	0,999	4	0,013	1313
Этилбутират	2,875	-2,603	0,999	6	0,005	14670
Этилизовалерат	3,535	-3,079	0,999	6	0,007	12477
Этилкапроат	4,320	-3,624	0,999	6	0,005	30590
Метилкаприлат	5,090	-4,142	0,999	6	0,008	10033
Бутилацетат	2,821	-2,549	0,999	6	0,012	2571
Пентанон-2	1,723	-1,774	0,996	6	0,017	346
Гептанон-2	3,086	-2,730	0,998	6	0,020	1033
Октанон-2	3,732	-3,157	0,999	6	0,019	2414
Ундеканон-2	5,825	-4,579	0,999	6	0,009	4550
Гептанон-4	3,159	-2,789	0,999	6	0,011	3361
Пентанол-1	1,602	-1,674	0,998	6	0,015	944
Гексанол-1	2,205	-2,061	0,995	6	0,032	485
Гептанол-1	2,912	-2,547	0,997	6	0,031	831
Октанол-1	3,413	-2,846	0,998	6	0,023	867
Нонанол-1	4,090	-3,303	0,998	6	0,024	1104
Деканол-1	4,547	-3,552	0,999	6	0,013	1802
Пентанол-2	1,323	-1,444	0,998	6	0,013	992
3-Метилбутанол-1	1,446	-1,552	0,997	6	0,016	767

Вещество	n	Уравнение (4.46)					Уравнение (4.52)				
		a	$-m$	r	F	σ	b	$-p$	r	F	σ
Пентан	4	2,210	2,227	0,9976	421	0,018	5,593	4,415	0,9996	2525	0,007
Гексан	5	2,710	2,682	0,9984	976	0,021	6,253	4,842	0,9995	3593	0,011
Гептан	5	3,115	2,976	0,9990	1502	0,018	7,041	5,368	0,9992	2001	0,016
Октан	4	3,393	3,127	0,9990	1026	0,015	8,027	6,054	0,9993	1637	0,012
Нонан	4	3,806	3,423	0,9995	1877	0,012	8,874	6,623	0,9992	1244	0,015

Оценка возможности экстраполяции данных по уравнениям (4.53) и (4.54) выполнена нами следующим образом. В качестве концентраций c_b , c_1 и c_2 выбраны такие комбинации (%):

C_1	C_2	C_i
60	70	50
20	30	10

Сравнение расчетных значений c экспериментально найденными, приведенное на рис. 4.14, свидетельствует о том, что при уменьшении концентрации органического растворителя уравнение (4.53) дает все возрастающую систематическую погрешность и при малых c использование формулы (4.54) предпочтительнее.

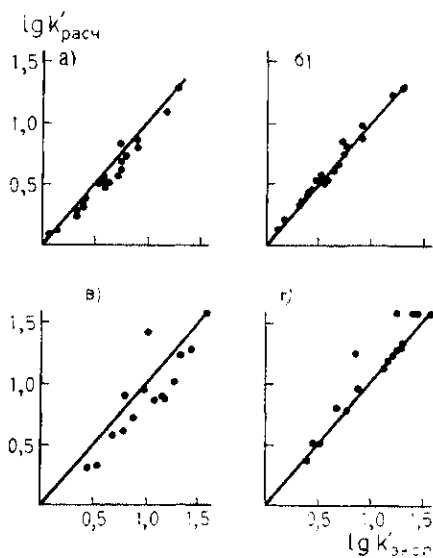
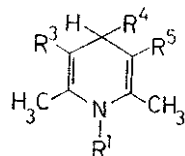


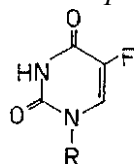
Рис. 4.14. Сравнение экспериментально найденных величин удерживания производных 5-фтор-урацила и 1,4-дигидропиридина с рассчитанными по уравнениям (4.53) (а,в) и (4.54) (б,г) для концентраций ацетонитрила в подвижной фазе 50% (а,б) и 10% (в,г).

Логарифмы коэффициентов емкости производных 1,4- дигидропиридина

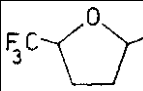
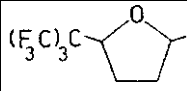
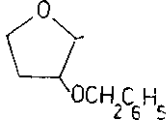
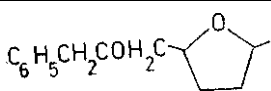
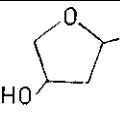
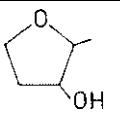
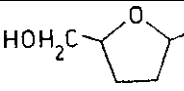
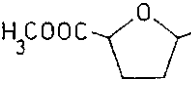
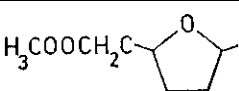
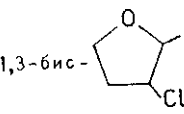
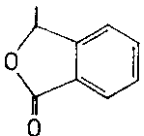
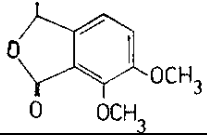
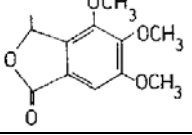


№	R ₃ =R ₅	R ₄	R ₁	Концентрация CH ₃ CN, %					
				30	40	50	60	70	80
1	-COOC ₂ H ₅	— H	— H	1,20	0,73	0,34	0,07	-0,14	-0,12
2	— COOC ₂ H ₅	--CH ₃	— H		0,81	0,41	0,12	-0,062	-0,08
3	— COOC ₂ H ₅	— C ₆ H ₆	— H		1,06	0,56	0,23	0,11	
4	-COOC ₂ H ₅	— H	-CH ₃			0,59	0,30	0,12	
5	— COOC ₂ H ₅	-- C ₆ H ₅	-CH ₃			0,79	0,43		
6	— COOC ₂ H ₅	--(CH=CH) ₂ -	— H			0,69	0,28	0,007	-0,27
7	— COOC ₂ H ₅	-CH=CH-	— H		1,095	0,58	0,22	-0,02	-0,3
8	— COOC ₂ H ₅	-CH=CH-	— H		1,07	0,54	0,18	-0,12	
9	— COOC ₂ H ₅		— H		0,80	0,35	0,02	-0,25	
10	— COOC ₂ H ₅		— H		0,89	0,40	0,065	-0,22	
11	— COOCH ₃	-CH=CH-	— H		0,72	0,28	-0,11	-0,26	
12	—COOCH ₃	--(CH=CH) ₂ -	— H		0,91	0,40	0,01	-0,29	
13	—COOCH ₃		— H	0,85	0,42	0,05	-0,25		
14	—COOCH ₃		— H		0,51	0,11	-0,2	-0,52	
15	—COOCH ₃	— C ₆ H ₄ OCHF ₂ (-o)	— H		0,81	0,34	-0,02	-0,29	
16	—COOCH ₃	— C ₆ H ₄ NO (-o)	— H		0,59	0,18	-0,087	-0,31	
17	— COOC ₂ H ₅	-C ₆ H ₄ CF ₃ (-o)	— H			0,77	0,39	-0,08	-0,19
18	— COOC ₂ H ₅	-CH=CH-	— H			0,75	0,39	0,097	-0,18
19	—COOCH ₃	— C ₆ H ₄ SCHF ₂	— H		1,06	0,55	0,20	-0,09	
20	— COSC ₂ H ₅	— H	— H			0,94	0,61	0,39	0,16
21	— COSC ₂ H ₅	— C ₆ H ₄ NO ₂ (-o)	— H			0,72	0,33	0,061	-0,27
22	— COOC ₆ H ₁₁	— H	— H				1,14	0,82	0,53
23	— COOC ₆ H ₁₁	-CH ₃ -C ₆ H ₅	— H				1,15	0,88	0,61
24	— COOC ₆ H ₁₁		— H				1,21	0,90	0,51

Логарифмы коэффициентов емкости производных 5-фторурацила



№ пп	Радикал	Концентрация ацетонитрила в подвижной фазе, %											
		2	3	5	10		20	25	30	40	50	60	70
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	— CH ₂ OCH ₃			0,389	0,104	-0,086	-0,26						
2	— CH ₂ OC ₂ H ₅			0,822	0,49	0,238	0,037	-0,092	-0,26				
3	— CH ₂ OC ₃ H ₇				0,967	0,691	0,764	0,260	0,072				
4	— CH ₂ OC ₄ H ₉				1,468	1,158	0,872	0,639	0,407				
5	— CH ₂ OC ₅ H ₁₁								0,766	0,301	-0,125		
6	— CH ₂ OC ₆ H ₁₃								1,159	0,614	0,151		
7	— CH ₂ OC ₇ H ₁₅									0,943	0,412	0,047	
8	— CH ₂ OC ₈ H ₁₇									1,273	0,682	0,271	
9	— CH ₂ OC ₉ H ₁₉										0,944	0,500	0,125
10	— CH ₂ OC ₁₀ H ₂₁										1,209	0,716	0,332
11	-CH ₃ CHOC ₂ H ₅			1,294	0,918	0,633	0,389	0,238	0,037				
2	-CH ₃ CHOC ₃ H ₇				1,435	1,114	0,834	0,611	0,373				
13	-CH ₃ CHOC ₄ H ₉					1,550	1,267	1,004	0,707				
14	-CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OCH ₃			0,765	0,367	0,104	-0,137	-0,194					
15	-CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OC ₂ H ₅			1,176	0,722	0,422	0,161	0,00					
16	-CH ₂ OCH ₂ CH ₂ Cl			1,029	0,707	0,477	0,281	0,134	-0,041				
17	-CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH			0,104	-0,194								
18	-CH ₂ OCH ₂ CH ₂ COOCH ₃			0,975	0,538	0,238	0,037	-0,137	-0,260				
19				1,025	0,581	0,312	0,130						
20					1,123	0,800	0,580	0,402	0,255				
21						1,268	0,945	0,685	0,470	0,133			
22					1,191	0,800	0,538	0,325	0,145				
23							1,170	0,830	0,556	0,131			
24				1,285	0,810	0,527	0,331	0,171	0,043				
25						1,317	0,928	0,669	0,455	0,280			

26						1,295	0,945	0,660	0,415	0,050			
27									1,602	0,910	0,350		
28								1,112	0,746	0,175			
29								1,285	0,930	0,357			
30		0,9	0,715	0,49	0,184	0,00							
31		0,907	0,828	0,496	0,145		0,007						
32			1,125	0,680	0,345	0,143	0,405	0,222	0,083				
33						0,628							
34					1,210	0,761	0,461	0,212	0,007				
35								1,445	1,131	0,612	0,215		
36				1,387	1,004	0,751	0,550	0,356	0,134				
37					1,375	1,037	0,772	0,538	0,260				
38						1,337	1,045	0,765	0,436				

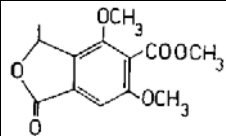
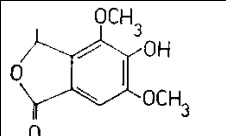
39						1,403	1,100	0,816	0,464				
40						0,839	0,602	0,422	0,161	-0,086			

Таблица 4.18

Параметры уравнений (4.46) и (4.52) для производных 5-фторурацила и 1,4-дигидропиридина

№ п/п	Номер вещества по табл. 4.17 либо табл. 4.16*	Уравнение (4.46)					Уравнение(4.52)				
		a	— m	r	F	σ	b	-P	r	F	σ
1	1	0,57	0,04	0,993	134	0,04	0,38	1,06	0,997	305	0,03
2	2	0,94	0,04	0,986	137	0,07	0,84	1,38	0,996	441	0,04
3	11	1,44	0,05	0,988	161	0,08	1,32	1,60	0,994	343	0,06
4	14	0,91	0,05	0,970	48	0,11	0,75	1,43	0,997	431	0,04
5	15	1,37	0,06	0,984	88	0,10	1,17	1,70	0,998	835	0,03
6	16	1,25	0,05	0,958	44	0,15	1,15	1,62	0,996	472	0,05
7	18	1,07	0,05	0,974	75	0,12	0,97	1,60	0,999	3091	0,02
8	20	0,92	0,07	0,969	46	0,12	0,47	1,03	0,999	78057	0,002
9	21	1,71	0,04	0,994	176	0,04	2,52	2,70	0,999	327110	0,003
10	23	2,14	0,05	0,993	151	0,06	3,18	3,45	0,999	33304	0,004
11	35	2,63	0,05	0,996	253	0,06	4,23	4,10	0,999	35623	0,005
12	4*	1,73	0,02	0,996	286	0,03	3,98	3,46	0,999	2752	0,01
13	5*	2,21	0,03	0,992	129	0,06	5,04	4,36	0,996	225	0,04
14	6*	2,23	0,03	0,994	185	0,05	5,28	4,70	0,999	907	0,02

уменьшении концентрации органического растворителя уравнение (4.53) дает все возрастающую систематическую погрешность и при малых c использование формулы (4.54) предпочтительнее.

При рассмотрении зависимости параметров удерживания от концентрации органического модификатора для родственных соединений обнаруживается интересное явление, аналогичное эффекту компенсации энтропии и энтальпии. Согласно рис. 4.13, прямые для отдельных соединений располагаются веерообразно и при экстраполяции пересекутся приблизительно в одной области графика. Аналитическим выражением для этого эффекта является корреляция между членами b и r уравнения (4.52):

$$b = b_0 + b_1 r. \quad (4.55)$$

Параметры уравнения (4.55), найденные нами для ряда классов соединений, приведены в табл. 4.19. Аналогичные данные, полученные после соответствующей математической обработки величин удерживания, опубликованных в литературе, приведены в табл. 4.20.

Сведения, подтверждающие веерообразное расположение прямых $\lg k' - \lg C$ или $\lg k' - c$, имеются также в работах [96, 99, 121, 192, 228, 307, 310, 319, 339, 341].

Коэффициенты корреляции уравнения (4.55), как правило, превышают 0,99. Нам известны лишь единичные случаи, когда соединения одного класса не подчинялись уравнению (4.55). Можно

поэтому считать, что данная закономерность универсальна для обращенно-фазовой хроматографии. Пересечение прямых $\lg k' - 1/T$ в одной точке при компенсации энтропии и энтальпии (см. 4,1.2.3) указывает на общность механизма удерживания в рассматриваемом ряду веществ. Аналогичным образом можно предположить, что стремление прямых $\lg k' - \lg C$ к изопараметрической точке с координатами $\lg k' = b_0$, $\lg C = -b_1$ свидетельствует о том, что вещества данного ряда сорбируются по одинаковому механизму. Интересно отметить, что аналогичная закономерность наблюдается для зависимостей (4.23) и (4.24). Так, прямые $\lg k' - n_c$, соответствующие различным концентрациям органического растворителя в подвижной фазе, также располагаются веерообразно, и коэффициенты уравнений (4.23) и (4.24) a и b коррелированы между собой:

$$a = a_0 + a_1 b. \quad (4.56)$$

Обнаруженная закономерность может быть интерпретирована в рамках теории сольвофобной хроматографии Хорвата [202], согласно которой для родственных соединений справедливо соотношение

$$\lg k' = A'' + \frac{N}{RT} \gamma \Delta A, \quad (4.57)$$

где A'' — константа для данного класса веществ; γ — поверхностное натяжение подвижной фазы; N — число Авогадро; ΔA — уменьшение общей неполярной поверхности в результате образования адсорбированного комплекса.

Таблица 4.19

Параметры уравнения (4,55). Сорбент — Зорбакс ODS

Класс соединений	Ацетонитрил, пределы концентрации, %	b_0	b_1	r
Алканы	60—100	-0,953	-1,458	0,999
Алкилбензолы	50—100	-0,953	-1,482	0,999
Сложные эфиры	30—70	-0,837	-1,427	0,999
Кетоны	30—70	-0,904	-1,467	0,999
Спирты	30—70	-0,931	-1,527	0,999
Алканы, алкилбензолы, сложные эфиры, кетоны, спирты	30 — 100	-0,873	-1,466	0,999
Кислородсодержащие производные циклопентана	20 — 70	—0,963	—1,482	0,998
Производные 5-фторурацила	5 — 70	—0,635	—1,165	0,995
Производные 1,4-дигидропиридина	20—70	-1,388	—1,439	0,983
Пептиды	20-50	-1,001	-1,168	0,992
Пептиды*	20-^50	-0,835	-1,127	0,983

* Сорбент — Силасорб С18

Таблица 4.20

Параметры уравнения (4.55), рассчитанные по литературным данным

Класс соединений	Сорбент	Органический модификатор*, пределы концентрации, %	b_0	b_1	r^{***}	Литература
Ароматические кислоты	Хитачи 3011	А, 20—50	-0,486	-1,340	0,997	[174]
	Хромосорб LC-8	А, 10—70	-0,967	-1,467	0,980	[172]
N-алкилбензамиды	Партисил ODS-2	А, 20—40	-0,716	-1,394	0,981	[436]
	То же	М, 20—40	-0,761	-1,524	0,999	[436]
Ароматические нитросоединения	Лихросорб RP18	А, 60—80	-0,227	-1,394	0,992	[68]
Барбитураты	Партисил ODS	М, 30—50	-0,320	-1,362	0,998	[434]
	Партисил ODS-2	М, 30—50	-1,170	-1,619	0,996	[434]
N-замещенные фталимиды	Лихросорб RP18	М, 50—80	-1,726	-1,545	0,947	[122]
Производные пиридазинона	То же	М, 55—80	-1,647	-1,492	0,997	[80]
Различные ароматические и алифатические соединения	Лихросорб RP8	А, 0—100	-0,808	-1,391	0,994	[197]
Ароматические углеводороды	То же	М, 20—80	-0,145	-1,352	0,999	[197]
	То же	Э, 20—80	-0,239	-1,160	0,999	[197]
Ароматические углеводороды	То же	Т, 30—90	-0,443	-0,975	0,997	[197]
	То же	П, 10—60	-0,544	-1,050	0,996	[197]
Изомерные алкилбензолы	Гиперсил ODS	М, 40—50	-0,556	-1,349	0,997	[361]
Алкилпарабены	То же	М, 50—70, 36°C	-0,306	-1,353	0,993	[64]
	То же	М, 50—70 52°C	-0,275	-1,295	0,999	[64]
Ароматические соединения	Зорбакс ODS	М, 45—70	-0,235	-1,267	0,996	11171
	То же	Т, 40—50	-0,541	-0,976	0,998	1Н7
	То же	А, 40—75	-1,306	-1,540	0,998	[117]
Желчные кислоты	Нуклеосил C18	А, 40—70; Ф рН 3	-0,921	-1,412	0,972	[285]
	То же	М, 65—85; Ф рН 3	-0,372	-1,397	0,996	[285]
	То же	А, 35—60; Ф рН 7,5, ТБА 0,005 М	-0,507	-1,399	0,945	[285]
Метилловые эфиры карбоновых кислот	Гиперсил ODS	М, 65—85; Ф рН 7,5, ТБА 0,005 М	-1,619	-1,387	0,992	[285]
Алкилбензолы	То же	М, 10—100	-0,631	-1,387	0,999	[96]
	То же	М, 60—100	-1,210	-1,471	0,999	[96]
	То же	Т, 30—80	-0,607	-1,053	0,997	[96]
Алканы	То же	М, 60—90	-0,886	-1,416	0,997	[96]
Фенолы	Бондапак C18	М, 50—80	-0,242	-1,440	0,999	[434]
Замещенные N-этилбензамиды	Сферисорб ODS-2	М, 40—70	-0,895	-1,867	0,999	[276]
	Бондапак C18	М, 40—70	-0,388	-1,326	0,999	[276]
	Нуклеосил 7-C ₆ H ₅	М, 40—70	-0,190	-1,304	0,999	[276]

* А — ацетонитрил; М — метанол; Э — этанол; П — пропанол; Т — тетрагидрофуран;
 Ф — фосфатный буфер; ТБА — тетрабутиламмоний.
 ** r — коэффициент корреляции.

Следовательно, коэффициент b уравнения (4.52) может быть представлен в виде

$$b = A'' + \frac{N}{RT} \gamma_1 \Delta A, \quad (4.57')$$

где γ_1 — поверхностное натяжение подвижной фазы, содержащей 1 моль/л органического модификатора.

Параметр ΔA для данного класса веществ пропорционален общей площади гидрофобной поверхности молекулы сорбата

$$\Delta A = \alpha A_x. \quad (4.58)$$

С другой стороны, чем больше гидрофобная поверхность молекулы сорбата, тем больше сольватирующих молекул органического растворителя с нею связано, и поэтому между параметром p уравнения (4.52) и A_x также существует линейная зависимость

$$A_x = sp, \quad (4.59)$$

где s — средняя площадь неполярной поверхности, сольватируемая одной молекулой органического растворителя. Объединив уравнения (4.57'—4.59), получим уравнение

$$b = A'' + \left(\frac{N}{RT} \gamma_1 \alpha s \right) p, \quad (4.60)$$

совпадающее по форме с уравнением (4.55) и раскрывающее физический смысл коэффициентов b_0 и b_1 . Коэффициент

$$b_1 = \frac{N}{RT} \gamma_1 \alpha s \quad (4.61)$$

не содержит параметров, связанных с природой рассматриваемого сорбента, а всецело определяется параметрами подвижной фазы. Этот теоретический вывод получил свое экспериментальное подтверждение в данных табл. 4.19 и 4.20.

Рассмотрим величины b_1 для алканов, алкилбензолов, сложных эфиров, кетонов и спиртов (см. табл. 4.19). Из таблицы видно, что они лишь незначительно колеблются около средней величины. Объединение всех соединений в одну группу также не привело к изменению величины параметра b_1 . Более того, этот параметр мало изменился при переходе к более сложным, полифункциональным производным 1,4-дигидропиридина и циклопентана. Исключение составили высокополярные сорбаты — производные 5-фторурацила и пептиды. Внутри этих классов, разумеется, зависимость (4.55) также соблюдается, однако отличающееся значение b_1 позволяет предположить, что механизм их сорбции несколько отличен от такового для других классов веществ. Величины b_0 хотя и менее стабильны, чем b_1 , но также колеблются в довольно узких пределах. Согласно уравнению (4.57), b_0 равно параметру A'' сольвофобной теории Хорвата и является сложной функцией свойств компонентов системы — мольных объемов, дипольных моментов, поляризуемости и др. Поэтому, естественно, особенности рассматриваемых систем оказывают на этот параметр большое влияние. Роль сорбента позволяют проследить данные табл. 4.20, в которой сопоставлены величины b_0 и b_1 , полученные для набора монофункциональных соединений. Коэффициент b_1 весьма устойчив, в то время как b_0 подвержен заметным колебаниям.

