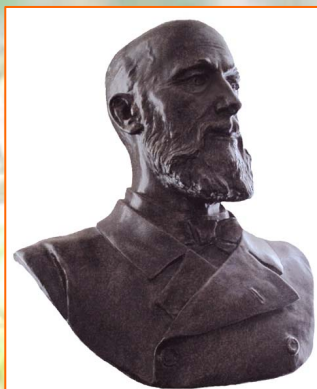
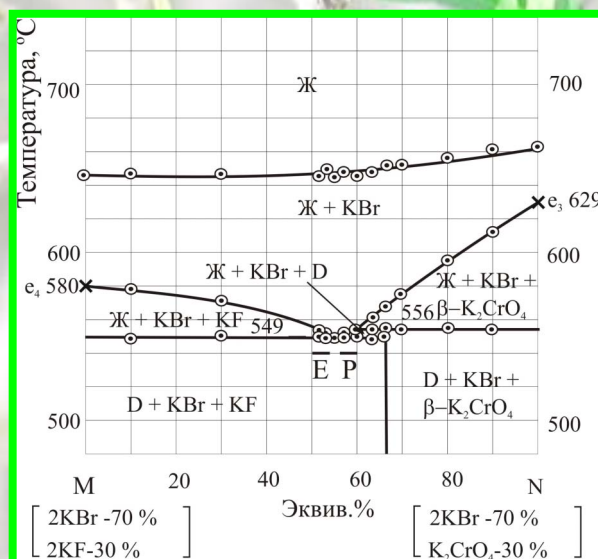


Бутлеровские сообщения

№2, том 24. 2011



ISSN 2074-0212



ISSN 2074-0948

International Edition in English:
Butlerov Communications



Гидрофобно-гидрофильный баланс жидкостных хроматографических систем

© Рудаков Олег Борисович^{1*+} и Рудакова Людмила Васильевна²

¹ Кафедра физики и химии. Воронежский государственный архитектурно-строительный университет. Ул. 20-летия Октября, 86. г. Воронеж, 394006. Россия.

Тел.: (473) 27-17-617. E-mail: rudakov@vgsu.vrn.ru

² Кафедра фармацевтической химии. Воронежская государственная медицинская академия. Ул. Студенческая, 10. г. Воронеж, 394000. Россия. Тел.: (473) 22-08-185.

*Ведущий направление; +Поддерживающий переписку

Ключевые слова: гидрофобно-гидрофильный баланс, сорбат, сорбент, элюент, коэффициент распределения в системе вода – *n*-октанол, высокоэффективная жидкостная хроматография, *U*-образные зависимости параметров удерживания.

Аннотация

Рассмотрены варианты априорных расчетов гидрофобно-гидрофильных свойств компонентов жидкостнохроматографических систем – сорбата, сорбента и элюента. Интерпретированы *U*-образные зависимости параметров удерживания от состава подвижной фазы наличием конкурентных нормально- и обращенно-фазовых механизмов удерживания сорбата.

Введение

Все три компонента хроматографической системы – сорбат, сорбент и элюент, характеризуются определенной степенью сродства между собой. В зависимости от соотношения гидрофильных и гидрофобных свойств компонентов реализуется преимущественно тот или иной механизм удерживания сорбата в хроматографической колонке – нормально- или обращенно-фазовый. Такое разделение процессов достаточно условно, ни тот, ни другой вариант хроматографии в чистом виде не осуществим, всегда наблюдается конкуренция между специфической сорбцией и сольвофобными взаимодействиями. Варьируя свойства компонентов хроматографической системы можно подобрать условия хроматографии, в которых заметный вклад вносят оба основных механизма удерживания. В результате этого зависимости времени или фактора удерживания от состава элюента могут иметь *U*-образный вид.

Таким образом, гидрофобно-гидрофильный баланс (ГГБ) хроматографической системы – важная характеристика межмолекулярного взаимодействия модифицированной поверхности сорбентов с молекулами сорбата и подвижной жидкой фазой, правильная оценка которой позволяет управлять хроматографическим процессом.

Часто оперируют понятием *полярность*: полярный сорбент (напр., «голый» силикагель), полярная жидкость (вода), полярный сорбат (аминокислота), неполярный сорбент (напр., октадецилированный силикагель), неполярная жидкость (изооктан), неполярный сорбат (триглицерид). Вместе с тем корректного общепринятого (универсального) определения полярности нет. Еще сложнее ситуация обстоит с количественными критериями полярности. Так, под полярностью понимают в первую очередь наличие в структуре молекулы неионогенных и ионогенных полярных групп (-NO₂, -NH₂, -NH-C(O)R, -OH, -CN, -C(O)OH, -SO₃H и др.). При этом имеет значение не только наличие полярных групп, но и их относительно высокая массовая доля в молекуле, направление и характер индуктивных и мезомерных электронных эффектов, взаимное расположение в скелете молекулы (*геми*-, *вици*-, *орто*-, *мета*-, *пара*- и так далее). Чем меньше относительная доля углеводородного фрагмента, чем полярней группы, чем их больше в молекуле, чем выше дипольный момент, тем полярней сорбат. Количественно полярность молекулы сорбата можно выразить *дипольным моментом*. В настоящее

ГИДРОФОБНО-ГИДРОФИЛЬНЫЙ БАЛАНС ЖИДКОСТНЫХ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ СИСТЕМ ____ 22-32
время имеется большая база экспериментальных измерений дипольного момента, на основе современных квантовохимических подходов разработаны программы, позволяющие достаточно точно рассчитать μ для соединения, не прибегая к экспериментальным измерениям, например, широко известный «*ChemBioOffice 2010*». Дипольный момент играет важную роль в электростатической теории удерживания, которую развивает Сычев [1], однако тесные корреляции между μ сорбата и его удерживанием наблюдаются редко, что указывает на то, что μ не может полноценно охарактеризовать совокупность полярных свойств сорбатов.

