



УДК 541.183.2:543.422

Элюирующая способность подвижных фаз в обращенно-фазовой ВЭЖХ и удерживание фенольных соединений

Рудаков О.Б.

Воронежский государственный архитектурно-строительный университет, Воронеж

Рудакова Л.В.

Воронежская государственная медицинская академия, Воронеж

Грошев Е.Н.

Воронежский институт государственной противопожарной службы МЧС, Воронеж

Поступила в редакцию 21.03.2011 г.

Аннотация

Обсуждена зависимость объема удерживания фенольных соединений в условиях микроколоночной обращенно-фазовой ВЭЖХ от их гидрофобности и от элюирующей способности подвижных фаз. В качестве критерия гидрофобности сорбатов использован логарифм распределения между водой и 1-октанолом, рассчитанный по алгоритму BioByte. Предложен новый критерий элюирующей силы и элюотропный ряд для модификаторов обращенных подвижных фаз.

Ключевые слова: Обращенно-фазовая ВЭЖХ, фенолы, гидрофобность, элюирующая способность, ацетонитрил, метанол

Dependence of retention volume of phenolic compounds in conditions of microcolumn reversed - phase HPLC on their hydrophobicity and eluent abilities of mobile phases is discussed. As criterion of hydrophobicity of sorbats the logarithm of distribution between water and 1-octanol, designed with algorithm BioByte is used. The new criterion of eluent forces and eluotropic line for modifiers reversed mobile phases is offered.

Keywords: reversed - phase HPLC, phenols, hydrophobicity, eluent ability, acetonitrile, methanol

Введение

Объектами хроматографического исследования в данной статье являются фенолы. Как известно, соединения фенольного типа представляют собой исходное сырье для производства различных полимерсодержащих материалов. Гидрофобные производные фенолов – антиоксиданты, широко применяются при производстве пластиков и эластомеров, продуктов бытовой химии. Метод исследования – микроколоночная обращенно-фазовая ВЭЖХ.

Цель работы – оценить влияние гидрофобности фенолов и элюирующей силы подвижных фаз (ПФ) вода – ацетонитрил и вода – метанол на параметры удерживания соединений фенольного типа.

Основные закономерности удерживания фенолов различного строения в условиях ВЭЖХ обсуждены в [1-8]. Нам представилось целесообразным рассмотреть их в проекции, удобной для хроматографической практики. А именно, определить, как изменяется элюирующая сила ПФ в зависимости от объемной доли модификатора (ацетонитрила или метанола). Известны элюотропные ряды растворителей для ВЭЖХ и способы определения элюирующей силы смешанных ПФ [1,6-10]. Однако элюотропные ряды и критерии элюирующей силы растворителей носят приблизительный характер, они могут давать хороший прогноз для одних сорбатов и слишком грубое приближение для других. Например, элюирующая сила ТГФ в обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ) считается более высокой, чем ацетонитрила и метанола, в то же время ароматические амины и фенолы удерживаются при элюировании смесями вода – тетрагидрофуран значительно дольше, чем при элюировании аналогичными водно-метанольными и водно-ацетонитрильными смесями [11].