Вывод теории о том, что величина параметра b_1 определяется преимущественно характером органического растворителя, подтверждается при анализе данных табл. 4.20. Средние величины b_1 уменьшаются с увеличением элюирующей силы органического растворителя либо его

гидрофобности. Полученные данные позволяют утверждать, что если сорбаты некоторой группы удерживаются по сходному механизму, то для них выполняется зависимость (4.55). Параметр b_1 :

- независим от типа сорбатов;
- независим от типа неполярного сорбента;
- сохраняет постоянство даже в присутствии буферных растворов и ион-парных агентов;
- уменьшается с ростом гидрофобности органического растворителя.

Таким образом, подчинение или неподчинение сорбата уравнению (4.55) в сравнении с другими сорбатами может служить критерием единства механизма сорбции. С другой стороны, эта зависимость может быть использована для интерпретации механизма удерживания как адсорбционного или распределительного. Рассуждения, аналогичные приведенным выше относительно природы закономерности (4.55), могут быть применены и к распределению в модельных системах жидкость—жидкость. Если в качестве полярной фазы используем бинарные растворители, аналогичные подвижным фазам обращенно-фазовой хроматографии, то для коэффициентов распределения P получим зависимости, аналогичные (4.52) и (4.55):

$$\lg P = b_p - p_p \lg C, \quad (4.62)$$

$$b_p = b_{0p} + b_{1p} p_p. \quad (4.63)$$

где b_p , p_p , b_{0p} , b_{1p} — коэффициенты. Для анализа механизма удерживания сопоставим поведение алкилбензолов в обращенно-фазовой хроматографии и при распределении жидкость—жидкость в модельных системах (данные Л. А. Бривкалне). Параметры уравнений (4.52) и (4.62) представлены в табл. 4.21, параметры уравнений (4.55) и (4.63) — в табл. 4.22. Анализ приведенных данных показывает, что величины b_p в среднем выше b на 1,0, что качественно соответствует логарифму фазового отношения использованной колонки. Величины p близки к p_p , и между ними наблюдается линейная связь как в режиме хроматографии, так и при распределении. Величина b_1 для различных органических растворителей в режиме хроматографии близка к аналогичному параметру b_{1p} для распределения жидкость—жидкость. Порядок изменения этих величин в ряду метанол—ацетонитрил—этанол—пропанол-2 совпадает с порядком изменения элюирующей силы модификаторов. Из всей совокупности данных следует, что механизм обращенно-фазовой хроматографии указанного класса соединений близок к распределительному.

Таблица 4.21

Параметры уравнений (4.52) и (4.62) для алкилбензолов

Соединение	Уравнение (4.52)				Уравнение (4.62)			
	b	P	r	F	b_p	p_p	r	F
<i>Органический модификатор — ацетонитрил</i>								
Бензол	2,97	-2,62	0,992	119	3,86	-2,87	0,999	1452
Толуол	3,64	-3,09	0,995	199	4,65	-3,51	0,999	2994
о-Ксилол	4,12	-3,41	0,997	323	5,53	-4,09	0,999	2828
Псевдокумол	4,78	-3,85	0,997	384	5,94	-4,26	0,999	2911
Дурол	5,22	-4,12	0,998	436	6,59	-4,69	0,999	2531
<i>Метанол</i>								
Бензол	5,25	-4,24	0,998	424	5,83	-4,00	0,991	214
Толуол	6,31	-4,90	0,997	331	6,71	-4,55	0,992	231
о-Ксилол	7,13	-5,40	0,998	488	7,64	-5,05	0,987	151
Псевдокумол	8,21	-6,08	0,998	501	8,60	-5,64	0,989	182
Дурол	9,07	-6,61	0,997	394	8,79	-5,63	0,984	124
<i>Этанол</i>								
Бензол	3,52	-3,40	0,999	3271	4,79	-3,79	0,997	1567
Толуол	4,31	-3,98	0,999	5542	5,61	-4,60	0,998	2341
о- Ксилол	4,99	-4,47	0,999	14225	6,48	-5,04	0,996	520
Псевдокумол	5,71	-4,98	0,999	9743	7,17	-5,54	0,994	357
Дурол	6,30	-5,38	0,999	8219	7,65	-5,84	0,991	225

Пропанол-2								
Бензол	2,68	-3,08	0,999	1768	4,00	-3,35	0,993	139
Толуол	3,29	-3,60	0,999	3528	4,68	-3,84	0,991	116
о-Ксилол	3,63	-3,84	0,999	1466	5,18	-4,32	0,990	101
Псевдокумол	4,14	-4,25	0,999	1966	5,45	-4,43	0,983	57
Дурол	4,50	-4,51	0,999	1744	5,99	-4,98	0,990	105

Существование общей точки пересечения прямых (4.52) представляет практический интерес, так как позволяет прогнозировать удерживание при произвольных концентрациях органического растворителя исходя из одного экспериментального значения k' . На рис. 4.15 результаты такого рода прогноза для производных 1,4-дигидропи-ридина сопоставлены с экспериментальными данными. Для расчета использована модификация уравнения (4.54):

$$\lg k'_i = \frac{\lg C_i + b_1}{\lg C_1 + b_1} (\lg k'_1 - b_0) + b_0. \quad (4.64)$$

Для данного массива соединений $b_0 = -1,39$; $b_1 = -1,44$. Чтобы охарактеризовать возможность этого подхода для экстраполяции в широком интервале концентраций, в качестве C_1 брали самую низкую концентрацию ацетонитрила, для которой имелись экспериментальные данные. Прогнозировали удерживание при самых высоких значениях C . По представленным данным, надежность такого прогноза вполне удовлетворительна.

Если для конкретной хроматографической системы и класса сорбатов величины b_0 и b_1 неизвестны, то для ориентировочной оценки удерживания вместо них в уравнение 4.64 могут быть подставлены средние значения, найденные при обобщении данных табл. 4.18: ацетонитрил — $b_0 = -0,83$, $b_1 = -1,41$; метанол — $b_0 = -0,71$, $b_1 = -1,41$.

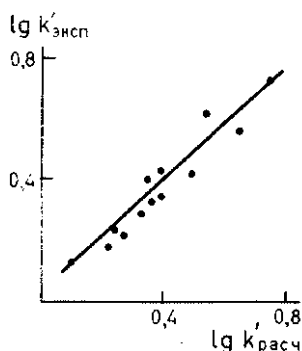


Рис. 4.15. Прогнозирование удерживания производных 1,4-дигидропиридина по модели (4.64).

Таблица 4.22

Параметры уравнений (4.55) и (4.63) для алкилбензолов

Органический полярной фазы	Уравнение (4.55)				Уравнение (4.63)			
	$-b_0$	$-b_{1p}$	r	F	$-b_{0p}$	$-b_{1p}$	r	F
Ацетонитрил	0,853	1,471	0,999	3231	0,441	1,489	0,998	1026
Метанол	1,372	1,571	0,999	5417	1,207	1,756	0,998	931
Этанол	1,501	1,441	0,999	3211	0,454	1,379	0,999	2714
Пропанол-2	1,230	1,271	0,999	7003	0,104	1,233	0,997	841

Особую с точки зрения зависимости удерживания от концентрации органического растворителя группу веществ составляют органические основания. В то время как для всех остальных сорбатов параболический характер зависимости $\lg k' = f(c)$ экспериментально обнаружить нелегко, для оснований он выражен совершенно явно, хотя причины этого определенно отличаются от общих причин, описанных в [219, 230, 341, 405]. Соединения такого типа, как правило, хроматографируют в присутствии буферных растворов с pH 2—7. При увеличении концентрации органического растворителя сначала, как обычно, коэффициенты емкости уменьшаются, а при концентрациях 30—60% этот процесс сменяется противоположным. Кривая, выражающая зависимость $\lg k'$ от c (или $\lg C$) в широком интервале величин C , приобретает выраженный

параболический характер. По-видимому, впервые это явление было систематически изучено в работе [164] на примере ряда полипептидных гормонов. В дальнейшем такое поведение было выявлено и у более коротких пептидов: окситоцина, 2-эндорфина, ранатензина [430]. Исследование различных синтетических пептидных фрагментов показало [4], что параболическая зависимость $\lg k' - \lg C$ присуща только пептидам с незащищенными аминогруппами (рис. 4.16). Наконец, согласно работе [124], такая зависимость наблюдается и для широкого круга протежированных лекарственных препаратов основного характера.

Все перечисленные работы приводят к выводу, что возрастание удерживания при больших значениях C обусловлено полярными взаимодействиями в неподвижной фазе при уменьшении концентрации воды в подвижной. Наиболее вероятный механизм таких взаимодействий — ионный обмен [315].

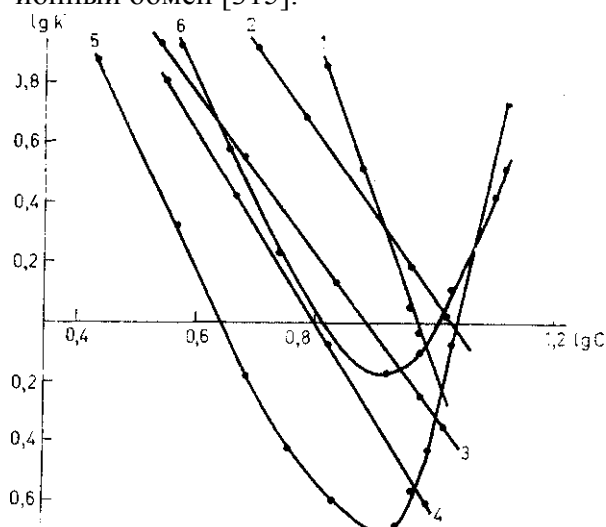


Рис. 4.16. Зависимость удерживания пептидов от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе. Сорбент—Зорбакс ODS, подвижная фаза приготавливалась на основе 0,1 М фосфатного буфера (pH 2,5). 1—4 — пептиды с защищенными аминогруппами; 5, 6 — свободные пептиды:

- 1 — Z-Ser-Tyr-Ser--Met-ONb;
- 2 — Z-Val-Gly-OEt;
- 3 — 2HCl-H-His-Phe-ONb;
- 4 — Z-Ser-Tyr-Ser-Met-OH;
- 5 — Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe;
- 6 — цикло- (Lys-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Phe-Arg).

4.1.2.5. ОПТИМИЗАЦИЯ КАЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ

При использовании современных высокоэффективных колонок для анализа смесей не слишком сложного состава обычно требуется только один органический модификатор. Выбор его определяется в первую очередь физическими свойствами, стоимостью, доступностью, а иногда и личным вкусом экспериментатора. При этом выбор состава подвижной фазы сводится (если решен вопрос о необходимости специфических модификаторов) к выбору оптимальной концентрации органического растворителя (см. 5.2.1.4). Однако по мере усложнения анализируемой смеси нарастает вероятность того, что коэффициенты емкости некоторых компонентов будут слишком близки и разделить их не удастся. В то же время разделение других компонентов настолько хорошее, что между ними на хроматограмме можно было бы разместить еще несколько пиков. В таких случаях встает вопрос об оптимизации селективности системы за счет применения двух или большего числа органических растворителей.

Общие вопросы классификации растворителей по селективности рассмотрены в главе 3. Выбор органических растворителей, отвечающих основным требованиям обращенно-фазовой ВЭЖХ, небольшой. Практически только три растворителя, пригодные для обращенно-фазовых разделений, обладают существенно различающейся селективностью: метанол, ацетонитрил и тетрагидрофуран. Изредка применяемый этанол в смысле селективности дублирует метанол, а диоксан незначительно отличается от тетрагидрофурана. К тому же, поскольку наиболее сильные взаимодействия в обращенно-фазовой хроматографии имеют место в подвижной фазе между молекулами воды, роль этих растворителей в обеспечении селективности вообще не столь велика, как при хроматографии на силикагеле. Обзоры работ, посвященных оптимизации селективности [111, 152], позволяют заинтересованным читателям ознакомиться с проблемой во всей полноте. Здесь же мы остановимся на одном из популярных и наглядных приемов

оптимизации, основанном на использовании так называемого «треугольника селективности» [154, 353, 369] (рис. 4.17). Принцип оптимизации заключается в следующем:

- 1) выбирают три бинарные подвижные фазы (вода—метанол, вода—ацетонитрил, вода—тетрагидрофуран) с примерно одинаковой элюирующей силой по отношению к разделяемой смеси;
- 2) приготавливают по определенной схеме (рис. 4.18) 10 подвижных фаз и для каждой из них измеряют коэффициенты емкости.

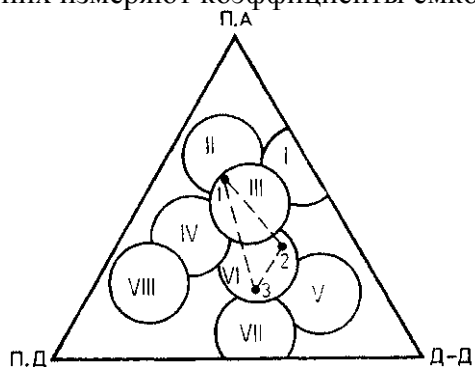


Рис. 4.17. Треугольник селективности. Вершинам соответствуют гипотетические растворители, способные только к протодонорным (ПД), протоноакцепторным (ПА) и диполь-дипольным (ДД) взаимодействиям. Пунктиром обозначена область селективности, доступная в обращенно-фазовом режиме. Точки 1, 2, 3 отражают селективность метанола, тетрагидрофурана, ацетонитрила соответственно. Группы селективности (табл. 3.4) обозначены римскими цифрами.

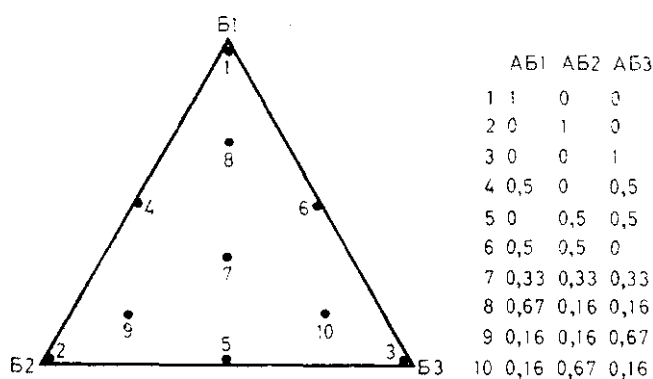


Рис. 4.18. Планирование эксперимента по оптимизации состава подвижной фазы. В таблице показаны соотношения бинарных растворителей, соответствующие точкам на рисунке.

Полученные результаты обрабатывают на ЭВМ по специальной программе и находят оптимальный состав подвижной фазы. Рациональное зерно метода, конечно, не в применении ЭВМ, а именно в обоснованном планировании экспериментов. Когда же необходимые 10 опытов выполнены, хроматографист даже с небольшим опытом легко оценит визуально, где на треугольнике состава находится тот одиннадцатый режим, который следует считать оптимальным.

4.1.2.6. ГРАДИЕНТНОЕ ЭЛЮИРОВАНИЕ

В химии лекарственных веществ и органическом синтезе исследователь чаще всего работает с относительно простыми смесями, содержащими не более 5—10 компонентов. Если компоненты не слишком различаются по своим свойствам, обычно удается подобрать такую подвижную фазу, которая обеспечивает приемлемую скорость анализа и разделение. Однако в отдельных случаях смесь может содержать вещества, сильно различающиеся по сорбционным свойствам, и, следовательно, для анализа таких соединений требуются подвижные фазы различной элюирующей силы. На рис. 4.19 приведены хроматограммы смеси, для которой не удается подобрать изократический (т. е. при постоянном составе подвижной фазы) режим разделения. В противоположность этому режиму под градиентным элюированием понимают такой способ проведения хроматографического процесса, когда в ходе анализа концентрация сильного компонента подвижной фазы повышается по заданному закону.

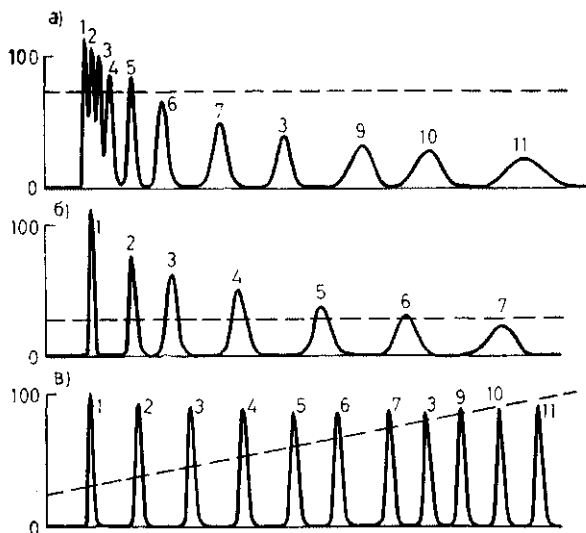


Рис. 4.19. Хроматограммы сложной смеси, а — изократическое элюирование, подвижная фаза сильная, из колонки выходят все компоненты пробы, однако рано выходящие делятся плохо; б — изократическое элюирование, сила подвижной фазы недостаточна, компоненты 8—11 из колонки не выходят; в — градиентное элюирование. Пунктир изображает содержание компонента Б в подвижной фазе в ходе элюирования.

Вопросы теории и методики применения градиентного элюирования детально рассмотрены в монографии Яндеры и Хура-чека [226]. Помимо этой монографии заинтересованному читателю можно рекомендовать оригинальные работы [77, 78 117 219-225, 227, 228, 231, 232, 238, 339-341, 371]. Здесь же мы воспроизводим только простейшие соотношения из работы [226]. Расчет удерживаемых объемов при градиентном элюировании базируется на следующей основной идее. Предположим, что бесконечно малому количеству подвижной фазы dV , прошедшему через колонку, отвечает смещение максимума хромато-графической зоны, пропорциональное величине объема подвижной фазы в колонке dV_m . В течение этой бесконечно малой ступени элюирования коэффициент емкости можно считать постоянной величиной, потому

$$dV = k' dV_m. \quad (4.65)$$

Это уравнение может быть записано в другой форме:

$$\int_0^{V_m} dV_m = V_m = \int_0^{V'_g} \frac{1}{k'} dV, \quad (4.66)$$

где V'_g — удельный удерживаемый объем в режиме градиентного элюирования. Это же соотношение может быть представлено в единицах времени:

$$\int_0^t dt_0 = t_0 = \int_0^{t'_R} \frac{1}{k'} dt, \quad (4.67)$$

где t'_R — время удерживания в режиме градиентного элюирования.

Для решения этих уравнений необходимо выразить зависимость коэффициентов емкости от объема элюента (или времени с начала градиента) в виде двух функций. Одна из них описывает связь между удерживанием и концентрацией более сильного растворителя, вторая — связь между этой концентрацией и объемом элюента (временем). Уравнение (4.66) тогда можно записать в виде

$$\int_0^{V_m} dV_m = V_m = \int_0^{V'_g} \frac{dV}{f[\Phi(V)]}, \quad (4.68)$$

где $\Phi(V)$ — функция градиента. В простейшем случае $\Phi(V)$ — линейная функция, и концентрация может быть выражена следующим образом:

$$c = \Phi(V) = A + BV, \quad (4.69)$$

где A — исходная концентрация сильного растворителя; B — крутизна градиента.

С другой стороны, зависимость k' от c может быть выражена уравнением (4.46). Объединив уравнения (4.46), (4.69) и (4.68), получим

$$V_m = \int_0^{V'_g} \frac{1}{k'_w} \cdot 10^{m(A+BV)} dV \quad (4.70)$$

и после интегрирования найдем удельный удерживаемый объем:

$$V'_g = \frac{1}{mB} \lg (2,31mBk'_w V_m \cdot 10^{-mA} + 1). \quad (4.71)$$

Приведенный подход позволяет с достаточной точностью предсказать поведение соединений в градиентном режиме, если известны параметры уравнения (4.46),

Сказанное иллюстрирует табл. 4.23, где величины V'_g , рассчитанные по уравнению (4.71), сопоставлены с экспериментально найденными значениями для ряда лекарственных веществ.

Таблица 4.23

Сопоставление расчетных и экспериментальных значений V'_g для алкалоидов и барбитуратов. Колонки с Лихросорбом RP18 (300X4,2 мм), $V_m=3,2$ мл, градиент по уравнению (4.71)

Соединение	A=0; B=-0,06872		A=0,1; B=0,06872		A=0,1; B=0,01718	
	V'_g расч	V'_g эксп	V'_g расч	V'_g эксп	V'_g расч	V'_g эксп
Теобромин	4,71	5,14	3,33	3,54	11,78	12,17
Теофиллин	5,78	6,32	4,42	4,74	13,84	15,56
Кофеин	6,92	7,26	5,50	5,64	18,71	19,21
Барбитал	7,09	7,25	5,69	5,84	18,05	17,92
Гептобарбитал	8,02	8,14	6,58	6,68	22,81	22,27
Аллобарбитал	8,61	8,72	7,17	7,31	24,74	24,34
Апробарбитал	9,14	9,28	7,70	7,90	27,10	26,75
Бутобарбитал	9,85	10,01	8,40	8,63	30,17	29,98
Гексобарбитал	10,37	10,58	8,91	9,13	32,21	31,90
Пентобарбитал			9,16	9,41	34,30	33,97

Относительные удерживаемые объемы в градиентном режиме α_g могут быть рассчитаны по аналогии с изократическими параметрами из формально вычисляемых, «кажущихся» коэффициентов емкости:

$$\alpha_g = \frac{k'_{g2}}{k'_{g1}}. \quad (4.72)$$

Наконец, величина критерия разделения R_g определяется для линейного градиента выражением

$$R_g = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\alpha_g - 1}{\alpha_g} \frac{\lg (2,31m_2BVmk'_{w_2} \cdot 10^{-m_2A} + 1) - 1}{\frac{B}{A} \cdot V_m [1 + k'_{w_2} (2,31m_2BVmk'_{w_2} + 10^{m_2A})^{-1}]}, \quad (4.73)$$

где значение символов то же, что в уравнениях (4.65) — (4.71), а индексы «2» отвечают параметрам второго пика разделяемой пары.