Для характеристики структурных параметров аналитов и оценки баланса их гидрофильных и гидрофобных свойств Шатц предложил использовать параметр H – критерий гидрофобности, который основан на том, что размер молекул аналита определяется в первую очередь числом атомов углерода, а снижение гидрофобности при введении в его молекулу полярной функциональной группы характеризуется для полифункциональных соединений не столько специфической гидрофильностью группы, сколько самим фактом ее наличия [2].

$$H = n_h - 4\sqrt{n_f}, \quad (1)$$

где n_h – число элементарных гидрофобных фрагментов в молекуле, то есть сумма атомов углерода и галогенов, а n_f – число полярных групп.

Было принято допущение, что каждый атом галогена эквивалентен по своему влиянию на гидрофобность вещества как одна метиленовая группа, а атомы серы в тиоэфирах и меркаптанах не повышают и не снижают гидрофобности молекулы в целом. Полярные группы, расположенные в непосредственном соседстве, рассматриваются как одна полярная группа. Конечно же, гидрофобность атомов галогенов и серы сильно зависит от характера остальной части молекулы и полярность функциональных групп в соответствии с теорией химического строения чувствительна к их взаимному расположению.

Поэтому критерий H не может претендовать на детальное описание гидрофобности в узких группах веществ, мало отличающихся по структуре, а является универсальной мерой гидрофобности для сравнительного описания веществ, сильно отличающихся по строению. Шатцем показано в [2], что величина H линейно коррелирует с параметром $\log P$ (логарифмом коэффициента распределения вещества в системе 1-октанол – вода).

Коэффициент корреляции для рассмотренного им массива данных составил $R = 0.92$. Разброс точек обусловлен положительными или отрицательными отклонениями от аддитивной модели учета полярных функциональных групп. Чем удаленней друг от друга полярные группы, тем лучше соблюдается аддитивность. Что касается гомологических рядов, то для них n_f – величина постоянная, а значит изменение гидрофобности связано только с числом атомов С, так как число атомов галогенов равно по определению. Разветвленность, насыщенность, наличие циклов в углеводородном радикале параметр H также не учитывает, что является еще одной причиной ухудшения корреляции.

Наряду с экспериментальным методом определения $\log P$, введенным в научный обиход Ганчем и Лео, как мера гидрофобности органических соединений [3], разработаны методы априорного расчета $\log P$ по вкладам атомов, структурных фрагментов и функциональных групп. В биохимии, фармацевтической отрасли активно используются расчетные значения $\log P$. Методы расчета заложены в ряде химических программ, например, в программе *ChemBioOffice 2010*, разработанной корпорацией *CambridgeSoft Corporation* [4]. Методы базируются на статистических данных о более чем 100 структурных вкладах в гидрофобность, оцененных методом наименьших квадратов для ≈ 1000 соединений. Стандартное отклонение в оценке составляет менее 0.5 единиц $\log P$. Программа позволяет обрабатывать молекулы, содержащие атомы углерода, водорода, кислорода, азота, серы, селена, фосфора и галогенов. Еще один метод базируется на 222 атомных вкладах, вычисленных по экспериментальным данным для 1868 молекул.

Этот метод позволяет вычислять $\log P$ со стандартным отклонением 0.43 единиц $\log P$ и может обработать молекулы, содержащие углерод, водород, кислород, азот, серу, галогены и

атомы фосфора. Если этот метод применять к молекулам с внутренними водородными связями, стандартное отклонение выше (0.83 единиц $\log P$). Корпорация BioByte запатентовала оригинальный алгоритм расчета $\log P$, основанный на современных квантовохимических представлениях и принципах.

В этом алгоритме, построенном не на статистических данных, а на квантовохимических моделях, учитывается возможность образования внутримолекулярных водородных связей, индуктивный и мезомерный электронные эффекты и стерический фактор, влияющие на гидрофобность соединения. Для того чтобы отличать расчетные величины логарифма коэффициента распределения, полученные по указанному алгоритму, их обозначают как $ClogP$ [4]. Расчет величин $ClogP$ для различных химических структур является стандартной процедурой в фармацевтической химии, в токсикологии и экологической оценке опасности соединения, в скрининге веществ на биологическую активность.

При наличии специализированного программного обеспечения компьютерные расчеты $\log P$ и $ClogP$ не вызывают затруднений. Привлекательность упрощенного критерия Шатца H заключается в том, что в отличие от экспериментального определения или сложных алгоритмов расчета $\log P$ и $ClogP$, произвести оценку H можно даже на калькуляторе. При этом он, как сказано выше, тесно коррелирует с указанными критериями гидрофобности. Кроме того программы пока не пригодны для расчета $\log P$ и $ClogP$ для высокогидрофобных веществ, например липидов, каротиноидов, ПАВ, производных фуллерена и т.д.

