ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ, 2023, том 97, № 11, с. 1665–1669

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ ПРОЦЕССОВ РАЗДЕЛЕНИЯ. ХРОМАТОГРАФИЯ

УДК: 544.732.2:543.544.5

КАРТЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЛЯ СОПОСТАВЛЕНИЯ СВОЙСТВ РАЗЛИЧНЫХ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ СИСТЕМ

© 2023 г. В. И. Дейнека[a],*, И. П. Блинова[a]

[a] *Национальный государственный исследовательский Белгородский университет, 108015 Белгород, Россия*

**e-mail: deineka@bsu.edu.ru*

Поступила в редакцию 15.02.2023 г.
После доработки 15.02.2023 г.
Принята к публикации 19.05.2023 г.

В работе предлагаются карты эффективности, как графики зависимости ширины пиков на половине высоты, $\Delta_{1/2}$, от функции фактора удерживания сорбатов, полученной из исправленного выражения для расчета эффективности хроматографических систем для жидкостной хроматографии с добавлением параметра, учитывающего динамические факторы уширения по формуле: $\Delta_{1/2}^2 = a^2 + b^2k(k+1)$. Показано, что карты эффективности могут быть использованы для сравнения различных хроматографических систем без необходимости необоснованного выбора случайных конкретных условий хроматографирования – во всем диапазоне составов подвижных фаз. Показано, что карты эффективности чувствительны к механизмам удерживания сорбатов.

Ключевые слова: хроматографические системы, жидкостная хроматография, карты эффективности, механизмам удерживания сорбатов

DOI: 10.31857/S0044453723110067, **EDN:** YZGTNM

Метод теоретических тарелок для описания хроматографических процессов был предложен в работе [1]. В методе профиль пика сорбата на хроматограмме аппроксимируется симметричным гауссовым распределением:

$$c(t) = c_{\max} \exp\left[-\frac{(t_R - t)^2}{2\sigma^2}\right], \qquad (1)$$

где c – концентрация сорбата в элюате при заданном t – времени от начала хроматограммы, $c_{\max}$ – концентрация в максимуме пика, t_R – время удерживания сорбата, σ – среднеквадратичное отклонение. Это позволяет рассчитывать эффективность хроматографических систем, выраженную числом теоретических тарелок, для чего во всех монографиях и руководствах по хроматографии рекомендуется [2–4] уравнение:

$$N = 8\ln 2\left(\frac{t_R}{\Delta_{1/2}}\right)^2 = 5.545\left(\frac{t_R}{\Delta_{1/2}}\right)^2, \qquad (2)$$

где t_R – время удерживания сорбата, $\Delta_{1/2}$ – ширина пика на половине высоты (называемая просто одним словом “width” в программе Agilent ChemStation).

Для оптимизации хроматографической эффективности (изначально – для газовой хроматографии) используется уравнение Ван Деемтера [5], в котором экспериментальные данные по зависимости высоты эквивалентной теоретической тарелки колонки, H, от скорости подвижной фазы, u, аппроксимируются уравнением:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu, \qquad (3)$$

где H равна частному от деления длины колонки, L, на число теоретических тарелок, N; A, B и C – константы.

Уравнение (3) применимо для данной хроматографической колонки при заданном составе подвижной фазы и при заданной температуре, но при разлчиных скоростях подачи подвижной фазы. Но часто возникает необходимость сопоставления эффективности хроматографических систем при изменении (качественном или количественном) состава подвижной фазы или температуры, либо при смене марок хроматографических колонок. Для этого уравнение (2) уже малоприменимо, особенно если учесть, что при корректном численном решении численной задачи в методе теоретических тарелок эффективность хроматографической системы следует рассчитывать по другой формуле [2, 3]:

$$N = 5.545\frac{k}{k+1}\left(\frac{t_R}{\Delta_{1/2}}\right)^2, \qquad (4)$$

где k – фактор удерживания сорбата.

При больших временах удерживания (больших k, характерных для газовой хроматографии) формула (4) заменяется на асимптотическую формулу (2). Но поскольку в ВЭЖХ используются условия, при которых факторы удерживания сорбатов не слишком велики, то использование формулы (4) обязательно.

Цель настоящей работы – анализ и обоснование альтернативного подхода, идеи которого предложены в работах [2, 3, 6], приводящего к картам эффективности, построенным с учетом исправленной формулы (4), для сопоставления различных хроматографических систем в обращенно-фазовой ВЭЖХ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали хроматограф Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным детектором с вводом пробы объемом 20 мкл краном-дозатором Rheodyne 7125. Хроматограммы записывали, хранили и обрабатывали программой Agilent ChemStation. Дополнительно использовали экспорт хроматограмм и ручную обработку в программе MS Excel.