При общей оценке применимости метода для разделения многокомпонентных смесей может быть использован параметр P — емкость хроматограммы:

$$P_c = \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \left(\frac{V_{RZ}}{V_{RA}} \right); \quad (4.74)$$

$$P_g = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{V_{gZ}}{V_{gA}} - 1 \right), \quad (4.75)$$

где V_{RZ} , V_{RA} — удерживаемые объемы, отвечающие начальной и конечной точкам рассматриваемого участка хроматограммы в изократическом режиме; V_{gZ} , V_{gA} — аналогичные величины для режима градиентного элюирования. На рис. 4.20 сравниваются величины P_c и P_g для различной продолжительности хроматограмм в предположении, что $V_{gA} = V_m$ и $t_0 = 1$ мин. В изократическом режиме емкость хроматограммы возрастает незначительно с увеличением

продолжительности разделения свыше 15 мин, в то время как градиентное элюирование обеспечивает линейное увеличение числа пиков со временем.

Как ясно из предыдущего изложения, чисто расчетный выбор оптимальных условий градиентного элюирования требует знания параметров k'_w и m уравнения (4.46). Разумеется, эти величины можно определить, проведя необходимые предварительные измерения в изократическом режиме. Однако не всегда компоненты смеси доступны в индивидуальном виде, в связи с чем чаще условия градиентного элюирования, близкие к оптимальным, выбирают опытным путем на основании следующих правил.

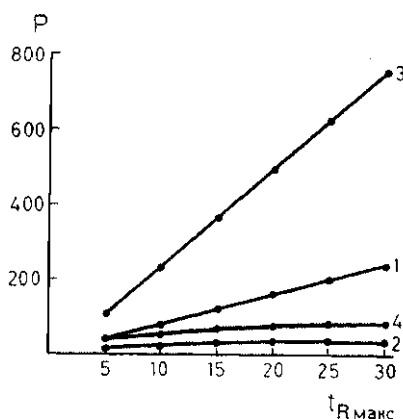


Рис. 4.20. Зависимость емкости хроматограммы P от предельного времени удерживания $t_{R \max}$ для градиентного и изократического элюирования и различной эффективности колонок; время удерживания несорбирующегося вещества 1 мин. Элюирование (теоретич. тарелки): 1 — градиентное, 1000; 2 — изократическое, 1000; 3 — градиентное, 10000; 4 — изократическое, 10000.

Выбрав подходящую колонку, проводят градиентное элюирование в таком режиме, чтобы концентрация сильного растворителя изменялась линейно от 0 до 10%, а объем растворителя в 10—15 раз превышал V_m . Если все пики выходят в течение не более чем 25% продолжительности градиента, вполне вероятно, что для данной смеси можно подобрать условия изократического элюирования. В противном случае градиентное элюирование необходимо, и дальнейшее улучшение режима производят на основании анализа распределения пиков по хроматограмме:

— если пики располагаются равномерно, причем первые из них отстоят далеко от t_0 и разделение недостаточное, следует уменьшить крутизну градиента B ;

— если при равномерном распределении пиков первые из них удерживаются слабо, должна быть уменьшена начальная концентрация сильного растворителя A ;

— если при равномерном распределении пиков они слишком хорошо разделены и продолжительность анализа велика, рекомендуется увеличить A и (или) B ;

— если разделение пиков удовлетворительно, но первое соединение имеет слишком большое удерживание, требуется увеличить A ;

— если компоненты исследуемой смеси элюируются слишком рано и плохо отделены друг от друга, то параметры A и B должны быть снижены;

— если некоторые соединения элюируются после завершения градиента, но разделение компонентов удовлетворительно и продолжительность анализа невелика, нет необходимости изменять профиль градиента. Однако если в этом случае компоненты смеси имеют избыточное разделение и удерживание последнего компонента слишком продолжительно, то органический растворитель должен быть заменен на другой, обладающий большей элюирующей силой;

— если последние компоненты смеси имеют избыточное разделение, а соединения, элюирующиеся рано, плохо отделены друг от друга, следует изменить профиль градиента; крутизна его должна возрастать по ходу анализа, либо в начале его должен быть участок изократического элюирования;

— если соединения, элюирующиеся рано, имеют избыточное разделение, а последующие компоненты — недостаточное, то крутизна градиента должна снижаться по мере его прохождения, либо в конце градиента должен быть введен участок изократического элюирования;

— если разделение и местоположение большинства пиков на хроматограмме удовлетворительно, но имеется одна или несколько пар плохо поделенных пиков в различных частях хроматограммы, то рекомендуется оптимизировать селективность разделения этих пар, например, меняя B либо сменив сильный растворитель другим, отличающимся по селективности.

4.1.2.7. СОВМЕСТНОЕ ВЛИЯНИЕ СТРОЕНИЯ СОРБАТОВ И КОНЦЕНТРАЦИИ ОРГАНИЧЕСКОГО МОДИФИКАТОРА НА УДЕРЖИВАНИЕ

Интерпретация зависимости величин удерживания от концентрации органического растворителя в подвижной фазе, приведенная в 4.1.2.4, позволяет, используя основные представления сольвофобной теории обращенно-фазовой хроматографии, получить единую модель, описывающую влияние строения сорбатов и состава подвижной фазы на коэффициенты емкости. Обратимся к физическому смыслу параметров b и p уравнения (4.52). Параметр b представляет собой логарифм коэффициента емкости при концентрации органического растворителя 1 моль/л. Ясно, что если рассматриваемые сорбаты принадлежат к одному классу, то к параметру b могут быть применены соотношения, связывающие удерживание со строением. Например, из (4.17) вытекает, что должна соблюдаться корреляция

$$b = \beta_0 + \beta_1 \lg P. \quad (4.76)$$

С другой стороны, параметр p линейно коррелирован с величиной гидрофобной поверхности молекул сорбата (уравнение (4.59)). Наконец, эта последняя величина линейно связана также с $\lg P$, поэтому и параметр p может быть выражен как функция коэффициента распределения:

$$p = \pi_0 + \pi_1 \lg P. \quad (4.77)$$

Аналогичные рассуждения, естественно, справедливы для связи параметров b и p с другими структурными дескрипторами: n_c , X , собственно с площадями гидрофобных поверхностей сорбатов. Соотношения (4.76) и (4.77) действительно наблюдаются в эксперименте. В табл. 4.24 приведены параметры этих уравнений. Значения коэффициентов корреляции не столь высоки, как в других случаях, однако, несомненно, отражают объективный характер связи b , p и $\lg P$.

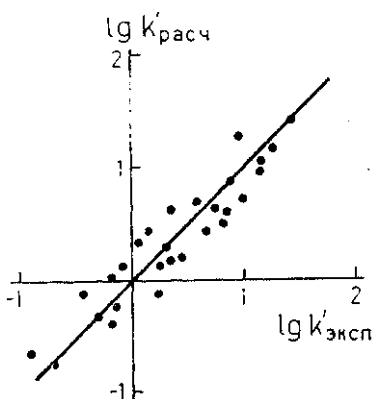


Рис. 4.21. Прогнозирование удерживания монозамещенных производных адамантана на Силасорбе С18 по модели (4.78).

Подстановка уравнений (4.76) и (4.77) в уравнение (4.52) приводит к следующей модели удерживания:

$$\lg k' = \beta_0 + \beta_1 \lg P + \pi_0 \lg C + \pi_1 \lg P \lg C. \quad (4.78)$$

Нами показано, что уравнение (4.78) и аналогичная ему закономерность, где вместо $\lg P$ использованы индексы связуемости X :

$$\lg k' = \beta_0 + \beta_1 X + \pi_0 \lg C + \pi_1 X \lg C, \quad (4.79)$$

выполняются для различных классов соединений (табл. 4.25).

Уравнение (4.78) может быть использовано для прогнозирования удерживания хроматографически не изученных соединений. На рис. 4.21 результаты таких расчетов для производных адамантана сопоставлены с экспериментальными данными. Погрешность полуколичественной оценки $\lg k'$ составляет в среднем около 0,3 [33]. С помощью уравнения (4.78) можно решить и обратную задачу: определить концентрацию органического модификатора, необходимую для хроматографирования с заданным значением k' .

Использованная здесь схема вывода моделей, описывающих совместное влияние факторов гидрофобности и концентрации органического растворителя в подвижной фазе, справедлива и

при других способах выражения гидрофобности и состава элюента. Так, в аналогичных моделях концентрация выражаются в объемных долях [190, 217, 218, 233, 270, 356], а в качестве параметра гидрофобности в рядах родственных веществ использовано число атомов углерода [190, 217], число мономерных звеньев в олигомерах [270, 356]. Согласно [218, 233], параметр гидрофобности является аддитивной функцией двух вкладов, соответствующих липофильным и полярным свойствам молекул сорбатов.

Таблица 4.24

Параметры уравнений (4.76) и (4.77)

Класс сорбатов	Сорбент	Уравнение (4.76)			Уравнение (4.77)		
		β_0	β_1	r	π_0	π_1	r
Алканы*	Зорбакс ODS	1,46	1,67	0,998	-1,66	-1,12	0,997
Алкилбензолы*	То же	1,13	1,12	0,980	-1,40	-0,76	0,985
Сложные эфиры*	»	2,09	1,44	0,998	0,87	-1,009	0,998
Кетоны*	»	-1,59	1,37	0,999	0,47	-0,93	0,999
Спирты*	»	1,76	1,18	0,997	0,54	0,77	0,994
Производные 5-фторурацила	»	1,59	1,55	0,988	-1,96	-1,20	0,971
Полупродукты синтеза	»	2,48	0,82	0,983	-2,34	-0,55	0,974
Пептиды	»	3,33	0,80	0,754	-3,92 -	-0,62	0,683
Производные 1,4-дигидропирида	»	2,44	0,51	0,852	3,25	-0,26	0,594
Производные адамантана	Силасорб C18	-0,95	1,90	0,820	0,57	-1,48	0,931

Таблица 4.25

Параметры уравнения (4.78)

Класс сорбатов	Сорбент	β_0	β_1	π_0	π_1	r	F	σ
Алканы (I*)	Зорбакс ODS	1,37	1,68	-1,54	-1,14	0,999	5246	0,014
Сложные эфиры (II*)	То же	1,74	1,36	0,55	-0,93	0,999	4353	0,016
Кетоны (III*)	»	1,55	0,48	-2,41	-0,12 -	0,984	229	0,066
Спирты (IV*)	»	1,56	1,13	0,33 -	0,72 -	0,995	1350	0,040
Алкилбензолы (V*)	»	1,41	1,03	1,67 -	0,67	0,985	457	0,058
Классы I* — V*	»	1,76	0,80	1,88 -	0,45 -	0,938	397	0,144
Классы I — V**	»	2,56	1,26	2,36 -	0,84 -	0,993	3777	0,049
Производные 5-фторурацила	»	1,30	1,02	1,62	0,70	0,983	581	0,07
Полупродукты синтеза простагландинов	»	1,93	0,37	-1,40	-0,07	0,994	1027	0,03
Пептиды	»	2,34	0,57	-2,83 -	-0,40 -	0,931	380	0,15
Производные 1,4-дигидропиридина	»	2,46	0,62	3,28	0,30	0,997	4081	0,03
Производные адамантана	Силасорб C18	-0,96	1,80	0,23	-1,25	0,953	174	0,12

* Вместо $\lg R$ использован параметр X .

** Вместо X использован параметр X_H .

4.1.2.8. СОВМЕСТНОЕ ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ И ТЕМПЕРАТУРЫ НА УДЕРЖИВАНИЕ

Существует определенная аналогия в действии температуры и концентрации органического компонента подвижной фазы на величины удерживания. Повышение как концентрации органического компонента, так и температуры ведет к уменьшению удерживания и некоторому уменьшению селективности разделения.

В работе [139] предложен простой способ расчета удерживания при произвольных концентрации органического модификатора и температуре на основе уравнений

$$\lg k'_{\Phi_1 s} = \lg k'_s - c(\Phi - \Phi_s); \quad (4.80)$$

$$\lg k' = \lg k'_{\Phi_1 s} - a \left(\frac{1}{T_s} - \frac{1}{T} \right) \quad (4.81)$$

$$a = d - e\Phi. \quad (4.82)$$

Порядок расчетов следующий. Находят:

— значение k'_s — коэффициент емкости при «стандартных» температуре T_s и объемной доле органического растворителя Φ_s ;

— значение коэффициента c по уравнению (4.80) исходя из k'_s и k' , измеренных при $\Phi \neq \Phi_s$, $T = T_s$;

— значение a по меньшей мере для двух значений Φ_1 пользуясь уравнением (4.81); по найденным величинам a рассчитывают коэффициенты d и e (уравнение (4.82));

— для значения k' при произвольных T и Φ сначала определяют $k'_{\Phi_1 s}$ по уравнению (4.80), затем по уравнению (4.82) находят a и, наконец, по (4.81) — коэффициент емкости.

В работе [293] предложена формула

$$\lg k' = A_1 \Phi \left(1 - \frac{T_c}{T} \right) + A_2/T + A_3, \quad (4.83)$$

где A_1, A_2, A_3 — коэффициенты; T_c — температура компенсации. Связь между величинами Φ и T для двух режимов анализа, приводящих к одинаковому удерживанию, устанавливает уравнение

$$T_2 = \frac{T_1(A_2 - A_1\Phi_2 T_c)}{T_1 A_1 \Phi_1 (1 - T_c/T_1) + A_2 - A_1 T_1 \Phi_2}. \quad (4.84)$$

В работе [300] для алкилбензолов найдены значения A_1, A_2, A_3 и показано, что эти коэффициенты линейно связаны с числом атомов углерода. Исследована зависимость значений A_1, A_2, A_3 от природы органического компонента подвижной фазы.

Совместное влияние структуры полиядерных ароматических углеводородов, температуры разделения и состава подвижной фазы на величины удерживания рассмотрено в работе [247] и положено в основу прогнозирования удерживания веществ этого класса с помощью ЭВМ. Погрешность априорного расчета k' почти для всех изученных веществ оказалась меньше 10%.

Сопоставление различных моделей удерживания с точки зрения совместной роли температуры и концентрации органического растворителя показало [297], что наибольший интервал значений Φ и T охватывает уравнение (4.83).

Приведенные в этом разделе уравнения (4.80) — (4.84), несомненно, представляют интерес в первую очередь как показатель современного уровня зрелости теории обращенно-фазовой хроматографии, и могут использоваться в работах по систематической оптимизации условий разделения. В то же время нахождение параметров этих моделей в каждом конкретном случае требует определенных затрат труда. Потому зачастую оценка совместного влияния этих двух факторов осуществляется чисто опытным путем или на основе простейших приближенных эмпирических правил. Одно из таких правил (для концентраций органического растворителя свыше 30%) может быть сформулировано так: повышение температуры разделения на 20° вызывает такое же уменьшение удерживания, как увеличение концентрации органического растворителя на 15% от первоначальной величины.

4.2. ХРОМАТОГРАФИЯ НА СИЛИКАГЕЛЕ

4.2.1. МЕХАНИЗМ УДЕРЖИВАНИЯ

В нормально-фазовой хроматографии на силикагеле используются подвижные фазы, обладающие значительно меньшей полярностью, чем поверхность адсорбента. Полярность сорбатов, анализируемых в этом режиме, является промежуточной между полярностью подвижной и неподвижной фаз. Удерживание определяется сложной гаммой взаимодействий между молекулами сорбатов, поверхности адсорбента и подвижной фазы. Поверхность адсорбента, находящегося в равновесии с подвижной фазой, всегда покрыта более или менее прочно связанным адсорбционным слоем. Если подвижная фаза содержит два или более компонентов, то состав адсорбционного слоя отличается от состава подвижной фазы. Адсорбция анализируемой молекулы может происходить с вытеснением одной или нескольких молекул адсорбированного слоя или без него. Взаимодействие молекул сорбатов с адсорбционными слоями и поверхностью твердого адсорбента, собственно, и служит предметом теоретических исследований в области нормально-фазовой хроматографии. В результате этих исследований выдвинут ряд моделей удерживания, наиболее популярные из которых рассматриваются ниже. Модель Снайдера [367] предполагает, что однородная поверхность сорбента полностью покрыта либо молекулами подвижной фазы S , либо молекулами анализируемого вещества X . Сорбция в этом случае может быть описана уравнением

$$X_m + nS_a \leftrightarrow X_a + nS_m, \quad (4.85)$$

где $n=A_s/A_l$ — отношение площадей молекул сорбата X и растворителя S . Индексы m и a относятся к подвижной и адсорбированной фазам соответственно. Следовательно, при адсорбции одной молекулы X в подвижную фазу вытесняется n молекул растворителя S . Отношение коэффициентов емкости данного сорбата, полученного в двух подвижных фазах различной силы (ε_1 и ε_2), выражается соотношением

$$\lg(k'_2/k'_1) = \alpha' A_s (\varepsilon_1 - \varepsilon_2), \quad (4.86)$$

где α' — параметр активности сорбента. Элюирующая сила бинарного растворителя ε_{AB} может быть найдена по формуле

$$\varepsilon_{AB} = \varepsilon_A + \frac{\lg(N_B 10^{n_B(\varepsilon_B - \varepsilon_A)} + 1 - N_B)}{\alpha' n_B}, \quad (4.87)$$

где ε_A и ε_B — значения ε° для чистых растворителей A и B ; N_B — мольная доля растворителя B в подвижной фазе.

По Снайдеру, зависимость удерживания от состава бинарной подвижной фазы выражается уравнением

$$\lg k' = a - n \lg N_B, \quad (4.88)$$

где $n=A_s/n_B$ — отношение площадей молекул сорбата X и более сильного компонента подвижной фазы. Таким образом, модель Снайдера рассматривает адсорбцию как неспецифический процесс на однородной поверхности.

Модель Сочевиньского [378] в отличие от модели Снайдера предполагает, что поверхность сорбента не однородна, а состоит из дискретных активных центров, между которыми расположены менее активные участки. Адсорбция происходит на активных центрах, при этом с участием функциональной группы сорбата с сорбентом образуются адсорбированные комплексы состава 1:1. Влияние состава бинарной подвижной фазы на удерживание описывается тем же уравнением, что в теории Снайдера:

$$\lg k' = a - n' \lg N_B. \quad (4.89)$$

Исходная концепция предполагала, что, поскольку адсорбция одной молекулы происходит на одном центре, значение $n'=1$. В ходе дальнейших исследований этой школы [379] выяснилось, что величина n' может довольно значительно отличаться от единицы в обе стороны, т. е. истинная стехиометрия вытеснения молекул растворителя с поверхности сорбента отличается от постулированного первоначально отношения 1:1.

Таким образом, единственная разница между двумя моделями заключается в физическом смысле углового коэффициента уравнений (4.88) и (4.89). По Снайдеру, это, отношение площадей молекул сорбата и сильного компонента подвижной фазы, по Сочевиньскому — число активных

центров сорбента, участвующих в адсорбции одной молекулы сорбата. Поскольку обе модели предполагают, что сорбент полностью покрыт (по Снайдеру — вся поверхность, по Сочевиньскому — все центры) адсорбированным слоем, то возможна и общая для обеих моделей формулировка физического смысла n и n' : как число молекул подвижной фазы, вытесняемое при сорбции одной молекулой хроматографируемого вещества.

Модель Скотта—Кучеры [346—348, 350, 351] основана на полученных данных о строении поверхности силикагеля. Последняя, согласно этой модели, покрыта рядом молекулярных слоев, строение которых определяет сорбционную активность.

Первый слой состоит из поверхностных силанольных групп. На них располагается второй слой — вода, связанная с силанолами водородными связями. Эти связи довольно прочны, поэтому первый слой воды растворителями не удаляется, его можно удалить лишь при нагревании сорбента до 200—650^oC. Следующий слой состоит из более слабо связанной воды, он уже может быть удален сухими растворителями (и восстановлен пропусканием через колонку влажных растворителей). Наконец, четвертый слой связан наименее прочно и может состоять из молекул воды либо полярного компонента подвижной фазы.

В зависимости от полярности сорбата возможны следующие схемы взаимодействия с сорбентом:

- замещение молекул подвижной фазы в наружном слое (для наименее полярных сорбатов);
- ассоциация с адсорбционным слоем;
- ассоциация с замещением молекул воды в адсорбционном слое (для наиболее полярных сорбатов).

Согласно модели Скотта—Кучеры, взаимодействия сорбат— сорбент играют существенную роль только при небольших концентрациях полярного растворителя, пока не завершена дезактивация им сорбента. При дальнейшем увеличении концентрации полярного растворителя (примерно свыше 2%) удерживание продолжает уменьшаться, но уже за счет нарастания межмолекулярных взаимодействий в подвижной фазе. В соответствии с этой теорией зависимость удерживания от состава подвижной фазы выражается уравнением

$$\frac{1}{k'} = A' + B' C_p, \quad (4.90)$$

где A' , B' — константы; C_p — концентрация полярного растворителя в подвижной фазе. Авторами получены обширные экспериментальные данные, подчиняющиеся выражению (4.90). Однако, как указано в [376], аналогичное соотношение при определенных условиях может быть выведено также из моделей Снайдера—Сочевиньского, так что подчинение экспериментальных данных (4.90) не может служить решающим доводом в пользу модели Скотта—Кучеры.

В работе [359] было проведено раздельное исследование процессов в неподвижной и подвижной фазах. Установлено, что оба типа взаимодействий вносят существенный вклад в удерживание. При малых концентрациях полярного растворителя в подвижной фазе на поверхности доминирует конкурирующая сорбция. Если же концентрация полярного растворителя больше некоторого предела, становится возможным проникновение анализируемых молекул в адсорбированную фазу без вытеснения ее компонентов в элюент. Детально модели Снайдера—Сочевиньского и Скотта—Кучеры сопоставлены в работе [376]. Авторы всесторонне доказывают, что первая из моделей лучше соответствует реальным физическим процессам, хотя исходная модель Снайдера и не свободна от противоречий. Главные из них связаны с тем обстоятельством, что поверхность силикагеля в большинстве случаев неоднородна. Поэтому при сорбции молекулы не могут занимать произвольные положения на поверхности. Существует определенное количество центров, на которых сорбция статистически более вероятна, т. е. происходит локализация. Развитие теории Снайдера, учитывающее это явление, дано в работах [370, 373, 374].