В табл. 1. приведены примеры значений H , $\log P$ и $ClogP$ для ряда наиболее широко известных органических соединений природного и синтетического происхождения. Как показали расчеты, параметр H органических соединений с молекулярной массой от 30-900 варьирует в пределах от -4.0 до 60-70.

Органические соединения с отрицательными значениями H и близкими к нулю (<0.5) или отрицательными значениями $\log P$ и $ClogP$ можно отнести к гидрофильным (полярным) соединениям.

Они неограниченно или частично растворяются в воде, а значит, для их хроматографии пригодны обращено-фазовые подвижные фазы (ПФ), содержащие воду. Сорбаты с $H=0-4.0$ (величины $\log P$ и $ClogP$ равны 0.5-2.0) обозначим низкогидрофобными. Последние, как правило, хорошо растворяются в полярных растворителях и плохо в гексане. Функциональные производные углеводов с $M=100-500$ имеют гидрофобность H порядка 4.0-20 (величины $\log P$ и $ClogP$ равны 2.0-6.0), их полярность существенно зависит от характера полярных групп и их взаимного расположения, априорно предсказать по величине H их способность растворяться в тех или иных растворителях затруднительно. Наблюдается тенденция – с увеличением величины H растворимость в воде понижается, повышается растворимость в универсальных и неполярных растворителях.

Высокогидрофобные соединения с $H=20-60$ (величины $\log P$ и $ClogP >6.0$) практически не растворяются в воде, а нередко и в гексане. Для них характерна повышенная растворимость в малополярных растворителях, из которых особо выделим ТГФ и хлороформ. Эти же растворители растворяют и многие высокомолекулярные соединения, в элементарных звеньях которых имеются малополярные группы.

К сожалению, расчеты $\log P$ и $ClogP$ для высокомолекулярных соединений невозможны, их можно определить только экспериментально. Расчет усредненной величины H для полимеров по формуле (1) возможен, но теряет физический смысл. Если оценивать гидрофобность только элементарного звена H для гомополимеров или усредненную гидрофобность элементарного звена для гетерополимеров, можно условно разделить полимеры на гидрофобные и гидрофильные. Так, для полисахаридов, полипептидов, нуклеиновых кислот, полиэлектролитов элементарные звенья имеют отрицательные значения H , такие полимеры могут растворяться в воде, водных растворах солей, кислот и оснований и хроматографироваться водными ПФ. Их следует отнести к гидрофильным полимерам. Полимеры с положительной величиной H элементарного звена однозначно гидрофобны и способны растворяться в универсальных или малополярных растворителях, для их разделения применяют эксклюзионную хроматографию при помощи неводных элюентов.

Возможно ли определять ГГБ сорбентов, используя параметры H , $\log P$ и $C\log P$? Если поверхностные функциональные группы или иммобилизованные молекулы сильно взаимодействуют с водой, полярными группами сорбата и полярными компонентами элюента, например, образуют водородные связи, можно говорить о гидрофильности, а при слабом взаимодействии привитой неподвижной фазы с полярными веществами и компонентами подвижной фазы – о гидрофобности поверхности сорбента.

Табл. 1. ГГБ некоторых органических соединений

Соединение	H	$\log P$	$C\log P$	Соединение	H	$\log P$	$C\log P$
Адреналин	1.0	0.75	-0.38	2-нафтол	6.0	2.87	1.74
Аланин	-2.7	-2.83	-3.12	2-нафтойная кислота	7.0	2.59	3.06
Анилин	2.0	0.90	0.81	2-нафтиламин	6.0	2.27	1.99
Антрацен	12.0	4.03	4.49	Никотин	4.3	0.93	0.88
Ацетофенон	4.0	1.35	1.58	Пирокатехин	0.3	0.91	-0.1
Бензойная кислота	3	1.86	1.89	Пиперидин	1.0	0.6	1.39
Валин	-0.7	-0.01	-2.29	Пирогаллол	-0.9	0.87	-0.70
Гваякол	1.3	1.33	1.32	Резорцин	0.3	0.80	-0.1
Гидрохинон	0.3	0.56	-0.1	Сахарин	1.4	0.35	0.72
Глюкоза	-2.9	-2.38	-2.42	Тиофен	4.0	1.81	1.79
2,4-динитроанилин	-0.9	0.97	1.75	Тиофенол	2.0	2.22	1.92
2,4-динитрофенол	-0.9	1.4	1.82	Тирозин	2.1	-2.15	-2.22
Дифениламин	8.0	3.44	3.62	Триптофан	4.1	-1.07	-1.57
Диэтилфталат	6.3	2.46	2.62	Треонин	-2.9	-1.43	-2.43
Индол	4.0	2.13	2.18	Фенилаланин	3.3	-1.49	-1.56
Ионол	12.0	5.54	5.43	Фенол	2.0	1.64	1.48
Каротин	40.0	10.84	15.23	Флороглюцин	-0.9	0.87	-0.77
Кофеин	0.0	-0.65	-0.35	Фруктоза	-2.9	-3.29	-2.83
Ксилит	-3.9	-2.4	-1.93	Фуллерен-60	60	-	9.18

Понятие ГГБ может быть отнесено не только к привитым молекулам, но и к сорбенту в целом. Так, привитые молекулы могут включать гидрофильные полярные группы и гидрофобные углеводородные цепи. Часть поверхности сорбента может быть модифицирована гидрофобными группами, а немодифицированная часть сохраняет силанольную активность (речь идет о сорбентах на основе силикагеля) или подвергнута дополнительному модифицированию (эндкеппингу) полярными или неполярными модификаторами. Соотношение полярных и неполярных фрагментов в привитых молекулах, соотношение модифицированной, эндкеппированной и немодифицированной поверхности сорбента и определяет его ГГБ.