Эксперимент

Для исследования выбрали хроматографические микроколонки, с умеренной исходной эффективностью (около 3000 теоретических тарелок), выработавшие примерно половину своего ресурса, т.е. колонки характерные для типовых аналитических лабораторий. Параметры хроматографического удерживания фенолов измеряли на приборе Милихром-4 (Россия) с использованием стальных микроколонок 2×62 мм, наполненных сорбентом Силасорб С₁₈ с частицами размером 5 мкм. ПФ получали смешиванием заданных объемов растворителей, расход – 100 мкл/мин. ПФ перед применением отфильтровывали от механических примесей и дегазировали продувкой гелия в течение 3 мин. Детектирование проводили в двухволновом режиме - 254 и 272 нм. Пробы растворяли в ацетонитриле. Объем вводимой пробы - 5 мкл. Объем регенерации - 200 мкл, объемы буферов - по 5 мкл. В качестве сорбатов взяли пирокатехин (I), фенол (II), *орто*-крезол (III), *пара*-крезол (IV), эвгенол (V), 2-нафтол (VI), *пара-трет*-бутилфенол (VII), 3-(2,4-диметилфенил)-1-(2-гидроксифенил)-1-пропанон (VIII), ионол (IX), 3-(4-*трет*-бутилфенил)-1-(2-гидроксифенил)-1-пропанон (X), 3-(4-бифенил)-1-(2-гидроксифенил)-1-пропанон (XI) марки х.ч.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены данные по объемам удерживания фенолов в обращенно-фазовых ПФ вода – ацетонитрил и вода – метанол. Из этих данных следует, что в чистом ацетонитриле и метаноле объемы удерживания фенолов мало зависят от природы модификатора и зависят, прежде всего, от гидрофобности фенолов (наличия и размера гидрофобных фрагментов в молекуле и числа полярных групп). В качестве меры гидрофобности сорбатов I-XI взяли критерий гидрофобности (липофильности) Ганча-Лео, который получил широкое распространение, а именно, логарифм коэффициента распределения вещества между водой и 1-октанолом (*ClogP*), рассчитанный по алгоритму, предложенному корпорацией BioByte [13].

Таблица 1. Объемы удерживания V_R (мкл) сорбатов I-XI в ПФ вода – ацетонитрил и вода – метанол на Силасорбе C_{18} , 5 мкм (2x62мм)

Сорбат	φ_2	1		0.8		0.75		0.6		0.5	
	ClogP	A*	M*	A	M	A	M	A	M	A	M
I	-0.1	175	173	195	190	209	199	236	241	260	280
II	1.5	175	183	200	208	220	222	247	270	270	312
III	1.9	184	193	215	222	280	256	342	312	412	418
IV	2.0	180	181	230	214	260	252	317	351	384	480
V	2.6	179	187	242	275	295	324	376	652	470	852
VI	2.6	188	175	270	245	405	297	485	557	560	759
VII	3.3	203	195	350	265	530	416	734	1002		
VIII	4.6	273	228	798	793	1127	1100				
IX	5.4	245	260	590	1173	891	1447				
X	5.8	263	290	850	1232	1148	1515				
XI	5.9	256	274	704	802	1392	1402				

*) А – ацетонитрил; **) М – метанол

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*. 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 *ClogP* не вызывают затруднений.

Как видно из данных табл. 1, при увеличении критерия гидрофобности *ClogP* фенольного соединения в 3 раза примерно в 1.5 раза возрастает объем удерживания V_R .

При уменьшении объемной доли модификатора φ_2 появляются различия в хроматографическом поведении фенолов в водно-метанольных и водно-ацетонитрильных ПФ. Эти различия возрастают с увеличением гидрофобности фенолов и увеличением доли воды в ПФ. Если низшие фенолы при высоком содержании метанола в ПФ могут вымываться этой ПФ даже быстрее, чем ацетонитрильной ПФ с такой же объемной долей модификатора, то с уменьшением концентрации модификатора наблюдается обращение порядка удерживания. В водно-метанольной ПФ увеличение V_R сильнее зависит от доли воды, чем в ацетонитрильных ПФ. Более гидрофобные фенолы во всем диапазоне φ_2 дольше удерживаются в колонке при использовании метанольных ПФ, т.е. для них эффективная элюирующая сила метанола несколько ниже элюирующей силы ацетонитрила. При концентрациях воды в ПФ, сопоставимых с концентрацией модификатора резко падает растворимость гидрофобных фенолов, пики размываются, хроматографирование становится невозможным.

Наблюдаемые тенденции (табл. 1) хорошо согласуются с сольвофобным механизмом сорбции фенолов на поверхности обращенной неподвижной фазы.

Согласно сольвофобной теории причиной сорбции в ОФХ являются диполь-дипольные взаимодействия полярных молекул ПФ, их сильное притяжение одна к другой. Это приводит к сольвофобному вытеснению менее полярных молекул сорбата из полярной среды элюента к неполярной поверхности сорбента. Роль поверхности неподвижной фазы в ОФХ – выступать акцептором молекул сорбата, ориентированных к ней гидрофобным фрагментом и удерживать его слабыми дисперсионными силами. Наиболее существенными факторами удерживания сорбатов в условиях ОФХ являются размеры их молекул и способность к гидрофобным взаимодействиям неполярной части молекулы [6].