Единая теория удерживания и селективности развита в работе [73]. Неподвижная фаза рассматривается как монослой полярного растворителя на плоской поверхности адсорбента. Одновременно указывается, что полярный растворитель способен насыщать более отдаленные слои и в таких случаях неподвижная фаза может быть лучше описана как однокомпонентный растворитель, а сорбция — как распределение жидкость—жидкость. Предложена также более общая модель хроматографии со смешанными подвижными фазами, рассматривающая процесс

одновременно как вытеснительно-адсорбционный и распределительный [240]. Вопросам идеальности подвижной и неподвижной фаз, эффектам ассоциации посвящены работы [76, 239]. Невзирая на различие трактовки механизма хроматографии на силикагеле, представленных в работах [73, 76, 239, 240, 346—348, 350, 351, 359, 367, 370, 373, 374, 376, 378, 379], все авторы единодушно признают, что важнейшим процессом, который определяет величины удерживания, является формирование из молекул подвижной фазы адсорбционных приповерхностных слоев. Независимо от того, каким образом, в каких стехиометрических соотношениях и как глубоко проникают молекулы разделяемых веществ в адсорбированную фазу, ясно, что строение ее представляет большой интерес.

Особое внимание в литературе обращается на проблему стандартизации влажности силикагеля. Безоговорочное мнение о том, что при работе с силикагелем необходимо очень тщательно контролировать влажность растворителей, кочует по страницам учебников по жидкостной хроматографии. Между тем по этому поводу следует сделать весьма значимое уточнение, а именно: влажность растворителей и силикагеля существенна только тогда, когда подвижная фаза содержит малое количество (например, менее 11%) полярного растворителя. Пользуясь моделью поверхности, предложенной Скоттом и Кучерой, можно утверждать, что все проблемы в отношении влажности исключаются, если содержание воды в подвижной фазе достаточно для образования стабильной адсорбированной фазы, состоящей из двух-трех слоев молекул.

Большинство сорбатов, исследуемых на силикагеле, представляют собой вещества значительной полярности. Для их хроматографирования, а иногда даже просто для растворения необходимы элюенты, содержащие заметные количества полярных растворителей. Такие элюенты всегда содержат также и воду в количествах, вполне достаточных для формирования устойчивых адсорбированных слоев, полного насыщения поверхности. В работе [393] исследовано влияние воды, растворенной в подвижных фазах — хлороформе и дихлорэтане, на удерживание ацетофенона, диметилфталата, диэтилфталата. При содержании воды около 600 частей на 1 млн достигается почти полное насыщение сорбента, и при дальнейшем увеличении концентрации воды удерживание больше почти не меняется.

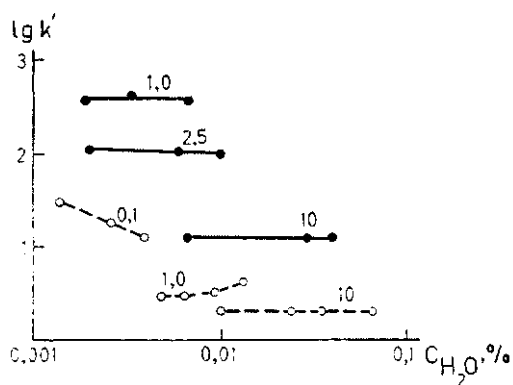


Рис. 4.22. Зависимость коэффициентов емкости нитробензола на силикагеле от влажности подвижной фазы, содержащей в качестве полярного компонента бутанол (— — —) и этилацетат (— — —). Цифрами на кривых обозначена концентрация полярного органического растворителя.

Модель, количественно описывающая роль воды в хроматографии на силикагеле, представлена в работе [381]. По данным работы [180], с увеличением концентрации полярных растворителей в подвижной фазе влияние воды становится все менее ощутимым (рис. 4.22). При концентрациях полярных растворителей 1% и более влиянием воды на удерживание можно пренебречь, если работа носит прикладной, аналитический характер и не ставит целью строгое измерение физико-химических параметров. Насыщение элюента водой положительно влияет на хроматографическое поведение полярных соединений. Так, отмечается улучшение эффективности и формы хроматографических пиков, увеличение максимально допустимой нагрузки на колонку в области линейной изотермы адсорбции Ленгмюра [375, с. 374]. Показано, что добавка к подвижной фазе 0,45% воды существенно улучшает форму пиков таких трудных для хроматографии соединений, как производные дезоксирибонуклеотидов [186].

Помимо модифицирования сорбента водой при его контакте с бинарной подвижной фазой образуется также слой (приблизительно мономолекулярный) из молекул полярного растворителя. В работе [350] представлены изотермы сорбции бутил-хлорида, тетрагидрофурана, этилацетата, изопропилового спирта. Они имеют характерную ленгмюровскую форму. Максимальная

концентрация полярного растворителя составляет около 100 мг/г силикагеля и слабо зависит от типа растворителя. В то же время концентрация полярного растворителя в подвижной фазе, при которой наблюдается насыщение поверхности, увеличивается с уменьшением элюирующей силы и составляет для изопропилового спирта, тетрагидрофурана, этилацетата и бутилхлорида 1, 10, 15 и 30% соответственно. Интересны также данные о взаимном вытеснении полярных растворителей. Например, при концентрации в подвижной фазе изопропилового спирта, равной 1%, и этилацетата, равной 0,5%, адсорбированная фаза содержит 120 мг/г первого и только 10 мг/г второго.

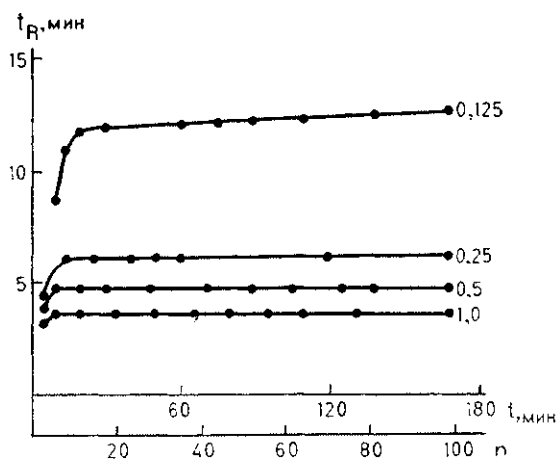


Рис. 4.23. Стабилизация времени удерживания ацетофенона на Зорбаксе SIL подвижными фазами, состоящими из гексана и пропанола-2, концентрация которого (%) указана на кривых; t — время после перехода на новый состав подвижной фазы; n — отношение объема подвижной фазы нового состава к объему колонки.

В литературе часто можно встретить с утверждением, что уравнивание силикагеля подвижной фазой требует пропускания через колонку значительных ее объемов, прежде чем будет достигнута стабильность времен удерживания. Из-за этого существенного недостатка рекомендуется предпочтительное использование обращенно-фазовых систем. По нашему мнению, утверждение о медленной стабилизации режима на силикагеле сильно преувеличено. Если только подвижная фаза содержит достаточное количество полярных компонентов для образования адсорбированной фазы, силикагель уравнивается так же быстро, как химически модифицированные сорбенты. Бинарные элюенты, содержащие свыше 1% полярного растворителя, почти всегда удовлетворяют этому условию.

В качестве критерия установления стационарного режима в колонке может использоваться стабильность времен удерживания. На рис. 4.23 представлены кривые, свидетельствующие о том, что при использовании бинарных смесей гексана с пропанолом-2 уравнивание колонки подвижной фазой измененного состава требует пропускания всего 40 мл при объеме колонки 4,2 мл. Опасения относительно продолжительности стабилизации режима обоснованы лишь в случае, если концентрация пропанола-2 становится меньше 0,25%.

4.2.2. СОСТАВ ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ И УДЕРЖИВАНИЕ

Лекарственные вещества, как правило, высокополярны, и при их хроматографии на силикагеле применяют элюенты, содержащие значительные количества полярных компонентов; поэтому влиянием влажности подвижных фаз на удерживание можно пренебречь. Именно такой подход использован во множестве экспериментальных исследований, целью которых была систематизация величин удерживания и выбор оптимального состава подвижной фазы. Общим правилом в нормально-фазовой хроматографии является уменьшение удерживания при увеличении концентрации полярного компонента подвижной фазы. Этот эффект описывается разными авторами с помощью уравнений (4.88) — (4.90).

В цикле работ Хары с сотр. [180, 181, 187—189] изучалось хроматографическое поведение стероидов. На примере самых разнообразных систем растворителей показано, что уравнение (4.88) выполняется со вполне удовлетворительной точностью. Интересно отметить, что во многих случаях прямые $\lg k' - \lg C$ располагались веерообразно, как в обращенно-фазовой хроматографии.

Авторами предложен способ расчета эквивалентных систем растворителей. Если в двух бинарных системах уравнение (4.89) выполняется достаточно точно и для них известны значения коэффициентов a_1, n'_1, a_2, n'_2 , можно рассчитать концентрацию растворителя B_2 , который будет иметь ту же элюирующую силу, что и элюент, содержащий полярный растворитель B_1 :

$$\lg N_{B_2} = \frac{a_1 - a_2}{n'_1} + \frac{n'_2}{n'_1} \lg N_{B_1}. \quad (4.91)$$

В работе [206] в системе Лихросорб Si60 — гексан — этилацетат исследовано поведение производных 1,2,4-триазола (рис. 4.24). Установлено, что удерживание всех представленных соединений закономерно уменьшается с ростом полярности бинарной подвижной фазы.

Уравнение (4.89) использовано в работе [333] для интерпретации геометрии адсорбции азотсодержащих гетероциклов на Порасиле. Полярным растворителем служил диметилсульфоксид. Найденные величины n' сравнивали с расчетными параметрами для параллельного и перпендикулярного расположения молекул сорбатов по отношению к поверхности силикагеля. Полученные данные указывают на то, что молекулы сорбатов ориентированы преимущественно перпендикулярно поверхности сорбента.

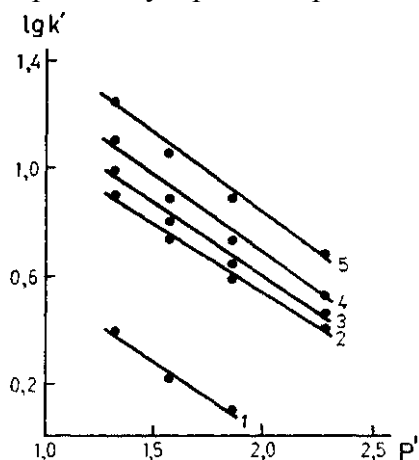


Рис. 4.24. Зависимость удерживания производных 1,2,4-триазола на силикагеле от полярности P' бинарной подвижной фазы гексан—этилацетат: 1 — триадимефон; 2 — диклобутразол; 3 — наклобутразол; 4 — триадименол; 5 — триадименол В

К хроматографии на силикагеле можно применить подход Мураками [307], использованный нами при интерпретации данных обращенно-фазовой хроматографии. При этом коэффициент уравнения (4.52), представляющий собой логарифм коэффициента емкости при концентрации сильного компонента подвижной фазы 1 моль/л, может быть выражен в терминах модели Снайдера:

$$b = \lg k'_A + \alpha A_s (\epsilon_A - \epsilon_1), \quad (4.92)$$

где ϵ_1 — элюирующая сила подвижной фазы, содержащей 1 моль/л компонента B . С другой стороны, в первом приближении Снайдера величина $\lg k'_A$ может быть представлена в следующем виде [367]:

$$\lg k'_A = \lg \frac{V_A W}{V_m} + S^\circ - \epsilon_A A_s, \quad (4.93)$$

где V_A — объем адсорбированного монослоя компонента B ; V_m — объем подвижной фазы в колонке; W — масса сорбента в колонке; S° — член, характеризующий энергию взаимодействия сорбат—сорбент.

Предположим, что в рамках данного ряда соединений энергия взаимодействия полярных групп сорбатов с сорбентом относительно постоянна. Тогда, обозначив

$$D = \lg \frac{V_A W}{V_m} + S^\circ$$

и подставив (4.93) в (4.92), получим

$$b = D + A_s [\alpha' (\epsilon_A - \epsilon_1) - \epsilon_A]. \quad (4.94)$$

Вытеснительный механизм сорбции предполагает, что параметр p уравнения (4.52) может быть выражен как

$$p = A_s / n_B \quad (4.95)$$

где n_B — площадь поперечного сечения молекулы компонента B . Из (4.94) и (4.95) может быть получено соотношение

$$b = D + pn_B[\alpha'(\epsilon_A - \epsilon_1) - \epsilon_A], \quad (4.96)$$

идентичное по форме уравнению (4.55).

В уравнение (4.96) не входят переменные, связанные с различием свойств сорбатов данного множества, и, таким образом, ясно, что в пределах справедливости сделанных допущений уравнение (4.55) должно выполняться не только в обращенно-фазовой хроматографии, но и в хроматографии на полярных неподвижных фазах. Параметр

$$b_0 = D = \lg \frac{V_A W}{V_m} + S^\circ \quad (4.97)$$

является характеристикой хроматографической колонки и энергии взаимодействия данного класса веществ с данным сорбентом. В свою очередь,

$$b_1 = n_B[\alpha'(\epsilon_A - \epsilon_1) - \epsilon_A], \quad (4.98)$$

Этот член далее может быть выражен через свойства чистых компонентов подвижной фазы *A* и *B*:

$$b_1 = -\lg N_B(10^{\alpha' n_B(\epsilon_B - \epsilon_A)} + 1 - N_B) - \epsilon_A n_B, \quad (4.99)$$

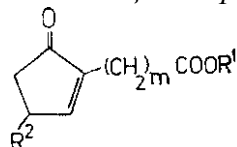
где N_B — мольная доля компонента *B* при его концентрации 1 моль/л.

Из физического смысла коэффициента b_1 следует, что при постоянстве активности сорбента величина b_1 должна уменьшаться с ростом элюирующей силы растворителя *B*. С другой стороны, величина b_0 должна быть приблизительно постоянной в рамках таких групп соединений, где сорбция обусловлена взаимодействием одной и той же функциональной группы с активным центром сорбента. Наоборот, в группах веществ различной химической природы величина b_0 должна быть различной, в то время как b_1 — сохранять относительное постоянство.

Для проверки этих предположений нами было изучено поведение производных циклопентенона (табл. 4.26), полиядерных ароматических углеводов (табл. 4.27). Кроме того, в координатах уравнения (4.52) переработаны 248 массивов данных по удерживанию, взятых из литературы [181, 185, 189, 318, 395, 429]. Перечень рассмотренных классов соединений и краткая характеристика условий исследования представлены в табл. 4.28.

Таблица 4.26

Параметры уравнений (4.52) для производных общей Формулы



Сорбент — силикагель Силасорб 600;

подвижная фаза — гексан — пропанол-2 — уксусная кислота

R^1	R^2	m	b	-P	r	b^*	-p*
C ₂ H ₅	H	6	0,372	0,506	0,977	4,56	3,91
H	H	6	0,877	1,054	0,992	2,74	2,82
H	H	4	1,130	1,433	0,978	1,79	2,17
H	H	2	1,334	1,609	0,989	0,76	1,34
H	OH	6	1,592	2,114	0,995	1,36	1,83

* Сорбент — Зорбакс ODS; подвижная фаза — вода—ацетонитрил-фосфорная кислота.

Таблица 4.27

Параметры уравнений (4.52) для некоторых производных полиядерных ароматических углеводородов на Силасорбе 600. Неполярный растворитель — гексан [15]

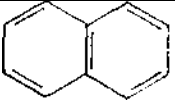
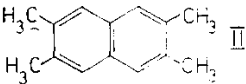
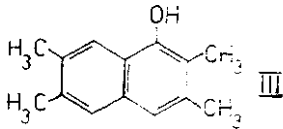
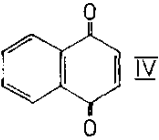
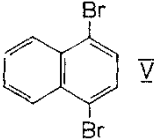
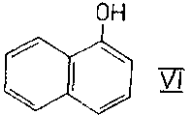
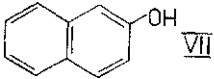
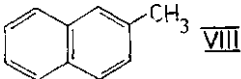
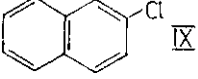
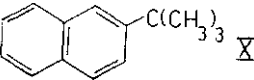
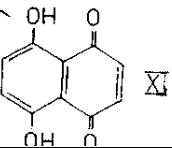
Соединение	Полярный растворитель			
	хлороформ		тетрагидрофуран	
	<i>b</i>	<i>-p</i>	<i>b</i>	<i>-p</i>
1	2	3	4	5
 I	-0,96	0,52		
 II	-1,15	0,86		
 III	0,66	1,17		
 IV	0,62	1,32		
 V	-1,26	0,56		
 VI	1,35	1,33		
 VII	1,58	1,30		
 VIII	-1,03	0,58		
 IX	-1,00	0,52		
 X	-0,43	0,88		
 XI	0,43	1,38		

Таблица 4.28

Параметры уравнений (4.55)

Класс соединений	Сорбент	Компонент элюента		$-b_0$	$-b_1$	n^*	r	Литера-тура**
		ненолярный	полярный					
Стероиды	Лихросорб Si60	Бензол	Эфир	1,81	2,03	13	0,99	318
			Этил ацетат	1,97	1,98	13	0,98	318
			Метилацетат	1,90	1,83	13	0,99	318
			Хлороформ	1,55	2,52	13	0,98	318
			Диоксан	1,80	1,43	13	0,99	318
			Пропанол	1,29	1,22	13	0,99	318
			Метилэтилкетон	2,05	1,83	13	0,99	318
			Ацетон	1,83	1,59	13	0,99	318
3- и 17-замещенные андростаны	Силикагель	Гексан	Ацетон	1,30	0,96	8	0,91	185
			Пропанол-2	1,47	1,15	4	0,98	185
		Бензол	Этилацетат	4,51	4,48	6	0,97	185
			Пропанол-2	1,09	1,78	6	0,91	185
3-, 7-замещенные андростаны	Силикагель	Бензол	Эфир	3,08	2,26	8	0,91	185
			Этилацетат	3,72	2,36	8	0,95	185
			Ацетон	1,60	1,23	8	0,99	185
			Пропанол-2	0,88	0,92	8	0,96	185
Индольные алколоиды	Силикагель	Гексан	Тётрагидрофуран	0,101	0,97	6	0,99	189
Стероиды	Силикагель	Гексан	Эфир	1,97	1,86	12	0,96	181
			Этилацетат	1,90	1,39	12	0,97	181
			Ацетон	1,05	1,01	12	0,90	181
Азосоединения	Оксид алюминия	Гептан	Этилацетат	1,49	1,60	13	0,96	429***
Производные 1,4-бензодиазепина	Полиамид	Гептан	Ацетон	0,93	1,19	7	0,92	395***
			Этилацетат	2,53	2,02	6	0,99	395***

* число соединений.

** Откуда позаимствованы величины удерживания

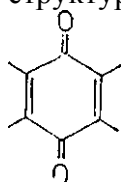
*** Величины R_M тонкослойной хроматографии переработаны аналогично $\lg k'$.

На рис. 4.25 показано, как часто среди исследованных нами 299 массивов $\lg k' - \lg C$ встречались те или иные значения p . Чаще всего величина — p при хроматографии на силикагеле близка к единице, и второй максимум, менее интенсивный, приходится на значение $p = -2$. Размеры молекул соединений, представленных в табл. 4.26—4.28, в несколько раз превышают размеры молекул полярных растворителей.

Следовательно, с точки зрения исходной гипотезы Снайдера значения n (а также n' и мало отличающихся по численным значениям p) должны меняться для сорбатов различных размеров в довольно широких пределах. Это, однако, не подтверждается экспериментальными данными. Согласно данным табл. 4.27, величину параметра p определяет не столько размер молекул сорбатов, сколько полярность его функциональных групп. Таким образом, имеющиеся данные позволяют для большинства сорбатов отвергнуть гипотезу об адсорбции параллельно однородной поверхности силикагеля. Значительно более вероятной представляется локализованная на

дискретных центрах адсорбция с «перпендикулярным» по отношению к поверхности расположением молекул сорбатов. При этом наиболее предпочтительное стехиометрическое отношение в процессе сорбции (даже полифункциональных соединений) 1:1. Адсорбция на 2 центрах одновременно представляется значительно менее вероятной.

Величины поверхности сорбатов в табл. 4.27 заметно превышают аналогичные величины для использованных полярных растворителей — тетрагидрофурана и хлороформа. Следовательно, с точки зрения концепции Снайдера значения $p=A_S/n_B$ по абсолютной величине должны быть намного больше, чем оказалось в действительности. В этом массиве данных значения p приближались к 2 только для соединений со структурным фрагментом



в которых возможность ассоциации с сорбентом не была ослаблена внутримолекулярными взаимодействиями. Сравнение величин p для двух антрахинонов и высших полиядерных хинонов еще раз подтверждает, что размер молекулы сорбата как таковой не определяет чувствительность величин удерживания к составу подвижной фазы.

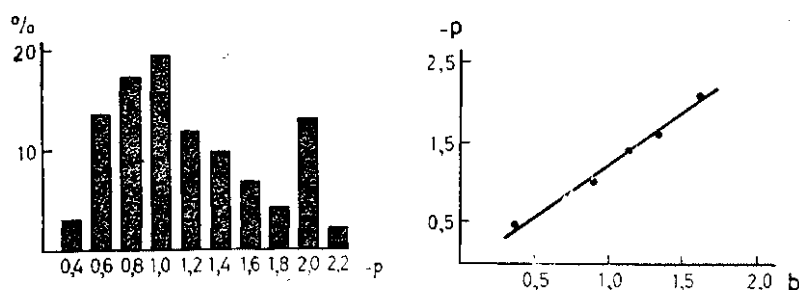


Рис. 4.25. Распределение значений параметра p для 299 массивов данных $\lg k' - \lg C$.