Известны различные методы экспериментального определения гидрофильности или гидрофобности поверхностей модифицированных сорбентов [5], которые, однако, не пригодны для практического хроматографиста, так как он имеет дело с промышленно упакованным в колонку сорбентом, ему не известна, как правило, технология получения того или иного привитого сорбента (ноу-хау фирмы-производителя), а только тип модифицирующего органического фрагмента, наличие и характер эндкеппинга.

Вместе с тем ГГБ сорбента играет важную роль в селективности хроматографической системы, в конкуренции нормально-фазового (NP) и обращенно-фазового механизмов (RP) хроматографического разделения бифильных сорбатов. В хроматографической практике появились сорбенты, у которых между силикагелем и привитой гидрофобной группой (C_{18} -, C_8 -, Ph- и др.) находится относительно полярный фрагмент (специальная полярная вставка), а кроме этого остаточные силанольные группы могут быть эндкеппированы не триметилхлорсиланом для подавления силанольной активности, а соединениями, придающими поверхности сорбента гидрофильные свойства.

К такому смешанному типу можно отнести сорбенты Synergy Hydro-RP и Synergy Polar-RP (изготовитель Феноменекс, США) и др. Обращенно-фазовые хроматографические системы с подобными сорбентами обладают повышенной гидрофильной селективностью, сохраняя при этом и метиленовую (гидрофобную) селективность. Эти сорбенты нашли применение в разделении стероидов, пестицидов, афлатоксинов, органических кислот. Наличие и гидрофоб-

ных, и гидрофильных функциональных групп на поверхности сорбента вносит элемент непредсказуемости в порядок удерживания полифункциональных сорбатов.

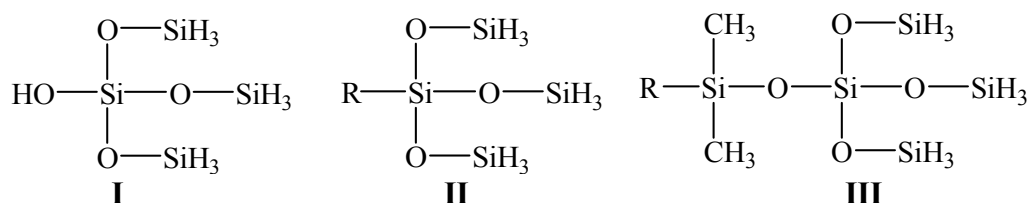
В настоящее время нет общепринятых количественных критериев оценки ГГБ сорбентов. Чаще всего для этого применяют оценки, полученные по параметрам удерживания реперных веществ. Вместе с тем, в связи с появлением большого числа сорбентов, необходимы объективные и количественные способы оценки их полярности (гидрофобности), используя которые можно было бы прогнозировать хроматографические свойства того или иного сорбента.

Результаты и их обсуждение

По нашему мнению, для силикагелей с разными привитыми фазами критерий Шатца и критерий Ганча-Лео вполне применимы.

Для этой цели нужно выбрать модельные соединения с такими же функциональными группами, как у привитой фазы и по формуле (1) или с помощью программы *ChemBioOffice 2010* найти логарифм коэффициента распределения этих веществ в системе *n*-октанол – вода.

Ниже приведены структуры, предлагаемые нами для расчетов *logP* или *ClogP*. Исходя из того, что индуктивные эффекты быстро затухают при их распространении по цепи, влиянием удаленных от поверхностной группы атомов матрицы силикагеля можно пренебречь.



Формула **I** предназначена для оценки ГГБ силанольной группы, **II** или **III** – для модифицирующей группы.

В табл. 1 приведены результаты расчетов критериев гидрофобности сорбентов $H_{H\Phi}$, $ClogP_{H\Phi}$, которые хорошо коррелируют между собой ($H_{H\Phi}=1.55ClogP_{H\Phi}+0.52$, коэффициент корреляции $R = 0.96$). В отличие от $H_{H\Phi}$ величина $ClogP_{H\Phi}$ учитывает электронные эффекты и строение полярной группы. Так как для сорбентов степень покрытия поверхности может отличаться, ГГБ можно определять по аддитивной схеме (2) или (3). Так, если известны результаты эндкеппинга (степень покрытия поверхности привитыми группами и остаточная силанольная активность), их можно учесть, оценив гидрофобность сорбента по уравнениям:

$$ГГБ(H)=a_1H_{OH}+a_2H_{R1}+a_3H_{R2}, \quad (2)$$

$$ГГБ(ClogP)=a_1ClogP_{OH}+a_2ClogP_{R1}+a_3ClogP_{R2}, \quad (3)$$

где a_i – доля немодифицированной, эндкеппированной и привитой поверхности, $ClogP_i$ – величины $ClogP$ для соответствующих модельных соединений.