Таким образом, в левом верхнем углу табл.1 находится зона неселективного хроматографирования, характеризующаяся большой элюирующей силой ПФ и пониженной сольвофобностью сорбатов, а в правом нижнем углу зона повышенной сольвофобности и сильной сорбции. Судя по резкому возрастанию рабочего давления при попытках хроматографирования проб гидрофобных фенолов, растворенных в чистом модификаторе, элюентами с объемной долей модификатора $\varphi_2 < 0.75$, имеет место не только прочная сорбция вещества в колонке, возможно выпадение пробы в осадок на фильтре колонки. Ситуация усугубляется повышением вязкости, наиболее характерным для водно-метанольных и менее выраженным для ацетонитрильных ПФ [12]. Повышение давления, при высокой гидрофобности вещества, растворенного в полярной среде, может в свою очередь, в соответствии с принципом Ле Шателье, способствовать образованию осадка, реализуя термодинамически более выгодное положение, когда малополярные молекулы пробы в твердом состоянии будут занимать меньший объем, чем они же, сольватированные по гидрофобному фрагменту молекулами модификатора, а по гидрофильному - молекулами воды [6].

Таблица 2. Эмпирические коэффициенты уравнения (1) и степень аппроксимации r^2

Сорбат	Ацетонитрил – вода			Метанол – вода		
	a_1	b_1	r^2	a_1	b_1	r^2
I	2.58	0.35	0.98	2.64	0.42	0.93
II	2.62	0.38	0.98	2.72	0.47	0.96
III	2.97	0.72	0.95	2.91	0.66	0.93
IV	2.90	0.66	0.99	3.07	0.86	0.94
V	3.09	0.84	0.99	3.61	1.39	0.96
VI	3.26	0.98	0.94	3.51	1.33	0.96
VII	3.74	1.43	0.96	3.97	1.76	0.88
VIII	4.86	2.42	0.99	5.08	2.73	0.99
IX	4.53	2.15	0.98	5.49	3.06	0.99
X	4.98	2.56	0.99	5.42	2.95	0.99
XI	5.11	2.73	0.95	5.12	2.69	0.98

Для объемов удерживания V_R фенолов в условиях ОФХ хорошо соблюдаются линейные зависимости (табл.2):

$$\log V_R = a_1 - b_1 \varphi_2, \quad (1)$$

где a_1 и b_1 – эмпирические коэффициенты, индивидуальные для разных модификаторов и сорбатов. Для обоих бинарных ПФ коэффициенты уравнения (1) близки по величине, что указывает на примерно одинаковый характер влияния элюирующей силы ПФ на объемы удерживания соединений I-XI. С увеличением гидрофобности фенольных соединений a_1 и b_1 закономерно возрастают по абсолютной величине.

С другой стороны, в работе [8] показано, что для этих соединений в режиме ОФХ характерны линейные зависимости

$$\log V_R = a_2 + b_2 P_N, \quad (2)$$

где a_2 и b_2 – также эмпирические коэффициенты, а P_N суммарная полярность ПФ, выраженная редуکتивным (обобщенным) критерием полярности

$$P_N = P_1(1 - \varphi_2) + P_2\varphi_2, \quad (3)$$

где P_1 – редуکتивный критерий полярности воды, а P_2 – редуکتивный критерий полярности модификатора.

Следовательно, чем полярнее элюент, чем меньше доля модификатора, тем меньше его элюирующая сила, и тем больше объем удерживания сорбата.

По предложению Снайдера элюирующая сила растворителя в ОФХ определяется из экспериментальных линейных зависимостей логарифмов факторов удерживания от объемной доли органического модификатора в ПФ [10]:

$$\lg k = \lg k_1 - S\varphi_2, \quad (4)$$

где k_1 – фактор удерживания при использовании воды в качестве ПФ; φ_2 – объемная доля органического модификатора в ПФ. Коэффициент S является мерой элюирующей силы в ОФХ. Недостатком уравнения (4) является то, что оно удовлетворительно соблюдается только в узком интервале $\Delta\varphi_2 = 0.3$ [6].