Рис. 4.26. Зависимость между параметрами b и p уравнения (4.55) для производных циклопентенона на силикагеле Зорбакс SIL. Подвижная фаза — пропанол-2—гексан—уксусная кислота.

Рассмотрим зависимость между коэффициентами b и p . Эти параметры при хроматографии на силикагеле оказались сравнительно мало чувствительными к строению сорбатов. Значит, для того чтобы надежно зафиксировать или отвергнуть существование зависимости (4.55), исходные величины удерживания и производные от них b и p должны быть найдены с высокой точностью, и диапазон их изменения в рассматриваемом массиве данных должен быть достаточно велик. На рис. 4.26 представлены такие зависимости для групп веществ, описанных в табл. 4.26. Корреляция между этими величинами видна отчетливо.

Аналогичные данные получены нами при обработке опубликованных в литературе величин удерживания (см. табл. 4.28). В условиях обращенно-фазовой хроматографии закономерность (4.55) универсальна, и ей подчиняются практически все классы соединений. При хроматографии на силикагеле корреляция между b и p и соответствующее ей веерообразное расположение прямых $\lg k' - \lg C$ также довольно характерны. Однако в этом случае мы обнаружили, что многие из опубликованных в литературе массивов данных не подчиняются закономерности (4.55). Такое положение объясняется по меньшей мере двумя причинами. Одна из них — физико-химическая, а именно: механизм сорбции на силикагеле значительно сложнее, чем в режиме обращенно-фазовой хроматографии. Энергетические и стерические факторы здесь играют более существенную роль, благодаря чему селективность разделения на силикагеле близких по строению сорбатов в целом намного выше. Это же обстоятельство приводит к различной чувствительности сорбатов к составу подвижной фазы, и в результате уравнения (4.52) и (4.55) оказываются справедливыми не всегда. Вторая причина носит статистический характер и

заключается в том, что диапазон изменений b и p на силикагеле невелик, и поэтому точность их измерения часто недостаточна для достоверной констатации зависимости (4.55).

В настоящее время еще отсутствует нужное количество данных, чтобы выявить закономерности изменения параметров b_0 и b_1 в зависимости от характера изучаемых сорбатов и условий эксперимента. Можно отметить лишь некоторые явления, замеченные при подготовке табл. 4.28. Неподчинение величин b и p уравнению (4.55) наблюдалось нами чаще всего тогда, когда подвижная фаза состояла из двух близких по элюирующей силе растворителей. Такая ситуация рассмотрена в работе [185], где в качестве менее полярного растворителя использовали метилхлорид. Вероятно, в этом случае приповерхностный слой содержит в сопоставимых количествах оба компонента подвижной фазы, потому процессы вытеснения не могут быть описаны обсуждаемой моделью.

Анализ приведенных в табл. 4.28 значений b_0 и b_1 показывает, что некоторые тенденции их изменения, вытекающие из обсуждаемой модели, действительно имеют место. Так, величина b_1 , найденная по данным одной и той же работы, отчетливо уменьшается с увеличением элюирующей силы полярного растворителя. Иногда параметры b_1 , найденные по данным разных работ, оказываются близкими.

Более детальный анализ зависимости (4.55) пока не представляется возможным, и дальнейшие исследования в этом направлении, несомненно, потребуют проведения целенаправленных систематических экспериментов. В то же время, по нашему мнению, уравнения (4.52) и (4.55) относятся к числу наиболее общих закономерностей жидкостной хроматографии с бинарными подвижными фазами. Они должны соблюдаться во всех системах, где определенные множества сорбатов взаимодействуют с поверхностью по одному и тому же вытеснительному механизму. Подобное явление наблюдается и при хроматографии на полярных химически связанных неподвижных фазах. В качестве дополнительных примеров, подтверждающих сказанное, мы включили в табл. 4.28 также данные, полученные в условиях тонкослойной хроматографии на окиси алюминия и полиамидном сорбенте.

Таблица 4,29

Элюирующая сила (ϵ^0) бинарных смесей полярных растворителей с гексаном. Сорбент — силикагель [374]

Полярный растворитель	Мольная доля полярного растворителя									
	0	0,005	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2	0,5	0,7	1,0
Диэтиловый эфир					0,22	0,25	0,28	0,31	0,35	0,41
Этилацетат				0,18	0,23	0,27	0,32	0,36	0,44	0,50
Тетрагидрофуран							0,33	0,40	0,48	0,51
Диоксан						0,30	0,34	0,38	0,48	0,52
Пропанол-2	0,27	0,29	0,31	0,33	0,36	0,41	0,46			

Разумеется, при хроматографии на силикагеле, как и при обращекно-фазовой хроматографии, не все задачи могут быть решены с помощью лишь одной пары растворителей. Выбор полярных растворителей, пригодных для нормально-фазовых разделений, вообще говоря, довольно широк, и комбинации двух или большего числа сильных компонентов подвижной фазы используются значительно чаще. Тактика оптимизации состава подвижной фазы с точки зрения селективности и в этом случае основывается на описании свойств растворителя с помощью «треугольника селективности» либо других систем, характеризующих способность к межмолекулярным взаимодействиям различных типов.

При решении вопросов оптимизации часто возникает необходимость соотнесения силы бинарных систем, содержащих различные полярные растворители. Теоретические вопросы оценки силы и селективности бинарных элюентов детально рассмотрены в работах [183, 372, 374, 375], вопросы выбора подвижных фаз более сложного состава — в [153, 155, 184]. Для практической оценки элюирующей силы бинарных; подвижных фаз могут оказаться полезными данные табл. 4. 29.

4.2.3. СТРОЕНИЕ СОРБАТОВ И УДЕРЖИВАНИЕ

В нормально-фазовой хроматографии на силикагеле невозможно выделить какое-либо одно свойство сорбатов, которое бы определяло прочность их ассоциации с подвижной фазой и величины удерживания. В самом общем виде принцип, по которому можно оценить удерживание, гласит, что более полярные соединения удерживаются сильнее, чем менее полярные. Однако и сам термин «полярность» в применении к хроматографическим процессам неоднозначен, так как охватывает разнообразные типы межмолекулярных взаимодействий, а способность конкретных сорбатов и компонентов системы к этим взаимодействиям может быть различной. В связи с этим в нормально-фазовой хроматографии пока не удалось выработать сколько-нибудь общие модели удерживания и проблема прогнозирования и интерпретации коэффициентов емкости значительно сложнее, чем в обращенно-фазовом режиме. Попытки моделирования связи структуры и хроматографического поведения, как правило, более или менее успешны, если в рамках рассматриваемого множества сорбатов все факторы, определяющие сорбционное равновесие, кроме одного, сохраняют постоянство. Классификация структурных факторов, которые находят свое отражение в величинах удерживания, дана в [12]. Это:

- соотношение полярных и неполярных структурных фрагментов в молекулах сорбатов;
- распределение электронной плотности;
- геометрическое строение;
- внутримолекулярные взаимодействия;
- экранирование полярных функциональных групп.

В зависимости от характера рассматриваемого класса соединений исследователь обычно выбирает тот или иной путь моделирования связи удерживания со строением.

Рассмотрим влияние на коэффициенты емкости простейшего фактора — числа атомов углерода. По мнению многих исследователей, при хроматографии на силикагеле трудно добиться разделения гомологов. Действительно, для этой цели лучше применять обращенно-фазовую хроматографию. Однако и при хроматографии на силикагеле положение совершенно небезнадёжно, особенно если рассматриваемые гомологи обладают достаточной полярностью. Цветковским [32] показано, что в режиме адсорбционной хроматографии при росте размеров сорбционно неактивного фрагмента должно происходить уменьшение удерживания и выполняться уравнение, аналогичное (4.23). Это подтверждено также измерениями lgk' олигобутадиенмоно-олов. В литературе имеется еще целый ряд примеров подобного рода. Так, в [12, с. 199] представлено разделение алкилбензолов на силикагеле КСС-4. Инкремент величины lgk' , соответствующий метиленовой группе, составляет около 0,04, что равнозначно относительному удерживанию гомологов $a = 0,91$. Следовательно, эти гомологи могут быть разделены на достаточно эффективных колонках. В то время как удлинение алкильной цепи вызывает уменьшение удерживания, введение дополнительных метальных заместителей в ядро бензола приводит к возрастанию k' и в ряду бензол—толуол—...—гексаметилбензол lgk' возрастает примерно на 0,1 при добавлении каждой следующей метильной группы. В работе [267] показано, что эта закономерность соблюдается для алкилбензолов различных гомологических рядов.

Согласно работе [421], при введении метильных заместителей в молекулу адамантола наблюдается линейная зависимость (4.24). Угловой коэффициент b зависит от взаимного положения метильных заместителей и гидроксильных групп, принимая максимальное значение в случае α -замещения. При изучении удерживания адамантанов и других циклических кетонов выявлено [422], что lgk' убывают закономерно с увеличением числа атомов углерода в цикле от циклопентанона до диамтанона ($n_c=14$). Аналогичные зависимости получены нами при изучении удерживания гомологического ряда 2-карбоксивалерьянол-2-онов-1, а также w -нор- и гомоаналогов 11-дезоксипростагландин E_I (рис. 4.27 и 4.28).

По-видимому, уже этого количества примеров достаточно для утверждения, что закономерность (4.23) для хроматографии на силикагеле не менее характерна, чем для обращенно-фазовой хроматографии.

Величины lgk' закономерно возрастают с увеличением числа конденсированных колец в производных полиядерных аренов [15]. Значения b и p уравнения (4.55) для родственных соеди-

нений в данном случае также подчиняются обсуждаемой закономерности (рис. 4.29). Вопросы аддитивности параметра n' (уравнение (4.89)) применительно к бифункциональным стероидам рассмотрены также в работе [185]. Для сложения вкладов в величину n' , соответствующих двум полярным функциональным группам n'_1 и n'_2 , предложено уравнение

$$n'_{1,2} = \gamma(n'_1 + n'_2), \quad (4.100)$$

где γ — коэффициент усреднения для бинарных растворителей гексан—бензол и гексан—метилхлорид, $\gamma \approx 0,7$.

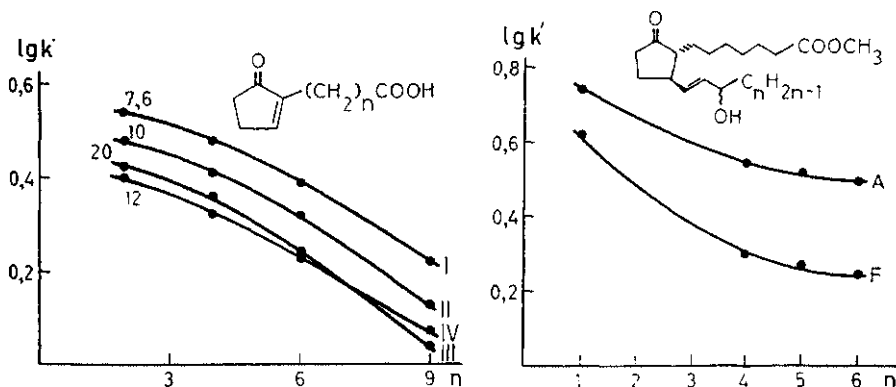


Рис. 4.27. Удерживание 2-карбоксииалкилциклопентен-2-онов-1. Сорбент — Силасорб 600, неполярный компонент подвижной фазы — гексан, полярные компонент — этанол (I), пропанол-2 (II), бутанол (III), диоксан (IV). Цифрами на кривых указана процентная концентрация полярного растворителя.

Рис. 4.28. Зависимость удерживания ω -нор- и гомоапалогоп метилового эфира 11-дезоксипроостагландина E_1 , от длины ω -цепи. А — α -изомер; Б — β -изомер. Сорбент — Силасорб 600, элюент — гексан—пропанол-2 (93:7).

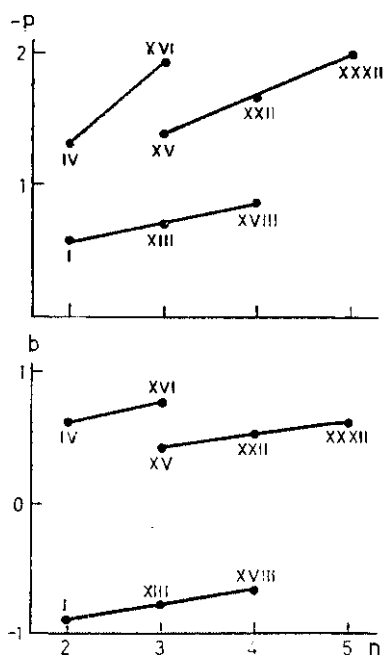


Рис. 4.29. Зависимость параметров b и p уравнения (4.52) от числа конденсированных колец в молекулах сорбатов. Цифры на прямых соответствуют нумерации соединений в табл. 4.27.

Несмотря на эти и некоторые другие отдельные удачные демонстрации принципов аддитивности, можно утверждать, что в целом аддитивность вкладов структурных фрагментов в удерживание соблюдается редко. Поэтому расчеты удерживания по уравнениям типа (4.23) не нашли при хроматографии на силикагеле широкого применения. В то же время концепция аддитивности может служить в отдельных случаях эффективным инструментом выявления внутримолекулярных эффектов. Так, в уже упоминавшемся исследовании производных полиядерных аренов нами выявлены инкременты параметра b (табл. 4.30). С их помощью для соединений, не использованных непосредственно при определении δb_i найдены значения $b_{расч}$. Эти значения

сопоставлены с $b_{\text{эксп}}$ в табл. 4.31. Видно, что типичная разность между расчетным и экспериментальным значениями не превышает 0,2. Следовательно, постоянство и аддитивность вкладов структурных фрагментов в целом соблюдаются. Ярко выраженное исключение составляют соединения с оксихиноновым фрагментом. В результате внутримолекулярного взаимодействия между гидроксилом и карбонилем резко уменьшается вероятность взаимодействия этих групп с сорбентом. Поэтому расчетное удерживание оказывается завышенным в 600 (!) раз по сравнению с экспериментальным в случае реализации одного внутримолекулярного взаимодействия и примерно в 160000 раз при возможности двух таких взаимодействий. Этот эффект не может остаться незамеченным экспериментатором, несмотря на невысокую точность аддитивного расчета.

Таблица 4.30

Средние вклады, структурных фрагментов в параметр b

Структурный фрагмент	δ_{bi}
Конденсированная система	$-1,10 + 0,07 n_1$, где n_1 — число колец
Алкильные заместители	$-0,03 n_2$, где n_2 — число атомов углерода
-Cl	-0,09
— Br	-0,15
Хинонная система	+ 1,40
—OH	+ 2,40
-OCH ₃	+ 0,53

Трудности аддитивных расчетов удерживания в известной мере можно обойти, используя простейший вариант аддитивного метода — метод сравнительных расчетов. Этот подход предусматривает использование инкрементов, которые соответствуют не вкладу отдельных групп в удерживание, а изменению величин удерживания в результате замены в молекуле сорбата одного структурного фрагмента другим. Вместо инкрементов $\delta \lg k'_i$ фрагмента i структуры вводятся инкременты $\delta \lg k'_{ij}$ соответствующие замене фрагмента i фрагментом j . Особенность таких расчетов заключается в выделении среди соединений данного множества прототипа, наиболее полно отражающего черты структуры, присущие всему классу. Удерживание любого другого аналога этого ряда описывается формулой

$$\lg k' = \lg k'_p + \sum \delta \lg k'_{g,p} \quad (4.101)$$

где k'_p — коэффициент емкости прототипа.

Таблица 4.31

Расчетные и экспериментальные значения параметра b

Соединение по табл. 4.27	$b_{\text{расч}}$	$b_{\text{эксп}}$	$b_{\text{расч}} - b_{\text{эксп}}$	Соединение по табл. 4.27	$b_{\text{расч}}$	$b_{\text{эксп}}$	$b_{\text{расч}} - b_{\text{эксп}}$
II	-1,08	-1,15	+0,07	XIX	-0,94	-0,79	-0,15
III	1,32	0,66	+0,66	XX	-1,18	-1,04	-0,14
IV	0,46	0,62	-0,16	XXII	0,58	0,50	4-0,08
VIII	-0,93	1,03	+0,10	XXIII	5,38	-0,11	+ 5,49
IX	-1,05	-1,00	-0,05	XXIV	0,40	0,40	0,00
XI	5,26	0,43	+4,83	XXVI	2,89	0,10	+ 2,79
XII	0,40	0,63	-0,23	XXVII	5,26	-0,10	+ 5,36
XIV	-1,07	-1,21	+0,14	XXVIII	5,91	0,15	+ 5,76
XV	0,51	0,43	+0,08	XXIX	-0,29	-0,28	-0,01
XVI	0,51	0,63	-0,12	XXX	5,26	-0,26	+ 5,52

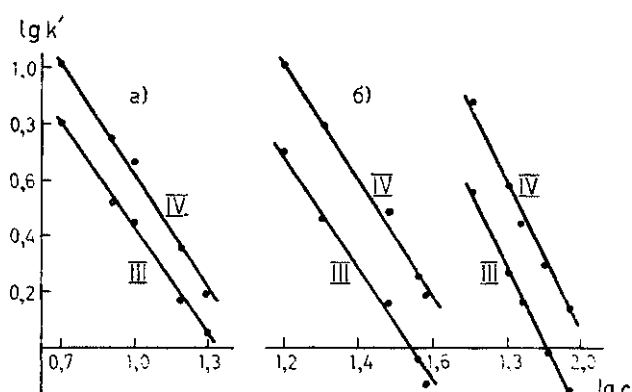
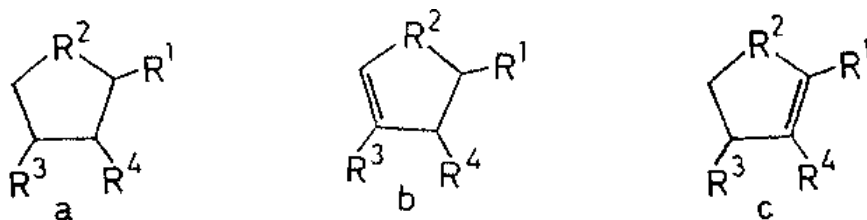


Рис. 4.30, Зависимость $\lg k'$ соединений III и IV (табл. 4.32) от концентрации полярного модификатора c : а — пропанол-2; б — диоксан; в — этилацетат.

Такой подход оказался довольно эффективным при исследовании поведения производных цикlopentanона — полупродуктов синтеза простагландинов [24]. Структура изученных соединений приведена в табл. 4.32.

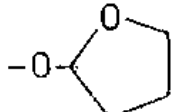
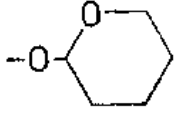
Для определения возможности применения уравнения (4.101) к подвижным фазам различной элюирующей силы были исследованы зависимости удерживания от концентрации полярного модификатора, аналогичные (4.52). На рис. 4.30 представлены примеры таких зависимостей для пары соединений, различающихся только одним структурным фрагментом. В рассматриваемом диапазоне C прямые $\lg k' - \lg C$ можно считать параллельными, и, следовательно, значения $\delta \lg k'_{i,j}$ мало зависят от концентрации полярного модификатора, а зависят от типа модификатора. Сказанное иллюстрируют данные табл. 4.33, в которую сведены значения $\delta \lg k'_{i,j}$ для трех полярных растворителей. Анализ данных показывает различие в селективности используемых модификаторов. Это различие может стать основой для выбора модификатора, обеспечивающего наилучшее разделение той или иной конкретной пары веществ. Далее, вклад в удерживание, обусловленный введением в молекулу сорбата первой гидроксильной группы ($\text{OH}_{(1)}$), обычно больше соответствующего значения для второй группы ($\text{OH}_{(2)}$). Значит, вероятность двухцентральной сорбции молекул, содержащих две гидроксильные группы, относительно мала. Различия между инкрементами для первого и второго гидроксильных увеличиваются по мере увеличения элюирующей силы полярного растворителя.

Структура исследуемых соединений [24]



Номер соединения	Тип циклолента-нового кольца	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
		3	4	5	6
I	a	... (CH ₂) ₆ COOC ₂ H ₅	>C=O	-H	←CH=CH-CH-C ₅ H ₁₁ OH
II	a	...CH ₂ COOCH ₃	>C=O	-H	←CH=CH-CH-C ₅ H ₁₁ OH
III	a	...CH ₂ COOCH ₃	>C=O	...OH	←CH=CH-CH-C ₅ H ₁₁ ОГФ
IV	a	...CH ₂ COOCH ₃	>C=O	...OH	←CH=CH-CH-C ₅ H ₁₁ OH
V	a	...CH ₂ COOCH ₃	>CH-OH	...OH	←CH=CH-CH-C ₅ H ₁₁ ОГП
VI	a	... (CH ₂) ₆ COOC ₂ H ₅	>C=O	-H	←CH=CH-CH-C ₅ H ₁₁ ОГП
VII	a	...CH ₂ COOCH ₃	>C=O	...OCH ₃	←CH=CH-CH-C ₅ H ₁₁ ОГФ
VIII	a	...CH ₂ COOCH ₃	>C=O	...OCH ₃	←CH=CH-CH-C ₅ H ₁₁ OH
IX	a	...CH ₂ COOCH ₃	>C=O	~ОГП	-H

1	2	3	4	5	6
X	a	$\cdots\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	>CH-OH	$\sim\text{OTGP}$	$-\text{H}$
XI	a	$\cdots\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	>CH-OH	$\sim\text{OTGP}$	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$
XII	a	$\cdots\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	>C=O	$\cdots\text{OTGP}$	$\text{<CH}=\text{CH}-\underset{\text{OTGP}}{\text{CH}}-\text{C}_5\text{H}_{11}$
XIII	a	$\cdots\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	>CH-CH	$\cdots\text{CH}$	$\text{<CH}=\text{CH}-\underset{\text{OTGP}}{\text{CH}}-\text{C}_5\text{H}_{11}$
XIV	b	$\cdots\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	>C=O	$-\text{H}$	$\sim\text{OTGP}$
XV	a	$\cdots\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	>C=O	$-\text{H}$	$\text{<CH}=\text{CH}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{C}_5\text{H}_{11}$
XVI	a	$\cdots\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	>CH-OH	$-\text{H}$	$\text{<CH}=\text{CH}-\underset{\text{OTGP}}{\text{CH}}-\text{C}_5\text{H}_{11}$
XVII	a	$\cdots\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	>CH-OH	$\cdots\text{OTGP}$	$\text{<CH}=\text{CH}-\underset{\text{OTGP}}{\text{CH}}-\text{C}_5\text{H}_{11}$
XVIII	a	$\cdots\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	>C=O	$\cdots\text{OTGP}$	$\text{<CH}=\text{CH}-\underset{\text{OTGP}}{\text{CH}}-\text{C}_5\text{H}_{11}$
XIX	c	$-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	>C=O	$-\text{OH}$	$-\text{H}$
XX	a	$\cdots\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	>C=O	$\sim\text{OH}$	$-\text{H}$
XXI	c	$-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	>C=O	$-\text{OCH}_3$	$-\text{H}$
XXII	a	$\cdots\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	>CH-OH	$\cdots\text{OCH}_3$	$\text{<CH}=\text{CH}-\underset{\text{OTGP}}{\text{CH}}-\text{C}_5\text{H}_{11}$

Примечание. Структурные фрагменты  и  обозначаются далее как $-\text{OTGF}$ и $-\text{OTGP}$ соответственно.