Например, если степень покрытия силикагеля группами C_{18} составляет 50%, тогда $ГГБ(H) = 0.5 \cdot 14 - 0.5 \cdot 4 = 5.0$, а если остаточная поверхность эндкеппирована группами C_1 , тогда получаем $H_{H\Phi} = 0.5 \cdot 14 - 0.4 \cdot 1 = 6.5$. Этот гипотетический пример не учитывает тот факт, что максимальная степень модифицирования поверхности силикагеля не превышает 50% [5], то есть эндкеппинг не решает полностью задачу устранения силанольной активности.

Справедливости ради следует отметить, что из корреляции между $ГГБ(H)$ и $ГГБ(ClogP)$ существенно выпадают расчетные данные $ГГБ(H)$ для перфторированных радикалов. Они имеют аномально высокие значения, но возможно, что для перфторированных структур расчеты $ClogP$ ненадежны. Алгоритм *BioBite*[®] так же не дает возможности рассчитать $ClogP$ для структур с 30-ю атомами С и выше.

Можно ли провести расчет H , $logP$ или $ClogP$ для компонент ПФ? Да, кроме воды, для нее нельзя определить и рассчитать $logP$ (табл. 3).

Таким образом, предложенные шкалы ГГБ могут быть полезными при оценке свойств не только монопривитых фаз, но и гетеропривитых фаз и поверхности сорбента в целом. Расчеты

ГИДРОФОБНО-ГИДРОФИЛЬНЫЙ БАЛАНС ЖИДКОСТНЫХ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ СИСТЕМ ____ 22-32
 не привязаны к величине «активности сорбента», которая сильно зависит от того, чем смочен сорбент, произошла ли его дезактивация или наоборот активация за счет динамического модифицирования. Эти вторичные факторы, безусловно, очень важны в контексте описания конкретной хроматографической системы, но исходной информацией о сорбенте является та, которая характеризует его химическое строение.

Табл. 2. ГГБ поверхностных функциональных групп, привитых на силикагель

Обозначение	Привитая фаза	H_{HF}	$ClogP_{HF}$
«голый» силикагель	$\equiv Si-OH$	-4	-2.17
C ₁	-CH ₃	-1	-0.25
Diol	-CH(OH)CH ₂ -OH	0	-1.15
Nitryl, CN	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -CN	0.34	-0.03
Nitro, NO ₂	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -NO ₂	0.66	-0.06
Amino, NH ₂	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -NH ₂	0.66	-0.21
C ₄	-CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	2	1.34
C ₈	-CH ₂ (CH ₂) ₆ CH ₃	4	3.45
Phenyl	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -C ₆ H ₅	7	2.23
Fluorphase PFP	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -C ₆ F ₅	12	2.73
ODS, C ₁₈	-CH ₂ (CH ₂) ₁₆ CH ₃	14	8.74
Fluorphase RP	-CF ₂ (CF ₂) ₆ CF ₃	23	5.23
C ₃₀	-CH ₂ (CH ₂) ₂₈ CH ₃	28	-

Табл. 3. Эмпирическая миксотропная серия растворителей и критерии гидрофобности в качестве меры смешиваемости

Растворители	$logP_{эксп}$	$logP$	$ClogP$	H
Вода			-1.38	-4
Муравьиная кислота	-0.54	-0.42	-0.54	-3
Ацетонитрил	-0.34	0.17	-0.39	-2
Метанол	-0.65	-0.27	-0.87	-3
Уксусная кислота	-0.21	-0.31	-0.19	-2
Этанол	-0.3	0.07	-0.24	-2
Изопропанол	0.05	0.38	0.07	-1
Ацетон	-0.24	0.2	-0.21	-1
1,4-Диоксан	-0.42	-0.31	-0.39	-1.7
Тетрагидрофуран	0.46	0.4	0.53	0
<i>трет</i> -Бутанол	0.36	0.6	0.47	0
2-Бутанон	0.29	0.86	0.32	0
Этилацетат	0.73	0.29	0.71	0
Диэтиловый эфир	0.89	0.76	0.87	0
1-Октанол	2.97	2.64	2.94	4
Бутилацетат	1.82	1.2	1.77	2
Нитрометан	-0.35	-	-0.28	-3
Хлористый метилен	1.15	1.01	1.25	3
Хлороформ	1.94	1.67	1.95	4
1,2-Дихлорэтан	1.48	1.66	1.46	4
Бензол	2.13	2.03	2.14	6
Трихлорэтилен	2.29	2.19	2.63	5
Толуол	2.69	2.52	2.64	7
Тетрахлорметан	2.83	2.86	2.88	5
Гексан	3.9	3	3.87	6
Гептан	4.66	3.42	4.4	7

В табл. 3 приведены растворители в порядке смешиваемости – эмпирически установленного миксотропного ряда. Критерии Шатца и Ганча-Лео позволяют прогнозировать взаимную растворимость. Растворители с отрицательными или близкими к нулю критериями полностью или частично смешиваются между собой, а растворители с положительными критериями гидрофобности неограниченно или частично смешиваются между собой. Чем больше разница в значениях критерия, тем маловероятней совместимость.