Вместе с тем, между коэффициентом S и редуکتивным критерием P_N для индивидуальных растворителей, как показано в работе [13], существует достаточно тесная корреляция

$$S = 5.39 - 0.05P_N, \quad (5)$$

Для практического удобства в [13] нормированное максимальное значение критерия полярности P_N для воды приняли за 100, а минимальное значение P_N для декана приравняли нулю.

В случае элюирующей силы в ОФХ для воды $S=0$. В связи с этим мы предлагаем сделать обратную нормировку для редуکتивного критерия полярности и получить на его основе новый элюотропный ряд для обращенно-фазовой хроматографии. Назовем полученный критерий редуکتивным липофильным и обозначим его символом R_L . Максимальное значение этого критерия принадлежит декану ($R_L = 100$), липофильность воды равна нулю. В табл. 3 приведены значения R_L некоторых хроматографических растворителей.

Таблица 3. Элюотропный ряд R_L для обращенно-фазовой хроматографии

Растворитель	R_L	Растворитель	R_L
Диэтиловый эфир	88.3	ИПС	63.3
ТГФ	79.0	1-Пропанол	60.9
1,4-Диоксан	78.3	ДМФА	57.1
Этилацетат	78.2	Этанол	56.0
1-Октанол	71.2	Ацетонитрил	55.3
Бутанон	71.0	ДМСО	51.6
1-пентанол	68.8	Метанол	45.7
Ацетон	67.8	Формаид	16.2
1-Бутанол	63.7	Вода	0

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

$$S = 0.056R_L \quad (6)$$

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

$$R_L = R_{L2}\varphi_2, \quad (7)$$

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

На рисунке представлена 3D-диаграмма, на которой приведены экспериментальные точки, рассчитанные по данным табл.1 и построенные в координатах R_L - $\log V_R$ - $ClogP$. Диаграмма наглядно демонстрирует, что с увеличением R_L (как в водно-ацетонитрильной, так и водно-метанольной ПФ) удерживание фенолов уменьшается, особенно резко для высокогидрофобных фенолов.

Как видим, предлагаемый обобщенный критерий R_L предпочтительней в качестве характеристики элюирующей силы, чем обратный ему критерий полярности P_N , так как мы имеем дело с прямой зависимостью, а в расчетах исчезает параметр воды.

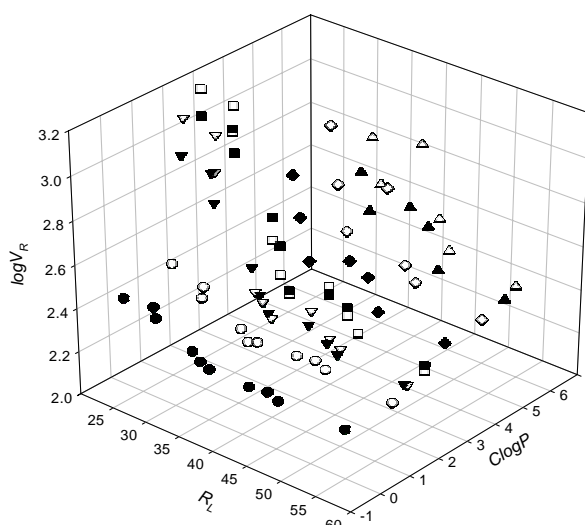


Рис. Влияние элюирующей силы (R_L) подвижной фазы и гидрофобности фенолов $ClogP$ на параметры их удерживания ($\log V_R$) в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ

Можно ли использовать для прогноза элюирующей силы модификаторов для ОФХ критерий $ClogP$? Принципиальных доводов против этого нет, однако, этот параметр не достаточно удобен для этих целей. Для воды он не равен нулю и не имеет физического смысла, а для элюирующей силы органических модификаторов ПФ в этом варианте ВЭЖХ, имеющих небольшую молекулярную массу, он сравнительно малочувствителен, принимает, как правило, отрицательные значения, варьирующие в узком интервале [13,14]. Вместе с тем, для типичных обращенно-фазовых модификаторов нами найдена линейная корреляция (коэффициент корреляции $r=0.93$, $n=7$):

$$\log R_L = 1.78 + 0.13 ClogP \quad (8)$$

Факт коррелированности между значениями S , $ClogP$ и R_L позволяет говорить о применимости предлагаемой шкалы в прогнозе элюирующей силы модификаторов для ОФХ.