Значения инкрементов $\delta \lg k'_{i,j}$ для подвижных фаз с различными полярными модификаторами

$i \rightarrow j$	$\delta \lg k'_{i,j}$			Найдено по данным для соединений табл. 4.32
	пропанол-2	диоксан	этил-ацетат	
$-\text{H} \rightarrow -\text{OH}_{(1)}^*$	0,60	0,66	0,70	II, IV
$-\text{H} \rightarrow -\text{OH}_{(2)}$	0,40	0,56	0,70	
$=\text{CH}_2 \rightarrow =\text{C}=\text{O}^*$	0,30	0,26	0,32	
$\text{>C}=\text{O} \rightarrow \text{>CH}-\text{OH}_{(1)}$	0,30			IX, X
$\text{>C}=\text{O} \rightarrow \text{>CH}-\text{OH}_{(2)}$		0,30	0,38	III, XIII
$-\text{OTGP} \rightarrow -\text{OH}_{(1)}$	0,63	0,55	0,50	VI, I
$-\text{OTGF} \rightarrow -\text{OH}_{(1)}$	0,40	0,40	0,26	VII, VIII
$-\text{OTGF} \rightarrow -\text{OH}_{(2)}$	0,20	0,30	0,26	III, IV
$-\text{OCH}_3 \rightarrow -\text{OH}_{(1)}$	0,40	0,46	0,54	VII, III
$-\text{OCH}_3 \rightarrow -\text{OH}_{(2)}$	0,20	0,46	0,52	VIII, IV
$-\text{H} \rightarrow -\text{OTGF}$	0,20	0,20	0,43	II, III
$-\text{H} \rightarrow -\text{OTGP}^*$	-0,03	0,01	0,20	
$-\text{H} \rightarrow -\text{OCH}_3$	0,27	0,10	0,13	II, VIII
$-\text{CH}_3 \rightarrow -\text{CH}_2\text{CH}_3$	-0,11	-0,11	-0,11	X, XI
$-\text{CH}_2\text{R} \rightarrow -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}$	-0,03	-0,03	-0,02	II, I

Для прогнозирования хроматографического поведения на основе найденных значений $\delta \lg k'_{i,j}$ в качестве прототипа было выбрано соединение I (см. табл. 4.32). Оно имеет типичное для прюстаноидов строение углеводородного скелета и три наиболее часто встречающиеся функциональные группы — гидроксильную, карбонильную и сложноэфирную. В табл. 4.34 отражены результаты расчета значений k' соединений по уравнению (4.101). Точность прогнозирования удерживания удовлетворительна. Обычно погрешность составляет не более 10%, однако для соединений IX—XI достигает 30%. По-видимому, это объясняется не точностью расчетных значений $\delta \lg k'_{i,j}$ для различных структурных изменений (соединения, отличающиеся от I тремя подобными изменениями, описываются достаточно точно), а характером несущего их углеводородного скелета. Поэтому для более успешного прогнозирования целесообразно выбирать в качестве прототипа вещество с максимально близким углеводородным скелетом. Так, при расчете k' соединений IX и XI по соединению X погрешность составляет 6 и 3% соответственно.

Прогнозирование удерживания производных циклопентана в бинарных элюентах по уравнению (4.101) (прототип — соединение I)

Соединение по табл. 4,32	Число структурных изменений	Пропанол-2			
		% в гексане	$k'_{расч}$	$k'_{эксп}$	$k'_{эксп}/k'_{расч}$
I		10		1,11	
II	1	10	1,77	1,91	1,08
III	2	10	2,80	2,81	1,00
IV	2	10	4,44	4,89	1,10
V	3	10	5,58	5,95	1,07
VI	1	10	0,26	0,31	1,17
VII	3	10	1,29	1,23	0,95
VIII	2	10	3,26	2,92	0,90
IX	3	10	1,86	1,34	0,72
X	4	10	3,71	2,51	0,68
XI	3	10	1,73	1,20	0,70
XII	3				
XIII	2				
XIV	2				

Диоксан				Этилацетат			
% в гексане	$k'_{расч}$	$k'_{эксп}$	$k'_{эксп}/k'_{расч}$	% в гексане	$k'_{расч}$	$k'_{эксп}$	$k'_{эксп}/k'_{расч}$
30		0,63		70		0,4	
30	1,0	0,99	1,0	70	0,56	0,52	0,93
30	1,58	1,50	0,95	70	1,51	1,42	0,94
30	3,63	3,74	1,03	70	2,81	3,04	1,08
30	0,50	0,52	1,04	70	0,42	0,41	0,98
30	1,26	1,24	0,98	70	0,76	0,71	0,94
30	3,16	2,99	0,95	70	3,63	3,47	0,96
30	0,40	0,37	0,93	70	0,28	0,24	0,85
				50	0,56	0,53	0,95

Таблица 4.35

Прогнозирование удерживания в трехкомпонентных элюентах

Соединение по табл. 4.32	Прото тип соединения	Число структурных различий	Состав элюента	k'_p	$k'_{расч}$	$k'_{эксп}$	$k'_{эксп}/k'_{расч}$
1	2	3	4	5	6	7	8
VII	XV	3	5% пропанола-2	3,15	1,73	•1,51	0,87
			5% этилацетата				
			90% гексана				
VII	VIII	1	8% пропанола-2	2,15	0,85	0,83	0,9
			5% диоксана				
			87% гексана				
XXII	XVI	1	15% этилацетата	1,68	2,16	2,78	1,26
			10% диоксана				
			75% гексана				
XVIII	XVII	1	15% этилацетата	4,13	2,02	1,41	0,70
			10% диоксана				
			75% гексана				
XIX	IV	3	10% пропанола-2	3,20	4,23	3,56	0,84
			5% диоксана				
			85% гексана				
XIII	III	1	10% пропанола-2	1,25	2,89	2,96	1,02
			5% диоксана				
			85% гексана				
XX	и:	3	10% пропанола-2	1,25	3,82	3,71	0,97
			5% диоксана				
			85% гексана				
XXI	XIX	1	13% пропанола-2	3,12	1,19	1,41	1,18
			7% диоксана				
			80% гексана				
IV	XV	2	5% пропанола-2	0,80	3,11	2,34	0,75
			20% диоксана				
			75% гексана				
VIII	IV	1	5% пропанола-2	2,34	1,09	1,18	1,08
			20% диоксана				
			75% гексана				
VIII	IV	1	% пропанола-2	8,07	4,13	3,94	0,95
			10% этилацетата				

			85% диоксана				
IV	XV	1	5% пропанола-2	2,22	8,07	6,82	0,85
			10% этилацетата				
			85% гексана				

При разделении сложных смесей часто используют не один, а два или даже больше модификаторов. В рамках рассматриваемого множества соединений может быть оценена сравнительная сила каждого из трех исследуемых модификаторов. Для этого можно взять достаточно представительную группу веществ (например, 10 соединений, приведенных в табл. 4.32, содержащих характерные для всего множества структурные фрагменты) и для каждого из них найти концентрации диоксана и этилацетата, обладающие такой же силой, как ряд бинарных элюентов пропанол-2—гексан. Естественно, в силу различной селективности найденные значения для разных веществ не совпадут. Средние же значения для всей группы веществ будут отражать сравнительную силу модификаторов применительно к рассматриваемому множеству (рис. 4.31). Чтобы использовать уравнение (4.101) для трехкомпонентных систем растворителей (неполярный А и полярные В₁, В₂), необходимо найти усредненное значение $\delta \lg k'_{i,j}$ для данной системы. Пусть необходимо рассчитать $\delta \lg k'_{i,j}$ для системы, содержащей *a*% пропанола-2 и *b*% диоксана в гексане. Для этого по рис. 4.31 найдем величину *b'*. Она соответствует концентрации пропанола-2, обладающей такой же элюирующей силой, как *b*% диоксана. Среднее значение $\delta \lg k'_{i,j}$ для данного состава элюента находим по формуле

$$\delta \lg k'_{i,j} = \frac{a \delta \lg k'_{i,j,a} + b' \delta \lg k'_{i,j,b}}{a + b} \quad (4.102)$$

где $\delta \lg k'_{i,j,a}$ и $\delta \lg k'_{i,j,b}$ — инкременты для бинарных подвижных фаз, содержащих пропанол-2 и диоксан соответственно.

С помощью уравнений (4.101) и (4.102) нами рассчитаны величины удерживания ряда простаноидов на силикагеле в трехкомпонентных подвижных фазах. В табл. 4.35 представлены данные, которые позволяют судить о точности данного метода.

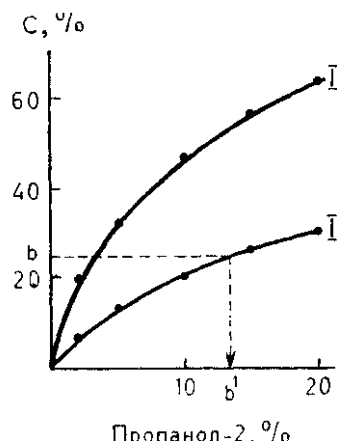


Рис. 4.31. Концентрации пропанола-2, диоксана (I) и этилацетата (II) в гексане, обладающие равной элюирующей силой по отношению к производным циклопентанона.

4.2.4. НЕТРАДИЦИОННЫЕ РЕЖИМЫ ХРОМАТОГРАФИИ НА СИЛИКАГЕЛЕ

Выше рассмотрены основные закономерности хроматографии на силикагеле в нормально-фазовом режиме. Такой способ использования силикагеля — исторически первый, и с помощью его решено множество практически важных задач. Впоследствии силикагель в значительной степени был вытеснен обращенно-фазовыми сорбентами. Однако данные самого последнего периода свидетельствуют о том, что возможности силикагеля далеко не исчерпываются классической нормально-фазовой хроматографией. Помимо относительно малополярных элюентов при хроматографии на силикагеле могут использоваться различные нетрадиционные подвижные фазы. При этом возможно получение хороших практических результатов даже для таких сорбатов, которые, как правило, рекомендуют разделять в обращенно-фазовом режиме. Механизм сорбции в таких случаях довольно сложен и изучен еще недостаточно. Обычно принято считать, что поверхность силикагеля слабокислая, и это иногда является причиной затруднений при нормально-фазовой хроматографии оснований. Установлено, однако, что современные марки силикагеля для ВЭЖХ, имеющие сферическую форму частиц, могут быть как кислыми, так и щелочными [128]. Это обстоятельство следует иметь в виду при разработке методик, так как высокое значение pH силикагеля может положительно сказаться на форме пиков оснований и селективности разделений. Аналогичен результат при применении буферированного силикагеля [343, 344]. Для получения этого материала силикагель пропитывали 0,1 М раствором соли или кислоты, после чего высушивали в вакууме и затем заполняли колонку суспензионным способом. В качестве подвижных фаз использовали обычные для нормально-фазовой хроматографии системы: например, смеси гексана с диэтиловым эфиром в различных соотношениях. Пропитка силикагеля гидросульфатом натрия либо щавелевой, лимонной, винной кислотами способствовала существенному улучшению формы пиков изомеров гераниевой кислоты. Аналогичного эффекта для сорбатов основного характера — производных антраниловой кислоты — удалось добиться пропиткой фосфатно-цитратным буфером. Последний прием позволил также получить вполне симметричные пики ФТГ-производных аминокислот.

Как правило, силикагель используют с органическими элюентами, почти не содержащими воды. Однако оказывается, что он вполне может работать в равновесии и с водными растворами — типичными элюентами обращенно-фазовой хроматографии. При этом можно получить хроматограммы, не уступающие по качеству, а иногда и лучше, чем на алкилсиликагелях. Так, при исследовании синтетических пептидов нами установлено [4], что в элюентах, содержащих ацетатный или фосфатный буфер и ацетонитрил (свыше 60%), характер хроматограмм почти не зависит от типа использованного сорбента (рис. 4.32).

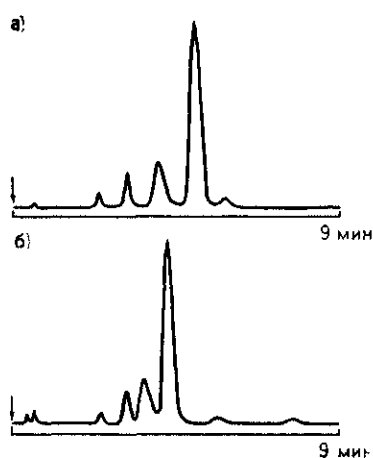


Рис. 4.32. Хроматограмма Asn-Arg-Val--Tyr-Val-His-Pro-Phe. Подвижная фаза — ацетонитрил — 0,1 М ацетатный буфер pH 5,0 (70:30). Сорбент — Зорбакс ODS (а), Силасорб 600 (б).

Таким образом, в соответствующих подвижных фазах возможна такая ситуация, когда алкильные лиганды обращенно-фазового сорбента на процесс сорбции влияния не оказывают. Вероятнее всего, при хроматографии оснований в таких условиях начинают играть роль процессы ионного обмена. В работе [387] изучалось влияние pH, ионной силы, концентрации метанола на поведение ампролиума, амилокаина, бензокаина, бутакаина и кокаина на октадецилсилкагеле и немодифицированном силикагеле. Многие закономерности оказались весьма близкими для двух различных сорбентов. Более того, немодифицированный силикагель проявил большую эффективность (рис. 4.33 и 4.34). Наиболее яркий пример эффектов такого рода приведен в работе [66]. Исследовано поведение на силикагеле характерных сорбатов обращенно-фазовой хроматографии: трициклических антидепрессантов, анестетиков (лидокаин и аналоги), пропранолола, прометазина и др. Все они обладали выраженными основными свойствами. Вопреки общепринятому мнению, что неудовлетворительная форма пиков органических оснований связана с влиянием остаточных силанольных групп на поверхности алкилсиликагелей, было показано, что асимметрия определяется не наличием силанольных групп, а их стерической недоступностью. Авторы использовали сорбенты с различной степенью модификации поверхности алкильными радикалами и обнаружили, что удовлетворительное удерживание и безупречная форма пиков характерны для немодифицированного силикагеля. Модификация его ведет к увеличению удерживания (подвижная фаза во всех случаях одна и та же) и резкому увеличению «хвостов». Приводятся вполне удовлетворительные хроматограммы изученных лекарственных соединений на немодифицированном силикагеле при использовании подвижных фаз, состоящих из воды, метанола и добавок бутиламина либо гидрофосфата аммония. Аналогичные условия использованы для разделения производных тетрациклина и имидазола, ряда алкалоидов [281].

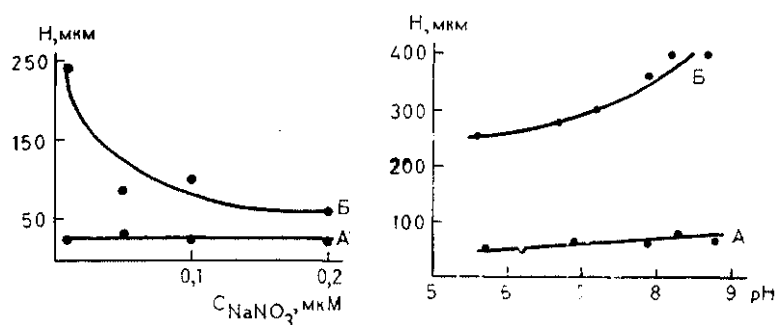


Рис. 4.33. Зависимость ВЭТТ от концентрации нитрата натрия в подвижной фазе. Сорбат — кокаин, подвижная фаза — 70% метанола в воде, pH 7,0. Сорбенты — силикагель (А), октадецилсиликагель (Б).

Рис. 4.34. Зависимость ВЭТТ от pH подвижной фазы (5% 0,05 М формиата аммония в метаноле). Сорбат — ампролиум. А — силикагель; Б — октадецилсиликагель.

Неводные ионогенные растворители также могут быть применены при хроматографии на силикагеле. В работе [134] изучено влияние ионной силы, рН элюента и основности сорбатов на величины удерживания. Роль этих факторов указывает на то, что основным процессом, определяющим сорбцию, является катионный обмен с силанольными группами поверхности. Подвижные фазы состояли из метанола с добавками хлорной кислоты, перхлората аммония, гидроксида калия. Сопоставление хроматограмм, полученных на различных силикагелях (Партисил[^], Гиперсил, Силоид, Сферисорб), свидетельствует о том, что абсолютные величины удерживания на последних трех сорбентах воспроизводятся хорошо. Партисил удерживает изученные лекарственные соединения слабее, хотя селективность сорбента по отношению к ним примерно такая же, как у других материалов. В отличие от нормально-фазовой и обращенно-фазовой хроматографии, селективность разделения несколько улучшается при малом удерживании. На рис. 4.35 представлена зависимость lgk' от концентрации хлорной кислоты в метаноле. Прямые для различных лекарственных соединений располагаются веерообразно, подобно тому, как это наблюдалось в других режимах хроматографии. Однако общая точка, к которой стремятся прямые, расположена не в области больших концентраций и малого удерживания, а в противоположной части графика.

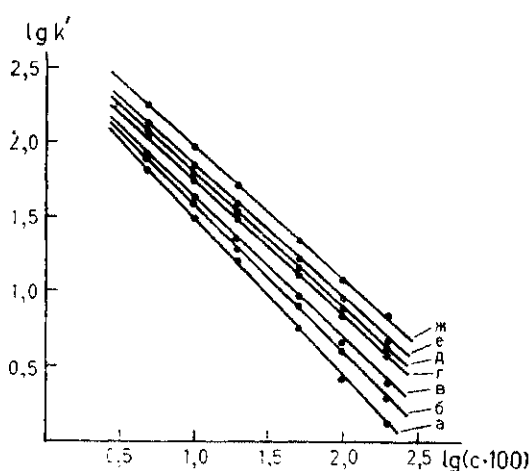


Рис. 4.35. Зависимость удерживания сорбатов от логарифма объемной концентрации хлорной кислоты в метаноле (по данным [134]): а — амфетамин; б — дез-этиламидарон; в — нортриптилин; г — амио-дарон; д — амитрипти-лин; е — имипрамин; ж — эмепрониум.

В работе [234] силикагель Сферисорб S5W и подвижная фаза, содержащая 0,01 моль/л хлорной кислоты и 0,0001 моль/л гидроксида калия, были испытаны для хроматографирования 462 лекарственных веществ — оснований различных групп. Из приведенного материала ясно, что такая система универсальна и открывает возможности селективного детектирования по сочетанию УФ-поглощения и сигнала электрохимического детектора. Однако почти для всех сорбатов, имеющих коэффициенты емкости выше трех, характерна также значительная асимметрия пиков.

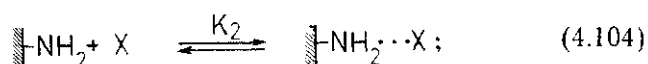
4.3. ХРОМАТОГРАФИЯ НА ПОЛЯРНЫХ ХИМИЧЕСКИ СВЯЗАННЫХ НЕПОДВИЖНЫХ ФАЗАХ

Сорбенты этого типа уже на протяжении ряда лет выпускаются всеми основными фирмами, специализирующимися на материалах для ВЭЖХ. Тем не менее вплоть до настоящего времени области и способы их применения не удалось сформулировать однозначно. Их преимущества по сравнению с силика-гелем, с одной стороны, и алкилсиликагелями — с другой пока

выявлены лишь для некоторых классов соединений. По-видимому, единственная область, где сорбенты этого класса (точнее, лишь один из них — аминосиликагель) открыли принципиально новые возможности, — это анализ углеводов, а также групповые разделения углеводов [345].

Полярность материалов, модифицированных органическими радикалами с амино- и цианогруппами, меньше, чем у исходных силикагелей, и полярные органические соединения удерживаются такими сорбентами слабее. Следовательно, они могут быть рекомендованы для разделения наиболее полярных соединений в нормально-фазовом режиме. С другой стороны, эти сорбенты гидролитически устойчивы при рН 2,0—7,5 и потому могут использоваться также в обращенно-фазовом режиме. Хотя возможности такого их использования изучены пока недостаточно, можно ожидать, что помимо неспецифических гидрофобных взаимодействий проявятся также взаимодействия между полярными группами в молекулах сорбатов и неподвижной фазой. В результате селективность таких систем будет отличаться от селективности традиционных обращенно-фазовых систем.

В случае использования органических элюентов механизм сорбции на материалах этого класса мало отличается от механизма сорбции на немодифицированном силикагеле, хотя дискуссия о его деталях в литературе до сих пор не завершена. Так, в работе [197] показано, что аминогруппы поверхности способны связывать различное количество молекул полярного растворителя. В случае умеренно полярных растворителей поверхностный комплекс, по мнению авторов, состоит из одной аминогруппы и одной молекулы растворителя. Более полярные растворители, например спирты, связываются с аминогруппами в отношении 1:3. Предполагается, что в первом случае молекула сорбата взаимодействует со свободными аминогруппами сорбента и полярным растворителем в подвижной фазе. В системе, таким образом, реализуются следующие равновесия:



где B — полярный компонент подвижной фазы;

X — хроматографируемое вещество;

K_1, K_2, K_3 — соответствующие константы равновесия.