Диапазон ГГБ растворителей, как низкомолекулярных соединений, сравнительно узок. В жидкостной хроматографии для жидкости (элюента) на первый план выходит более чувствительный показатель – ее *элюирующая способность*, которая определяется в первую очередь полярностью растворителей. В условиях *NP* элюирующая сила возрастает с увеличением полярности ПФ, а в условиях *RP*, наоборот, чем выше полярность ПФ, тем меньше ее элюирующая способность. Первым критерием полярности растворителей, который был использован в хроматографии еще ее основоположником М.С. Цветом, является *диэлектрическая проницаемость* ϵ_r . Несовершенством ϵ_r является невозможность с ее помощью описать молекулярные взаимодействия между растворителем и растворенным веществом на молекулярном уровне. *Дипольный момент* μ , в отличие от ϵ_r , определяет полярность вещества на молекулярном уровне, он характеризует электрические свойства молекулы как системы заряженных частиц.

Дипольному моменту сорбата и полярного модификатора уделяет большое внимание в своих теоретических выкладках Сычев [3]. Вместе с тем, прямое применение этого параметра как самостоятельной независимой переменной в эмпирических зависимостях «удерживание – дипольный момент модификатора ПФ» позволяет говорить лишь о тенденциях, которые проявляют растворители, молекулы которых обладают высоким или низким дипольным моментом. Чаще всего тесных корреляций с параметрами удерживания дипольный момент ни сорбата, ни модификатора не дает.

Другим широко известным критерием полярности, который относительно успешно применяют в жидкостной хроматографии для оценки элюирующей силы растворителей, является *параметр растворимости Гильдебранда* δ_T , который характеризует количество работы, затрачиваемой на отделение молекул растворителя друг от друга. К недостаткам параметра растворимости δ_T с хроматографической точки зрения можно отнести не единичные отклонения прогнозируемой им элюирующей силы от экспериментально наблюдаемой. Все чаще стал применяться в жидкостной хроматографии *сольватохромный параметр Димрота-Райхардта* $E_T(30)$.

Снайдер предложил использовать *параметр полярности* P' , который надо определять экспериментально методом газовой хроматографии. Эти критерии проанализированы в качестве критериев полярности и элюирующей силы в работах [4, 6]. Они устанавливают похожие в большей или меньшей степени порядки изменения полярности растворителей, то есть между разными шкалами полярности (элюотропными рядами) прослеживаются приближенные корреляции. Вместе с тем, в отдельных случаях некритичное использование конкретного критерия может приводить к промахам в оценке хроматографических свойств ПФ, так как ни один из них не учитывает в полной мере всего комплекса взаимодействий и явлений, сопутствующих хроматографическому процессу.

Рудаковым в работе [6] предложен *редуктивный критерий полярности* P_N , который получен путем обобщения нормализованных параметров P' , δ_T , ϵ_r и $E_T(30)$ большого числа растворителей (табл. 4). Для практического удобства максимальное значение критерия полярности для воды приняли равным 100, а минимальное значение P_N для декана приравняли нулю. Термин *редуктивный* подчеркивает основной смысл критерия – сокращение (редукция) числа переменных, используемых в оценке полярности. В рамках безразмерной обобщенной шкалы полярности P_N достигается эффект сглаживания аномально низких или, наоборот, высоких значений полярности отдельных растворителей, обусловленных специфической чувствительностью того или иного критерия к одной из парциальных полярностей. Этот критерий тесно коррелирует с эмпирическими параметрами элюирующей силы растворителя как на силикагеле, так и на силикагеле, модифицированном группами C_{18} – параметрах $\epsilon^o(SiO_2)$ и $\epsilon^o(C_{18})$ соответственно. В [6] показано, что для оценки полярности (элюирующей силы) смешанных ПФ можно с достаточно хорошим приближением использовать аддитивные значения P_N .

Рассмотрим на примере фенола, как может влиять ГГБ на параметры удерживания в водно-ацетонитрильных элюентах. В работе [7] приведены экспериментальные значения объемов удерживания V_R (мкл) фенолов различного строения в ПФ вода – ацетонитрил на

ГИДРОФОБНО-ГИДРОФИЛЬНЫЙ БАЛАНС ЖИДКОСТНЫХ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ СИСТЕМ _____ 22-32
 Силасорбе NH₂, а в работе [8] – на Силасорбе C₁₈ в условиях микроколоночной ВЭЖХ. Установлено, что применение NH₂-фазы приводит к U-образным зависимостям $V_R=f(\varphi_2)$ с минимумом при φ_2 , близкой к 0.7.