Заключение

Для описания влияния состава и элюирующей силы подвижной фазы на удерживание как низко-, так и высокогидрофобных фенольных соединений могут быть использованы полулогарифмические линейные анаморфозы $\log V_R = a + bX$, где X – объемная доля или элюирующая сила подвижной фазы. Для использования в качестве критерия элюирующей силы в обращенно-фазовой хроматографии представляется интересным редуцированный (обобщенный) критерий липофильности R_L , полученный в результате обратной нормировки редуцированного критерия полярности P_N . На основе критерия R_L составлен элюотропный ряд, в котором для воды значение критерия принято за ноль. Элюирующая сила бинарных водно-органических смесей определяется как произведение элюирующей силы модификатора на его объемную долю.

Список литературы

1. Рудаков О.Б. Жидкостно-адсорбционная хроматография высокогидрофобных орто-замещенных фенолов // Конденсированные среды и межфазные границы. 1999. Т.1. №4. С.308-314.
2. Рудаков О.Б., Алексюк М.П., Коновалов В.В. Микроколоночная высокоэффективная жидкостная хроматография орто-замещенных производных фенола // Журн. аналит. химии. 2001. Т.56. №4. С. 351-358
3. Рудаков О.Б., Хрипушин В.В., Бочарова О.Н., Рудакова Л.В. Оптические свойства бинарных подвижных фаз как составляющие целевые функции при оптимизации условий высокоэффективной жидкостной хроматографии гидрофобных соединений фенольного типа // Журн. аналит. химии. 2001. Т.56. №1. С.44-51.
4. Киселев А.В., Яшин Я.И. Адсорбционная газовая и жидкостная хроматография. М: Химия, 1979. 288 с.
5. Киселев А.В., Пошкус Д.П., Яшин Я.И. Молекулярные основы адсорбционной хроматографии. М: Химия, 1986. 272 с.
6. Шатц В.Д. Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига: Зинатне, 1988. 390 с.
7. Рудаков О.Б., Селеменев В.Ф., Сезин И.М., Аристов И.В., Данилова Е.В. Хемометрический подход в оценке элюирующей способности подвижных фаз в ВЭЖХ // Сорбционные и хроматографические процессы. 2001. Т.1. №6. С.1053-1064.
8. Рудаков О.Б., Спитченко О.Н., Болотов В.М. Параметры сорбции фенолов в эквихорических подвижных фазах в условиях микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии // Конденсированные среды и межфазные границы. 2001. Т.3. №4. С.409-414
9. Рудаков О.Б., Бочарова О.Н. Температура кипения бинарных подвижных фаз для высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журн. физич. химии. 2000. Т.74. №6. С.1059-1064.
10. Схунмакерс П. Оптимизация селективности в хроматографии. М.: Мир, 1989. 399 с.
11. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии / Под. ред. А. Хеншен и др. М.: Мир. 1988. 688 с.

12. Рудаков О.Б., Соколов М.И., Селеменев В.Ф. Вязкость бинарных подвижных фаз для высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журн. физич. химии. 1999. Т.73. №9. С.1650-1653.

13. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии / О.Б. Рудаков, И.А. Востров, С.В. Федоров, А.А. Филиппов, В.Ф. Селеменев, А.А. Приданцев. – Воронеж: Водолей, 2004. 528 с.

14. Рудаков О.Б., Рудакова Л.В. Гидрофобно-гидрофильный баланс жидкостных хроматографических систем. Бултеровские сообщения. 2011. Т.24. №2.

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

Грошев Евгений Николаевич – начальник учебно-пожарной части Воронежского института государственной противопожарной службы МЧС России, Воронеж

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

Rudakova Lyudmila V. - k.kh.n., assistant professor of the chair of pharmaceutical chemistry and clinical pharmacy of Voronezh state medical academy, 394000, Voronezh, robi@vmail.ru

Groshev Eugeny N. - the chief of educational fire brigade of the Voronezh institute of the state fire-prevention service of the Ministry of Emergency Measures of Russia, Voronezh

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