Сольватация неподвижной фазы (4.103) и анализируемого вещества в подвижной фазе (4.105) переводит сорбат и сорбент в сорбционно неактивные формы. Из (4.103) и (4.104) получено следующее выражение для зависимости удерживания от состава подвижной фазы:

$$\frac{1}{k'} = \frac{V_m}{mr} \cdot \frac{1 + (K_1 + K_3) \cdot [B] + K_1 K_3 [B]^2}{K_2}, \quad (4.106)$$

где m — масса неподвижной фазы;

r — суммарная концентрация аминогрупп;

$[B]$ — концентрация полярного компонента в подвижной фазе.

Следовательно, между величиной $1/k'$ и концентрацией полярного растворителя должна наблюдаться параболическая зависимость. Такая зависимость была авторами обнаружена экспериментально.

В случае высокополярных растворителей B зависимость $1/k'$ от $[B]$ должна быть линейной:

$$\frac{1}{k'} = \frac{V_m}{mr} \cdot \frac{1 + (K_1 + K_2) \gamma [B]}{K_2}, \quad (4.107)$$

где γ — коэффициент активности полярного растворителя B в смеси. Эта закономерность также была подтверждена экспериментально.

Вопреки изложенной точке зрения, Снайдер и Шунк [377] показали, что все закономерности на аминосиликагеле вполне могут быть описаны вытеснительной моделью Снайдера—Сочевиньского, разработанной для адсорбционной хроматографии на силикагеле и окиси алюминия. Развитие этой теории применительно к сорбентам рассматриваемого типа дано в работах [166—168, 170].

Удельный удерживаемый объем V_g связан со свойствами компонентов системы соотношением

$$\lg V_g = \lg V_a + \alpha (S^0 - \varepsilon^0 A_s), \quad (4.108)$$

где a — активность сорбента; S^0 — сила кислоты (или основания) по Льюису; ε^0 — элюирующая сила растворителя; A_s — эффективная адсорбционная поверхность сорбата (единица A_s равна $0,085 \text{ нм}^2$). Объем адсорбированного монослоя элюента V_a может быть оценен следующим образом:

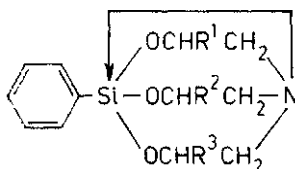
$$V_a = 35 \cdot 10^{-5} A - 0,01 h, \quad (4.109)$$

где A — удельная поверхность сорбента;

h — массовая доля воды в подвижной фазе, %.

Таблица 4.36

Параметры уравнения (4.52) для силатранов на сорбенте Зорбакс CN. Неполярный растворитель — гексан



R ¹	R ²	R ³	Полярный модификатор									
			диоксан					хлороформ				
			<i>b</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	σ	<i>F</i>	<i>b</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	σ	<i>F</i>
H	H	H	2,68	-1,48	0,997	0,03	812	4,44	-2,55	0,999	0,03	1687
CH ₃	H	H	2,32	-1,33	0,996	0,03	692	3,95	-2,37	0,998	0,03	1501
CH ₃	CH ₃	H	1,91	-1,15	0,993	0,03	1171	3,29	-2,09	0,992	0,05	705
CH ₃	CH ₃	CH ₃	1,62	-1,05	0,992	0,03	554	2,88	-2,01	0,999	0,01	3354

При исследовании фенолов и нафтолов также выявлено, что их величины удерживания на μ Бондапаке CN [214] и μ Бондапаке NH₂ [213] подчиняются простым моделям Снайдера—Сочевиньского.

При обсуждении механизма сорбции на нитрил- и амино-силикагелях следует учитывать, что остаточные силанольные группы поверхности могут вносить существенный вклад в удерживание, в особенности если подвижная фаза малополярна. Так, согласно [432], в определенных условиях сорбция происходит главным образом на немодифицированных участках поверхности, а не на органических радикалах.

Зависимость удерживания от концентрации полярного растворителя рассматривалась в ряде работ, и чаще всего для ее описания использовался подход Снайдера—Сочевиньского. Установлено [213], что коэффициенты n' уравнения (4.89) для фенолов и нафтолов на μ Бондапаке NH₂ не слишком сильно отличаются от единицы. Для этого же класса веществ на μ Бондапаке CN в координатах уравнения Скотта—Кучеры (4.90) наблюдается излом, в то время как уравнение (4.89) вполне удовлетворительно описывает экспериментальные данные. В работе [334] показана линейная зависимость между $\lg k'$ азотсодержащих гетероциклов на нитрофенилсиликагеле и элюирующей силой бинарной подвижной фазы.

Для описания обсуждаемой зависимости может быть использовано и уравнение (4.52). В табл. 4.36 приведены параметры этого уравнения для силатранов. Аналогичные данные для производных циклопентенона представлены на рис. 4.36. Обращает на себя внимание веерообразное расположение прямых $\lg k' - \lg C$ на этом рисунке. Подобное расположение прямых отмечено также в работе [377]. Оно родственно обсуждаемому выше для хроматографии на алкилсиликагелях и немодифицированных силикагелях. Некоторые примеры зависимостей, найденных нами, обобщены в табл. 4.37.

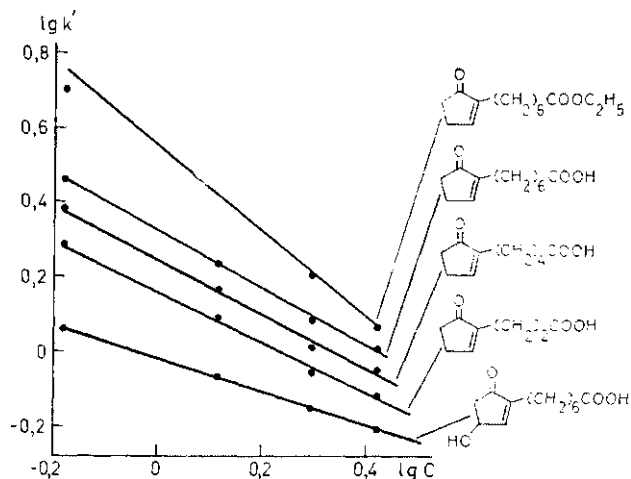


Рис. 4.36. Зависимость удерживания производных циклопентенона на колонке Микропак CN-10 от концентрации пропанола-2 в гексане, модифицированном 1 % уксусной кислоты.

Таблица 4.67

Параметры уравнения (4.55) для химически модифицированных полярных сорбентов

Класс соединений	Сорбент	Компоненты элюента		-b ₀	-b ₁	n	r
		A	Б				
Алкилпиридины	Зорбакс CN	Гексан 2	Диоксан	0,19	0,97	14	0,95
Производные циклопентенона	Микропак CN	Гексан 2	Пропанол-2	0,49	0,97	5	0,93
Силатраны	Зорбакс CN	Гексан 2	Хлороформ	2,47	2,7	4	0,95
	То же	Гексан 2	Диоксан	0,88	2,4	4	0,98
Ароматические соединения*	Росил NH	Гептан	Пропанол-2	1,42	2,0	5	0,93
Комплексы арентрикарбонилхрома*	То же	Гептан	Пропанол-2	0,65	1,16	8	0,99

* Переработанные данные из [102].

Аналогичная закономерность позволила разработать систему прогнозирования удерживания ароматических оксисоединений [100]. Установлено, что между величиной $\lg k'$ на μ Бондапаках CN и NH₂ и параметром растворимости бинарной подвижной фазы существует линейная зависимость

$$\lg k' = I - S \lg \delta_{m,T}, \quad (4.110)$$

где I, S — коэффициенты.

Параметр растворимости бинарной подвижной фазы $\delta_{m,T}$ связан с параметрами сильного ($\delta_{s,T}$) и слабого ($\delta_{w,T}$) ее компонентов соотношением

$$\delta_{m,T} = X_s \delta_{s,T} + (1 - X_s) \delta_{w,T}, \quad (4.111)$$

где X_s — мольная доля сильного компонента.

В ряду структурно родственных соединений коэффициенты I и S уравнения (4.110) линейно связаны между собой:

$$S = -pI + q \quad (4.112)$$

Подставив (4.112) в (4.110), получим уравнение, позволяющее прогнозировать удерживание при произвольном составе бинарной подвижной фазы:

$$\lg k' = (1 + p \lg \delta_{m,T})I - q \lg \delta_{m,T}. \quad (4.113)$$

Аналогичную зависимость для коэффициентов уравнения Снайдера $\lg k'_0$ и A_s/n_B авторам обнаружить не удалось. Коэффициенты корреляции уравнения (4.113) для разных массивов данных составили 0,95—0,98. Прогнозирующая способность (4.113) оценивалась по удерживанию веществ, данные о которых не использовались при определении коэффициентов q и p . Для различных классов сорбатов погрешность прогнозирования k' составила 4—8%.

Разумеется, при хроматографии на полярных химически связанных неподвижных фазах описание процесса только в терминах силы подвижной фазы (или концентрации данного полярного растворителя) неполное. Как и в других видах хроматографии, не меньшую роль играет селективность [102].

Взаимосвязь между строением сорбатов и их удерживанием на полярных химически связанных неподвижных фазах изучена пока слабо. Однако имеющиеся в литературе примеры позволяют полагать, что общие подходы, оправдавшие себя в хроматографии на силикагелях и алкилсиликагелях, применимы и к этому классу сорбентов. Так, в [432] показано, что удерживание ароматических углеводородов на цианопропилсиликагеле Супелкосил CN подчиняется уравнению (4.23). Найдены вклады некоторых функциональных групп в удерживание на этом сорбенте. Оказалось, что они приблизительно в 5 раз меньше соответствующих вкладов в хроматографии на силикагеле. Отсюда следует практически важный вывод относительно области применения нитрильных неподвижных фаз: они должны оказаться наиболее выгодными в тех случаях, когда на одной хроматограмме необходимо получить пики соединений, сильно различающихся по полярности.

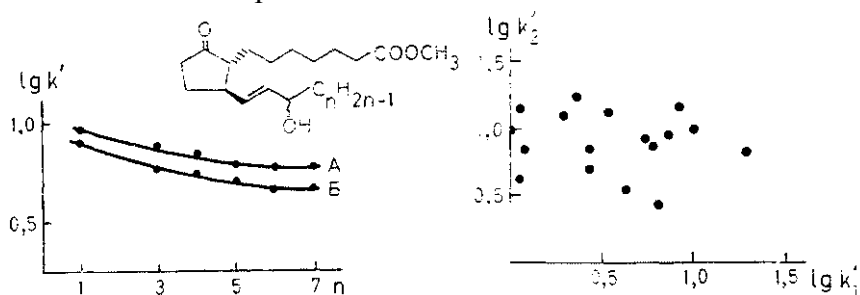


Рис. 4. 37. Зависимость удерживания гомологов метилового эфира 11-дезок-сипростагландина E_1 от числа атомов углерода в w -цепи. А — α -изомер; Б — β -изомер. Колонка — Микропак CN. Подвижная фаза — пропанол-2 — гексан (5:95).

Рис. 4. 38. Удерживание производных силш-триамина на Микропаке CN: $\lg k'_1$ — в подвижной фазе гептан—пропанол-2 (1000:15); $\lg k'_2$ — в подвижной фазе вода—ацетонитрил—уксусная кислота (95:5:0,5).

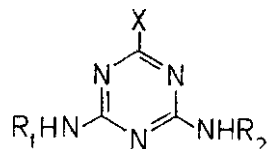
Нитрилсиликагели, в частности, проявляют меньшую селективность при разделении гомологов, чем алкилсиликагели. На рис. 4.37 отражена зависимость удерживания гомологов метилового эфира 11-дезоксипростагландина E_1 от числа атомов углерода. Видно, что инкремент $\lg k'$ непостоянен и уменьшается с удлинением w -цепи.

На величины удерживания, естественно, влияет не только размер молекул сорбатов, но и электронные факторы. Так, выявлено наличие корреляции между $\lg k'_0$ и pK [213]. В работе [159] для описания поведения полярных ароматических углеводородов предложено уравнение

$$1 \lg L' = a + 6(p_{\pi} + \text{Пл}/l), \quad (4.114)$$

где p_{π} — число π -электронов; l — длина молекулы. Параметр p_{π}/l служит здесь мерой компактности π -электронного облака. Влияние температуры на удерживание на амино- и нитрил-силикагелях также изучено довольно слабо. Можно, однако, предполагать, что основные закономерности, характерные для других привитых неподвижных фаз, будут соблюдаться и в этом случае. В работе [336] показано, что с повышением температуры удерживание на μ Бондапаке CN уменьшается. При этом для данного варианта хроматографии также характерен эффект компенсации энтальпии и энтропии.

Полярные химически связанные неподвижные фазы могут использоваться и в режиме обращенно-фазовой хроматографии. На рис. 4.38 сопоставлены коэффициенты емкости производных с-триазины [366] общей формулы



$X = \text{Cl}, \text{OCH}_3, \text{SCH}_3$

$R; R\text{-Alk}$

на одном и том же сорбенте (Микропак CN) при применении типичных нормально- и обращенно-фазового элюентов. По отношению к данному классу соединений цианэтилсиликагель обладает достаточной удерживающей способностью как в нормально-, так и в обращенно-фазовом режиме. Величины $\lg k'$ в этих режимах между собой не коррелированы; следовательно, переход из одного режима в другой может служить средством изменения селективности разделения. Замена алкилсиликагеля цианэтилсиликагелем в режиме обращенно-фазовой хроматографии также может привести к изменению селективности [101]. С этой же целью можно использовать и аминосилкагель. На рис. 4.39 представлены данные из [126] по удерживанию производных пиримидина на Зорбаксе C8, Сепароне CN и Сепароне NH₂. Величины удерживания, изображенные таким образом, характеризуют сравнительную селективность двух систем. Если точки располагаются вдоль одной линии, это означает, что по селективности данные системы сходны и не следует ожидать существенного изменения характера разделения при замене одной колонки другой. Представленная на рис. 4.39,а корреляция между величинами удерживания на Зорбаксе C8 и Сепароне C18 свидетельствует об одинаковом механизме удерживания и примерно одинаковой селективности этих двух сорбентов.

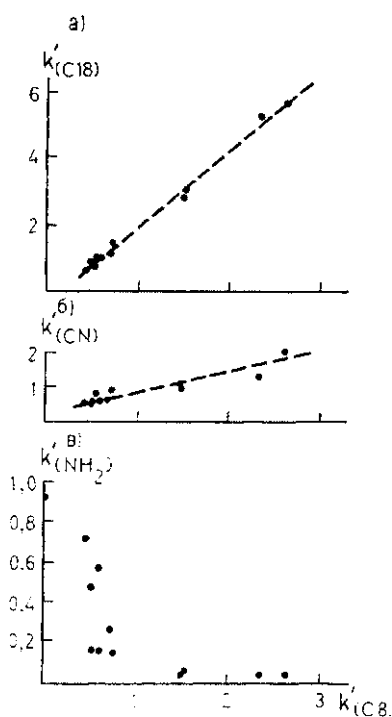


Рис. 4.39. Сравнение коэффициентов емкости производных пиримидина на Зорбаксе C8 с аналогичными величинами на Сепароне C18 (а), Сепароне CN (б), Сепароне NH₂ (в). Подвижная фаза — ацетонитрол—вода (20:80).

На рис. 4.39,6 Зорбакс С8 сравнивается с Сепароном СN. Рассеяние точек больше и селективность цианэтилсиликагеля выше, хотя по-прежнему доминирует обращенно-фазовый механизм и порядок элюирования совпадает с таковым для октил-силикагеля. Противоположная закономерность характерна для Сепарона NH2 — в этом случае порядок элюирования меняется по сравнению с Зорбаксом С8 на обратный (рис. 4.39,б). Возможность представления удерживания производных пиримидина как суммы структурных инкрементов показана в работе [125]. Аналогично хроматографии на алкилсиликагеле при хроматографии на μ Бондапаке СN может оказаться полезным «корреляционный фактор» [342].

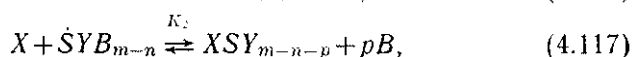
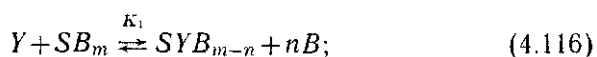
4.4. ХРОМАТОГРАФИЯ В СИСТЕМАХ С ДИНАМИЧЕСКИМ МОДИФИЦИРОВАНИЕМ

Во всех рассмотренных выше вариантах хроматографии удерживание в конечном счете определялось сродством молекул хроматографируемых соединений с поверхностью сорбента. Последняя, как правило, сольватирована более сильным компонентом подвижной фазы. Однако молекулы этого более сильного растворителя (B) оказывают лишь количественное влияние на распределение сорбата X между подвижной и неподвижной фазами. Несмотря на то что разные по химической природе растворители B могут придавать хроматографической системе различную селективность, качественная картина распределения в первую очередь зависит от способности молекул X вступать в ассоциацию с молекулами или функциональными группами поверхности S . Этот процесс чаще всего может описываться уравнением



Качественно новые свойства могут приобретать хроматографические системы, в состав которых введен динамический модификатор. Под этим термином мы понимаем такое соединение (K), которое постоянно поступает в колонку вместе с подвижной фазой и, находясь в динамическом равновесии с другими компонентами системы, радикальным образом изменяет механизм сорбции, а также ведет к качественному изменению селективности системы.

Изменение селективности может происходить за счет образования ассоциатов Y с неподвижной фазой либо молекулами сорбатов. В первом случае процесс определяется следующими равновесиями:

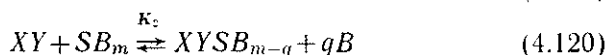


откуда следует выражение для коэффициента емкости:

$$\lg k' = \lg \varphi + \lg (K_2 K_1 [SB_m]) + \lg [Y] - u[B], \quad (4.118)$$

где $u = p + n$.

Во втором случае равновесия



приводят к выражению, идентичному (4.118), где $u = q$. Значит, при $[SB_m] = \text{const}$; $\lg \varphi = \text{const}$ в системах с динамическим модифицированием должны выполняться следующие соотношения:

$$\lg k' = a + b \lg [Y] \quad ([B] = \text{const}); \quad (4.121)$$

$$\lg k' = a' + b' \lg [B] \quad ([Y] = \text{const}). \quad (4.122)$$

Коэффициент b должен быть равен единице, если модифицирование идет в стехиометрическом отношении 1:1, согласно уравнениям (4.88) и (4.89).

Системы с динамическим модифицированием широко распространены в современной жидкостной хроматографии. Основной целью такого модифицирования является подавление нежелательных механизмов сорбции, создание условий, для которых характерны линейные изотермы сорбции и, следовательно, симметричная форма хроматографических пиков. Например, при хроматографии поногенных соединений, в особенности оснований, на силикагеле

в обычных бинарных элюентах форма пиков зачастую далека от идеальной потому, что в адсорбционном слое, обогащенном молекулами воды, могут происходить процессы диссоциации и ионного обмена. Стандартный прием их подавления — включение в элюент специфических модификаторов — уксусной кислоты (если сорбаты кислые) или органических оснований (для сорбатов основной природы). С аналогичной целью в обращенно-фазовой хроматографии к элюенту добавляют кислоты или буферные растворы. Во всех системах такого рода с помощью динамического модифицирования удается добиться реализации в более чистом виде тех механизмов сорбции, которые внутренне присущи данной комбинации сорбента и подвижной фазы. Коль скоро такая цель достигнута, поведение сорбатов в модифицированной системе подчиняется закономерностям, общим для данного режима хроматографии.

Противоположной целью динамического модифицирования является создание в системе условий для реализации таких механизмов сорбции, которые для немодифицированных сорбентов и подвижной фазы не характерны. Этим путем на относительно небольшом числе исходных сорбентов можно создавать разнообразные по селективности системы.

К числу наиболее важных в практическом отношении приложений динамического модифицирования относится ион-парная хроматография. Особое значение этого метода определяется осложнениями, которыми зачастую сопровождается хроматография ионогенных соединений. Так, даже самые современные ионообменные колонки по эффективности существенно уступают колонкам, заполненным силикагелем и алкилсиликагелями. С другой стороны, ионогенные соединения в режиме обращенно-фазовой хроматографии обычно дают асимметрические пики. К тому же наиболее гидрофильные органические кислоты и основания вообще слабо удерживаются неполярными сорбентами. Ион-парная хроматография во многих случаях совмещает в себе достоинства обращенно-фазовой и ионообменной хроматографии. Основные аспекты теории и практического использования ион-парной хроматографии изложены в работах [65, 123, 156, 204, 408].

Суть этого метода заключается в динамическом модифицировании сорбента группами, обладающими ионообменными свойствами. В качестве сорбента применяют октил- или октадецил-силикагель. Подвижная фаза помимо обычных для обращенно-фазовых разделений компонентов содержит гидрофобные ионы в качестве специфических модификаторов. Для разделения оснований применяют натриевые соли алкилсульфокислот с числом атомов углерода 4—12, для разделения кислот — соли тетра-алкиламмония.

В литературе до сих пор не сформировалось единое мнение о механизме ион-парной хроматографии. Согласно одной модели, гидрофобные ионы модификатора сорбируются на поверхности алкилсиликагеля таким образом, что к подвижной фазе обращены заряженные группы (рис. 4.40,а; реакция I). В результате образуется поверхность, обладающая ионообменными свойствами. Предполагается, что сорбция в таких системах подчиняется обычным закономерностям ионообменной хроматографии (реакция II). Такой точки зрения придерживаются авторы работ [112, 352, 402].