Табл. 4. Редуктивный критерий полярности растворителей P_N

Растворитель	P_N	Растворитель	P_N
Декан	0.00	1-Октанол	28.85
Изооктан	0.32	Бутанол	29.03
Пентан	0.45	Пиридин	29.04
Циклогексан	0.71	<i>трет</i> -Бутанол	29.12
Гексан	0.85	1-Пентанол	31.25
Гептан	1.44	Бензонитрил	31.72
Триэтиламин	6.24	Ацетон	32.18
Тетрахлорметан	7.29	Нитробензол	33.00
Сероуглерод	8.25	1-Бутанол	36.29
Диизопропиловый эфир	9.02	Изопропанол	36.72
Диэтиловый эфир	11.73	Уксусная кислота	38.45
Толуол	12.07	1-Пропанол	39.09
Бензол	13.44	ДМФА	42.88
Хлорбензол	16.65	Этанол	43.97
Бромэтан	16.72	Ацетонитрил	44.66
ТГФ	21.00	Нитрометан	46.72
1,4-Диоксан	21.71	ДМСО	48.41
Этилацетат	21.84	Метанол	54.34
Хлороформ	22.00	Этиленгликоль	62.77
Метиленхлорид	23.04	Формамид	83.83
Дихлорэтан	24.88	Вода	100.00

Такое хроматографическое поведение можно объяснить конкуренцией между распределительным и сольвофобным механизмами удерживания. В распределительном (гидрофильном) варианте сорбции CH₃CN следует рассматривать как разбавитель, а воду – как полярный компонент ПФ с большей, чем у ацетонитрила элюирующей силой, который способствует десорбции фенолов из адсорбционного слоя у поверхности сорбента. С другой стороны, увеличение концентрации воды в элюенте приводит к усилению гидрофобного эффекта. Гидрофобные фрагменты фенолов из полярной среды элюента вытесняются к менее полярной аминопропиловой щетке, модифицирующей поверхность сорбента.

$$V_R = (1-x)V_{NP} + xV_{RP}, \quad (4)$$

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

В условиях нормально-фазовой ВЭЖХ объемы удерживания фенолов можно адекватно описать уравнением инверсии 2-го порядка

$$V_R = V_M + a/P + b/P^2, \quad (5)$$

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

С увеличением объемной доли CH₃CN вклад распределительного механизма сорбции в величину V_R возрастает, а вклад гидрофобной составляющей, напротив, падает. Таким образом, результирующее значение V_R можно представить в виде суммы вкладов.

$$P = \sum \varphi_i P_i, \quad (6)$$

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

В обращенно-фазовой ВЭЖХ в чистом CH_3CN на Силасорбе C_{18} объемы удерживания V_R фенолов стремятся к мертвому объему V_M . С повышением полярности подвижной фазы (увеличением содержания воды) величина V_R фенолов возрастает. Для описания зависимости V_R от полярности элюента вода – ацетонитрил пригодны зависимости

$$\log V_R = c + dP, \tag{7}$$

где c и d – эмпирические коэффициенты.

Приняв (5) и (7) в качестве частных функций, описывающих изменения V_{NP} и V_{RP} при увеличении полярности ПФ, обобщенную функцию, характеризующую результат влияния двух механизмов сорбции на суммарный объем V_R , получим:

$$V_R = (1-x)(V_M + a/P + b/P^2) + x10^{(c+dP)} \tag{8}$$

где x – эмпирический коэффициент, учитывающий вклад двух трендов в наблюдаемый объем удерживания.

При $x = 0$ уравнение (8) вырождается в уравнение (5), при $x = 1$ уравнение (8) преобразуется в уравнение (7). Заменяв эмпирический коэффициент c в уравнении (8) значением $\log V_M$, получим

$$\log V_R = \log V_M + dP, \tag{9}$$

Уравнение (8) в итоге преобразуется в уравнение (10).

$$V_R = (1-x)(V_M + a/P + b/P^2) + x10^{(\log V_M + dP)} \tag{10}$$

В [7] установлено, что (10) адекватно описывает эксперимент ($R > 0.99$). Уравнение (10) позволяет оценить соотношение величин V_{NP} и V_{RP} при разных составах подвижной фазы ацетонитрил – вода. Оказалось, что в чистом CH_3CN доля V_{RP} для фенолов составляет не более 9% от суммарного V_R . При увеличении содержания воды в подвижной фазе до 60%, доля обращенно-фазовой составляющей V_{RP} возрастает до 30-40%.

Найдено четкое отличие хроматографических свойств бензола от свойств фенолов. Отсутствие группы ОН в бензоле исключает образование Н-связей с силанольными группами силикагеля и водой в адсорбционном слое, поэтому для него оказалось характерной повышенная доля V_{RP} (25-53%) во всем диапазоне полярности подвижной фазы [7]. Сравнительно небольшие размеры молекулы и отсутствие полярной группы позволяют реализовать сольвофобное удерживание бензола даже короткими аминопропильными линкерами.

Зависимости (10), по всей видимости, позволяют охарактеризовать остаточную силанольную активность модифицированных силикагелей (табл. 2, 3). Так, при расчете коэффициентов уравнения (10) взяли данные V_M и V_R из работы [8], оказалось, что зависимости (10) описывают эксперимент [8] лучше, чем зависимости (7), о чем свидетельствуют более высокие коэффициенты корреляции ($R = 0.98-0.99$), наблюдаемые для модели (10). Найдено, что в чистом CH_3CN в объем удерживания фенолов только 10-20% вносит свой вклад V_{NP} , который при добавлении воды в элюент быстро сводится на нет. Из этого следует, что хроматографическое поведение фенолов на октадецилированном силикагеле в первом приближении подчиняется обращенно-фазовому характеру удерживания.