Согласно противоположной модели, поверхностное модифицирование сорбента не играет существенной роли. Предполагается, что гидрофобный противоион образует с хроматографируемым ионом пару в растворе подвижной фазы (рис. 4.40,б; реакция III). Эта ионная пара затем сорбируется на неполярной поверхности по обычному обращенно-фазовому механизму (реакция IV).. Такой взгляд на процесс ион-парной хроматографии также имеет своих приверженцев [262, 299, 330]. В подтверждение одного и другого механизма приводятся разнообразные экспериментальные данные, однако однозначное решение проблемы крайне затрудняется тем обстоятельством, что обе модели предполагают одну и ту же структуру адсорбированного комплекса (АК на рис. 4.40). Кроме того, вполне вероятно, что истинный механизм процесса зависит от типа динамического модификатора и условий опыта. Например, установлено, что механизм сорбции морфина и его аналогов зависит от длины алкильного радикала в молекулах ион-парного модификатора — алкилбензолсульфоната. В последнее время предложены также другие модели, которые в известной степени преодолевают противоречия первоначальных концепций.

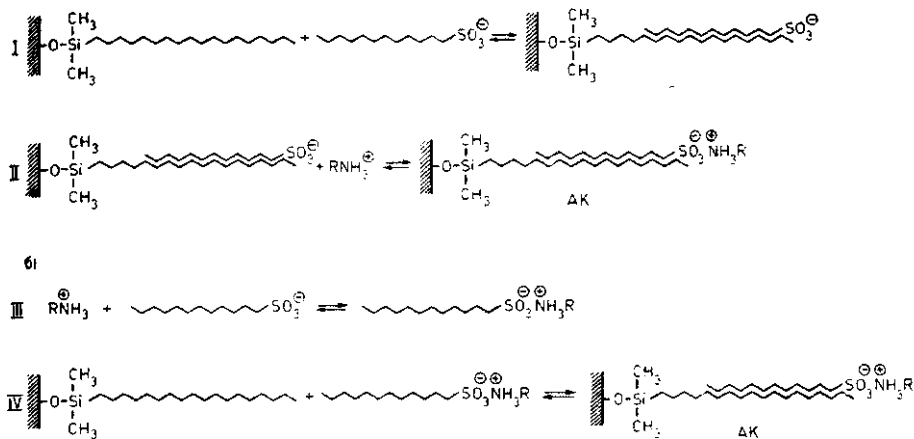


Рис. 4.40. К механизму ион-парной хроматографии: А — ионообменная сорбция на динамически модифицированном алкилсиликагеле; Б — сорбция ионных пар на алкилсиликагеле.

В ряде работ изучалась сорбция динамического модификатора алкилсиликагелями. Количество этого реагента в неподвижной фазе зависит от его гидрофобности, концентрации в подвижной фазе и ее рН. При отсутствии органического растворителя в подвижной фазе либо неизменной его концентрации изотермы сорбции ион-парных модификаторов близки к ленгмюровским. При концентрации иона тетрабутиламмония 0,007 моль/л поверхность сорбента покрыта им на 75%.

Обычно концентрация ион-парного модификатора при насыщении имеет порядок 100—1000 мкмоль/г [57, 237, 352]. При увеличении концентрации органического растворителя в подвижной фазе концентрация ионов додецилсульфата и тетрабутиламмония резко снижается [352]. Эти же авторы указывают, что сорбция ион-парного реагента на поверхности алкилсилика-геля имеет место только тогда, когда сорбент подвижной фазой не смачивается (т. е. она содержит мало органического растворителя) [349]. Если же сорбент смачивается, дополнительное введение в систему ион-парного модификатора способствует ускорению элюирования за счет нарастания взаимодействий в подвижной фазе. Интересные данные, указывающие на конкуренцию ион-парного реагента и органического модификатора, представлены в работе [402]. На рис. 4.41 изображена зависимость состава адсорбированной фазы на Лихросорбе RP8 от содержания н-пропанола в элюенте. Помимо н-пропанола элюент содержал 0,4% цетримида (цетилтриметиламмония бромид); рН 6,0. По мере увеличения концентрации н-пропанола в подвижной фазе его концентрация в неподвижной также увеличивалась, в то время как концентрация цетримида уменьшалась. Суммарная концентрация н-пропанола и цетримида сохраняла при этом относительное постоянство.

Величина и направление модифицирующего эффекта связаны с гидрофобностью и знаком заряда ион-парного модификатора (рис. 4.42). Если сорбат и модификатор имеют одинаковые заряды, введение последнего уменьшает удерживание. При разноименных зарядах удерживание увеличивается. Введение ион-парных агентов обычно немного уменьшает даже коэффициенты емкости нейтральных сорбатов [28, 58, 59, 67, 210, 365, 406].

При одинаковой молярной концентрации более выраженный модифицирующий эффект характерен для более гидрофобных ионов, с большим числом атомов углерода [59, 175, 204, 437]. В работе [58] показано, что разница в действии гомологичных ион-парных реагентов определяется различиями их собственных сорбционных свойств. Зависимость удерживания от концентрации получается одинаковой для любых модификаторов, если выразить концентрацию не в молях на литр подвижной фазы, а в молях на грамм сорбента.

Согласно кривой 3 рис. 4.42, зависимость удерживания от концентрации ион-парного реагента имеет максимум. Положение его важно знать хотя бы ориентировочно при выборе условий элюирования. Обсуждаемая кривая вблизи максимума достаточно пологая, поэтому, если речь не идет о тонкой оптимизации разделения сложной смеси, вполне можно воспользо-

средними данными из литературы [57, 156, 204, 209, 210, 262, 322, 323], Из них следует, что модифицирующий эффект всегда проявляется достаточно отчетливо, если концентрация ион-парного агента находится в пределах 1 —10 ммоль/л.

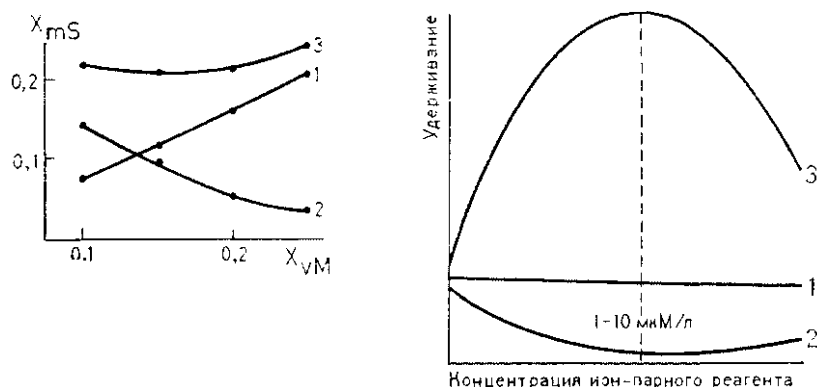


Рис. 4.41. Зависимость массовой доли X_{mS} н-пропанола (1) и бромида це-тилтриметиламмония (2) в неподвижной фазе от объемной доли пропанола в подвижной фазе. 3 — суммарное содержание пропанола и динамического модификатора.

Рис. 4.42. Типичные кривые, выражающие зависимость удерживания от концентрации ион-парного реагента в подвижной фазе: 1 — сорбат нейтрален; 2 — ион-парный реагент и сорбат имеют одинаковые заряды; 3 — заряды ион-парного реагента и сорбата противоположны.

На проявление модифицирующего эффекта существенное влияние оказывает рН подвижной фазы. Ассоциация модификатора с сорбатом, где бы она ни происходила, будет наиболее прочной, если оба они ионизированы. Поэтому рН подвижной фазы выбирают в зависимости от свойств сорбата и модификатора. На рис. 4.43 изображена типичная зависимость коэффициентов емкости слабой кислоты от рН подвижной фазы и концентрации модификатора. Нижняя кривая, соответствующая обычному обращенно-фазовому режиму, совпадает по форме с кривыми рис. 4.4. При добавлении в подвижную фазу динамического модификатора удерживание увеличивается. Более всего этот эффект выражен при рН около 6, где в достаточной степени ионизированы и сорбат, и модификатор. Рекомендуемые значения рН для ион-парной хроматографии приведены в табл. 4.38.

Систематические сведения о влиянии концентрации органического растворителя на коэффициенты емкости в литературе сравнительно немногочисленны, но дают основания полагать, что в этом режиме соблюдается уравнение (4.52). Отмечено [57], что при постоянной концентрации ион-парного модификатора в неподвижной фазе величины lgk' уменьшаются по мере роста концентрации органического растворителя в подвижной фазе. В работе [329] показано, что в ион-парном режиме выполняется уравнение (4.46). Данные работы [285] по хроматографии желчных кислот переработаны нами в координатах уравнения (4.52), получены коэффициенты корреляции, превышающие 0,99. Коэффициенты b и p этих уравнений подчинялись также компенсационной закономерности (4.55) (см. табл. 4.20). Компенсационные зависимости между энтальпией и энтропией сорбции могут быть использованы и для интерпретации механизма удерживания [329, 330].

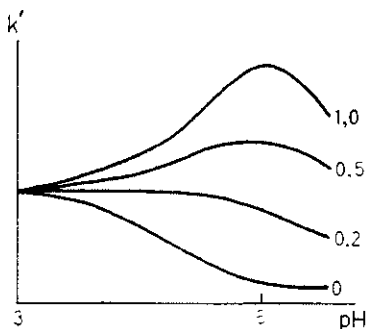


Рис. 4.43. Типичные зависимости удерживания слабой кислоты от рН подвижной фазы. Цифры на кривых — концентрация ион-парного реагента (ммоль/л).

Сложность процессов, протекающих при ион-парной хрома-тографии, препятствует созданию моделей, описывающих влияние структурных факторов сорбатов на удерживание. В данном режиме наряду с гидрофобностью сорбатов удерживание будет определяться и величинами pK_a , однако анализ относительной роли этих факторов осуществим с трудом. Имеются указания, что параметры моделей удерживания можно связать со вкладом определенных структурных фрагментов и л-константами гидрофобности Ганча [69].

При разделении сложных смесей, содержащих сорбаты различной основности и гидрофобности, в соответствии с существующими теоретическими представлениями трудно предвидеть с достаточной точностью отклик системы на изменение тех или иных условий опыта. Поэтому для поиска оптимальных режимов целесообразно применять статистические методы.

Таблица 4.38

Выбор pH подвижной фазы

Тип сорбата	pK_a	Интервал pH
Сильные кислоты	<2	2—7
Слабые кислоты	>2	6—7
Слабые основания	<8	2—5
Сильные основания	>8	2—7

В последние годы возрастает внимание исследователей к мицеллярной, или псевдофазовой, жидкостной хроматографии [43—45, 75, 120, 161, 260, 271, 324, 450]. Подвижные фазы, используемые в этом режиме, аналогичны применяемым в ион-парной хроматографии, но содержат поверхностно-активный модификатор в концентрациях, достаточных для образования мицелл. Молекулы сорбатов могут связываться с мицеллами, либо не связываться, либо выталкиваться электростатическими силами из окрестности мицеллы [43]. Первому типу взаимодействия соответствует резкое уменьшение удерживания, третьему — увеличение. Мицеллярная хроматография открывает перед экспериментатором дополнительные возможности варьирования удерживания и селективности. Так, например, в мицеллярном режиме удается элюировать с Ультрасфера ODS антрацен с помощью подвижной фазы, содержащей всего 3% пропанола. В условиях обычной обращенно-фазовой хроматографии для этого требуется не менее 30% органического растворителя. Как указано в работах [120, 271], применение мицеллярной хроматографии особенно выгодно при градиентном элюировании. Это связано с тем, что концентрация свободного поверхностно-активного агента в растворе почти постоянна, а увеличение элюирующей силы достигается за счет изменения концентрации мицелл. Объем элюента, требуемый для уравнивания таких систем, не превышает свободного объема системы от инжектора до входа в колонку. В качестве мицеллообразователя может использоваться неионогенное поверхностно-активное вещество — полиоксиэтилен-23-додеканол [75], а также цвиттерион-ный агент — пропансульфонат додецилдиметиламмония [324]. Установлено, что чувствительность такой системы к различиям сорбатов меньше, чем у обычных обращенно-фазовых систем. Следовательно, одним из перспективных направлений использования мицеллярной хроматографии может явиться анализ смесей соединений различной химической природы.

Предложена модель, описывающая процессы в мицеллярной хроматографии нейтральных молекул [44] и ионов [45] как распределение сорбата между тремя фазами: неподвижной, подвижной и мицеллами, перемещающимися по колонке с подвижной фазой.

По данным [161], при переходе процесса в мицеллярный режим может изменяться селективность разделения и даже порядок элюирования.

На примере ряда хелатов металлов показано, что эти сорбаты вступают во взаимодействие с неполярным ядром мицеллы

[260]. Недостаток мицеллярной хроматографии заключается в пониженной скорости массопередачи между мицеллой и растворителем [450], что ведет к снижению эффективности разделения. Повышение температуры колонки позволяет этот недостаток частично устранить.

Лигандообменная хроматография, впервые предложенная В. А. Даванковым [21, 107], также обычно основана на динамическом модифицировании. В настоящее время она является наиболее селективным средством разделения оптических изомеров. Основы этого метода и обзор достижений изложены в работах [7, 105, 106]. Возможны три варианта модификации в лигандообменных системах. Один из них предусматривает ковалентное связывание оптически активного агента, чаще всего аминокислоты, с матрицей сорбента. В систему с подвижной фазой вводят ионы металла-комплексообразователя, связывающиеся с оптически активным сорбентом. Металл выбирают таким образом, чтобы после связывания с сорбентом оставались еще две вакантные позиции для связывания с ионами сорбатов. В зависимости от конфигурации сорбатов при этом возможно образование двух диастереомерных комплексов. Например, если сорбент содержит L-аминокислоту, он может с рацемическим сорбентом образовать L,L- и L,D-комплексы. Поскольку устойчивость этих комплексов различна, средняя скорость миграции энантиомеров тоже различна.

Другой вариант реализации лигандообменного метода заключается не в ковалентном связывании аминокислоты с сорбентом, а в динамическом модифицировании неполярного сорбента гидрофобным производным оптически активной аминокислоты. Далее на нем фиксируется металл-комплексообразователь, и процесс протекает так же, как в первом случае.

Наконец, возможно модифицирование не сорбента, а подвижной фазы. В этом случае диастереомерные комплексы образуются в элюенте, а сорбент как таковой энантиоселективными свойствами не обладает. Разделение достигается за счет разной сорбируемости комплексов на неспецифической неподвижной фазе.

Наиболее впечатляющие практические результаты получены пока в лигандообменной хроматографии аминокислот. Между тем ясно, что принцип метода — общий, применим для соединений различных классов, и следует ожидать, что число задач, решенных с его помощью, будет постепенно возрастать.

К системам с динамическим модифицированием близки жидкость-жидкостные хроматографические системы, в которых неподвижная фаза генерируется подвижной, имеющей соответствующим образом подобранный состав [103, 207, 208]. Для приготовления таких систем перед экспериментом в отдельной емкости приводят в равновесие два или более взаимно несмешивающихся растворителя, например диметилсульфоксид и цикло-гексан. Если в качестве носителя неподвижной фазы используют силикагель, через колонку пропускают менее полярную фазу, т. е. насыщенный раствор диметилсульфоксида в цикло-гексане. При инертном носителе — октадецилсиликагеле в качестве элюента используют более полярную фазу. Компонент, лучше смачивающий носитель, образует на последнем пленку неподвижной жидкой фазы. Установлено, что системы этого типа обладают высокой воспроизводимостью и стабильностью.

Сопоставление коэффициентов емкости и распределения, найденных в аналогичных статических системах, доказало, что в подобных случаях образуются истинные системы жидкость-жидкость. Недостатком таких динамически генерированных неподвижных фаз является ограниченная возможность варьирования состава подвижной фазы. С другой стороны, их внедрение может значительно расширить арсенал селективности жидкостной хроматографии. Поэтому, несмотря на ряд ограничений, они могут найти применение в рутинном анализе либо препаративной хроматографии.

Ряд исследователей с помощью динамического модифицирования получили системы, по свойствам напоминающие системы с химически связанными неподвижными фазами. При этом часто отмечается высокая эффективность, стабильность и хорошая воспроизводимость результатов. Так, в работе [141] описано поведение полиядерных ароматических соединений на силикагеле и окиси циркония, находящихся в равновесии с типичным обращенно-фазовым элюентом — смесью метанола и воды (1:1). К элюенту добавляли различные количества цетилтриметиламмонийбромида. Введение этого реагента в подвижную фазу в концентрациях до 0,01—0,02 моль/л приводило к возрастанию удерживания. Порядок элюирования сорбатов —

обращенно-фазовый. Как видно из рис. 4.44, величины удерживания на силикагеле, модифицированном динамически, и октадецилсиликагеле различаются не слишком сильно. Коэффициент емкости на динамически модифицированной окиси циркония меньше, чем на аналогичным образом обработанном силикагеле, и разница примерно соответствует различной удельной поверхности этих сорбентов. Зависимость удерживания от концентрации метанола в подвижной фазе также напоминает закономерности, характерные для обращенно-фазовой хроматографии на алкилсиликагелях.

Системы, состоящие из силикагеля, динамически модифицированного цетилтриметиламмонийбромидом, изучены также в работах [177—179]. Показаны пути регулирования удерживания и селективности за счет изменения концентрации модифицирующего иона, ионной силы, рН, природы и концентрации органического растворителя в подвижной фазе. Приведены примеры разделения некоторых классов веществ, представляющих интерес в лекарственной химии: трициклических антидепрессантов, стероидов, бензоатов, барбитуратов [177]. Поверхностно-активные анионы, например додецилсульфат, также могут быть связаны аналогичным образом с поверхностью окиси алюминия [140]. При этом образуются системы, которые по отношению к нейтральным сорбатам ведут себя как обычные обращенно-фазовые. В то же время катионы сорбируются одновременно по гидрофобному и ионообменному механизмам.

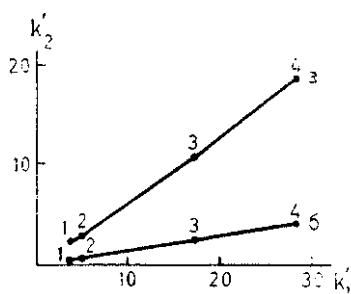


Рис. 4.44. Сравнение коэффициентов емкости на октадецилсиликагеле Гиперсил ODS (k'_1) и динамически модифицированных сорбентах (k'_2): силикагеле (а, удельная поверхность $200 \text{ м}^2/\text{г}$) и окиси циркония (б, удельная поверхность $9 \text{ м}^2/\text{г}$). Сорбаты: 1 — флуоренон; 2 — нафталин; 3 — антрацен; 4 — пирен. Данные из [141].

Согласно работе [142], динамическое модифицирование наблюдается также при использовании неионогенных поверхностно-активных веществ (твины 20, 40, 60, 80). Установлено, что они очень прочно связаны с поверхностью силикагеля и полностью снять модифицирующий слой, однажды образованный, не удастся даже несколькими литрами воды или водного метанола.

В работе [236] описано разделение лекарственных веществ ряда феноксипропаноламина на силикагеле, динамически модифицированном гидрофобными аминами. В отсутствие модификатора решающий вклад в удерживание вносит способность сорбатов к образованию водородных связей, а в режиме динамического модифицирования — их гидрофобность.

При введении добавок гидрофобных диаминов в подвижную фазу, состоящую из воды и органического растворителя, силикагелю удалось придать свойства, характерные для аминоалкилсиликагелей [79]. Порядок элюирования углеводов на таком сорбенте свидетельствует о том, что с помощью одной аминогруппы динамический модификатор связан с силикагелевой матрицей, а вторая обращена в сторону подвижной фазы и ответственна за удерживание сорбатов [440].

Авторы работ [424, 425], добавляя к элюенту обычной обращенно-фазовой хроматографии пентанол-1, получили на сорбентах Лихросорб RP2, Лихросорб RP8, Лихросорб RP18 системы, по характеристикам приближающиеся к распределительной хроматографии «жидкость—жидкость». При этом одновременно в ряде случаев удалось реализовать ион-парный распределительный режим. Этим способом можно хроматографировать трициклические антидепрессанты и ряд других аминов, причем система также довольно селективна при разделении *цис-транс*-изомеров [425].

Гидроокиси тетраалкиламмония использованы также для модификации силикагеля при элюировании органическими растворителями. Такие неводные системы могут использоваться с электрохимическими детекторами [163].

Динамическое модифицирование может служить не только средством радикального изменения механизма сорбции, но и средством регулирования селективности, подавления нежелательных процессов в колонке, приводящих к искажению формы пика. Так, в обычном обращенно-фазовом режиме добавка 0,005 моль/л нониламина к подвижной фазе позволила существенно сократить время анализа и улучшить форму пиков трициклических антидепрессантов [98, 257]. Влияние добавок различных карбоновых кислот при нормально-фазовой хроматографии детально изучено в работе [162]. Эти добавки значительно улучшают форму хроматографических пиков (особенно добавки карбоновых кислот с более длинной углеводородной цепью).

В работе [311] в качестве динамических модификаторов при хроматографии аминов были использованы краун-эфиры. Их введение в систему (0,01—0,05 моль/л) увеличивало удерживание аминов и аминокислот и практически не влияло на коэффициенты емкости нейтральных сорбатов. Согласно предложенной модели и экспериментальным данным, при дальнейшем повышении концентрации краун-эфира прирост удерживания постепенно прекращался и уступал место обратному процессу.

Модификация Лихросорба RP8 трибутилфосфатом и другими производными фосфора использована в работе [287] для изменения величин удерживания и селективности разделения ряда ароматических кислот и фенолов.

В отдельных случаях удается получить динамически модифицированные системы, обладающие энантиоселективностью. Например, полярный сорбент может быть модифицирован из неполярной подвижной фазы D-(-)-хинином [320]. На таком сорбенте достигнуто разделение камфорсульфоновой кислоты. Выбор системы растворителей в подобных случаях должен быть таким, чтобы другие процессы динамического модифицирования сводились к минимуму и сорбция определялась именно взаимодействием разделяемых молекул с молекулами хирального динамического модификатора, но не с другими компонентами системы. В частности, для успешных разделений такого рода необходимо, чтобы вода в системе отсутствовала.

Перечисленные в данном разделе примеры и варианты динамического модифицирования далеко не исчерпывают всего разнообразия новых сорбционных свойств, которые этим способом можно придать традиционным сорбентам. В то же время они убеждают в том, что возможности регулирования селективности разделения на относительно небольшом ассортименте обычных сорбентов могут быть значительно расширены с помощью этого простого и доступного метода.