Однако при высоких концентрациях CH_3CN становится заметна конкуренция с распределительным механизмом. Коэффициент c уравнения (7) оказался близок значению V_{NP} в чистом ацетонитриле, то есть характеризует наличие нормально-фазового удерживания при $\varphi_2 = 1$, иначе говоря, в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ в первом приближении выполняется зависимость:

$$\log V_R = \log V_{NP} + dP \tag{11}$$

Чем меньше коэффициент c , тем меньше соединение способно удерживаться за счет участия в сорбционных процессах полярных групп, чем выше гидрофобность сорбата, тем сильнее сольвофобный эффект. В условиях обращенно-фазовой и гидрофильной хроматографии вклад специфических и неспецифических взаимодействий молекул фенолов с молекулами ПФ в объеме и в адсорбционном слое зачастую соизмерим с вкладом неспецифических взаимодействий молекул сорбата с гидрофобной поверхностью неподвижной фазы.

Табл. 5. Эмпирические коэффициенты уравнения (10) для хроматографической системы сорбат – ацетонитрил – вода – Силасорб NH₂ (микроколлонка). По данным [7, 8].

Сорбент	Сорбат	x	a	b	d
Силасорб NH ₂	Фенол	1.71E-07	-76.59	51.23	8.362
Силасорб C ₁₈	Фенол	0.479	-209.60	70.09	0.736

Табл. 6. Относительная величина V_{RP} (%) для фенола в системе ацетонитрил – вода – сорбент (микроколлонка). По данным [7, 8].

Сорбент	Объемная доля ацетонитрила в элюенте, ϕ_2					
	1	0.9	0.8	0.7	0.5	0.4
Силасорб NH ₂	0.1	0.2	0.7	2.2	17.4	38.5
Силасорб C ₁₈	90.7	95.7	98.5	99.6	99.7	99.3

U-образные зависимости параметров удерживания сорбатов научились получать на сорбентах разного типа, их даже стали использовать в качестве способа оценки остаточной силанольной активности на октадецилированных сорбентах в лабораториях фирмы-производителя колонок «Supelco» [9].

Как правило, такие зависимости характерны для органических оснований и кислот, аминов и аминокислот, имеющих дифильное строение [9-13].

Выводы

Для анализа гидрофобно-гидрофильного баланса жидкостной хроматографической системы, для систематизации хроматографических баз данных и прогнозирования хроматографического поведения сорбатов в условиях нормально- и обращенно-фазовой хроматографии может быть использован априорный расчет гидрофобности компонентов системы с помощью рассмотренных нами параметров.

Литература

- [1] Сычев С.Н. Полуэмпирическая теория удерживания в нормально-фазовой ВЭЖХ на адсорбционно-модифицированном силикагеле. *Сорбционные и хроматографические процессы*. **2003**. Т.3. Вып.4. С.446.
- [2] Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. *Рига: Зинатне*. **1988**. 390с.
- [3] Hansch C., Leo A. Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology. *New York: Wiley*. **1979**. 352p.
- [4] Cambridge Soft – Chemical Drawing, Chemical Databases, Enterprises Solutions, Desktop Software, Consulting Services. (<http://www.cambridgesoft.com>).
- [5] Лисичкин Г.В. Химия привитых поверхностных соединений. *М.: Физматлит*. **2003**. 592с.
- [6] Рудаков О.Б., Седишев И.П. Обобщенный критерий полярности растворителей как средство управления хроматографическим процессом. *Известия РАН. Серия химич.* **2003**. №1. С.52.
- [7] Рудаков О.Б. Высокоэффективная жидкостная хроматография фенолов в полярной подвижной фазе на аминопропильном силикагеле. *Журнал физич. химии*. **2004**. Т.78. №12. С.2268.
- [8] Рудаков О.Б., Селеменев В.Ф., Коновалов В.В., Спитченко О.Н. Обращенно-фазовая микроколлоидная высокоэффективная хроматография фенолов. *Журнал физич. химии*. **2002**. Т.76. №5. С.931.
- [9] Sarker M., K.J. Duff “U-Shaped” Retention Profile as an Indicator of the Level of Silanol Activity of HPLC Silica Phases (<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/12000/11910.pdf>)

- [10] Nichthäuser J., Stepnowski P. Retention Mechanism of Selected Ionic Liquids On a Pentafluorophenylpropyl Polar Phase: Investigation using RP-HPLC. *Journal of Chromatographic Science*. **2009**. Vol.47. No3. P.247.
- [11] Lämmerhofer M., Richter M., Wu J., Nogueira R., Bicker W., Lindner W. Mixed-mode ion-exchangers and their comparative chromatographic characterization in reversed-phase and hydrophilic interaction chromatography elution modes. *Journal of Separation Science*. **2008**. Vol.31. No.14. P.2572.
- [12] Bicker W., Wu J., Lindner W., Hydrophilic interaction chromatography in non-aqueous elution mode: Evaluation of an alternative separation concept for polar analytes on silica-based non-charged polar stationary phases. *Journal of Separation Science*. **2008**. Vol.31. No.16-17. P.2971.
- [13] Bicking M.K.L., Henry R.A. A Global Approach to HPLC Column Selection Using Reversed Phase and HILIC Modes: What to Try When C18 Doesn't Work. *LG&GC North America*. **2010**. Vol.28. No.3. P.234.