Применяли три различные хроматографические колонки размерами 150 × 4.6 мм: Kinetex C18, 5 мкм; Eclipse SDB C18, 5 мкм и Symmetry C18, 3.5 мкм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Уравнение (4) преобразуется в выражение для зависимости $(\Delta_{1/2})^2$ от функции фактора удерживания вещества:

$$\left(\Delta_{1/2}\right)^2 = \frac{5.545t_0^2}{N}k\left(k+1\right). \qquad (5)$$

Физический смысл $(\Delta_{1/2})^2$ хроматографического пика в методе теоретических тарелок состоит в том, что существует дисперсия числа сорбционно-десорбционных процессов, подчеркивающая вероятностный характер удерживания сорбатов при их перемещении по колонке.

Зависимость $(\Delta_{1/2})^2$ от функции фактора удерживания можно использовать для сопоставления эффективности различных хроматографических систем при постоянной скорости подачи подвижной фазы, что исключает некорректность выбора каких-либо одних условий записи хроматограмм. В этом случае применяется анализ уширения пиков в хроматографических системах в широком диапазоне составов избранной элюентной системы (или избранных элюентных систем). При допущении постоянства эффективности (N) по исследуемому сорбату при изменении концентрации органического модификатора водно-органических подвижных фаз $(\Delta_{1/2})^2$ должна быть прямо пропорциональной произведению $k(k + 1)$. Это предположение не очевидно, но обычно линейность между указанными параметрами экспериментально обнаруживается [2, 3, 6]. В методе теоретических тарелок не учитываются динамические составляющие уширения пика, – параметры A, B и C как в уравнении Ван Деемтера, так и в других формулах, предложенных для аппроксимации экспериментальных данных [7]. Поэтому уравнение (5) следует заменить, по крайней мере, на уравнение, предложенное в работе [2], включающее ненулевой интерсепт:

$$\left(\Delta_{1/2}\right)^2 = a^2 + b^2k(k+1). \qquad (6)$$

В жидкостной хроматографии при работе на скоростях подачи подвижной фазы порядка 0.8–1.0 мл/мин составляющей, соответствующей продольной диффузии (параметра B в уравнении (3)), можно пренебречь [7]. A, как параметр вихревой диффузии не должен зависеть от состава подвижной фазы. Зависящими от фактора удерживания (т.е. от состава подвижной фазы) остаются только параметр C в уравнении Ван Деемтера или параметры C и D в уравнениях других авторов [7], отвечающие за массообменные процессы. Функциональный вид параметров A, B и C, ввиду сложности процессов не может быть однозначно строго определен в аналитическом виде, поэтому для вывода функциональной зависимости используются различные приближения. Один из приближенных подходов основан на методе среднего шага (random walk model [8]). Однако при этом забывают, что модель среднего шага позволяет определить распределение молекул сорбата по колонке при заданном времени от старта записи хроматограммы, а не профиль пика в элюате. В работе [9] был выполнен анализ использования линейной экстраполяции квадрата дисперсии пика, σ^2, от $(k + 1)^2$ нескольких различных сорбатов при одних и тех же хроматографических условиях для оценки вклада внеколоночных параметров в суммарное уширение пиков. Отметим, что такой подход во многом аналогичен предлагаемому в настоящей работе. При этом было показано, что погрешности, связанные с не учетом различия коэффициентов диффузии в параметре C, уменьшаются с уменьшением скорости подачи подвижной фазы. Нетрудно убедиться, что линейное изменение высоты теоретической тарелки с изменением $(k + 1)^2$ при $k > 1$ (в пределах погрешности эксперимента) также соответствует линейному изменению этого параметра от $k(k + 1)$. Отметим также, что замена функции $k(k + 1)$ на $(k + 1)^2$ в работе [9] связана с использованием некорректного уравнения (2) вместо уравнения (4). И если для целей работы [9] линейность в за-

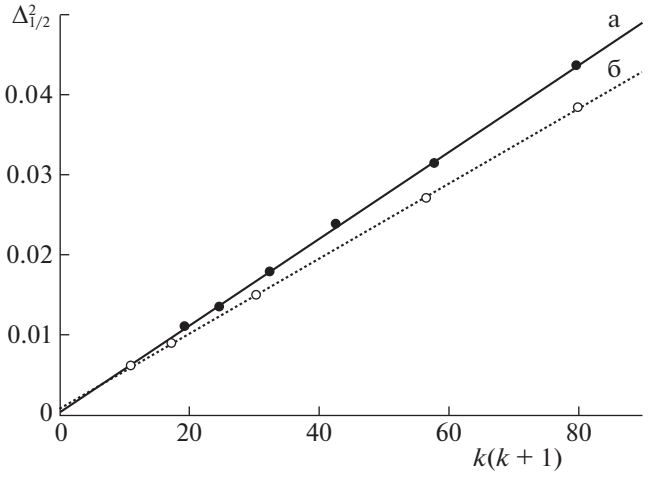


Рис. 1. Карта эффективности для удерживания бензола подвижных фаз системы "30–60 об. % ацетонитрила и 40–70 об. % воды": а – колонка 150 × 4.6 мм Eclips SDB-C18 (5 мкм); б – колонка 150 × 4.6 мм Kinetex C18 (5 мкм).

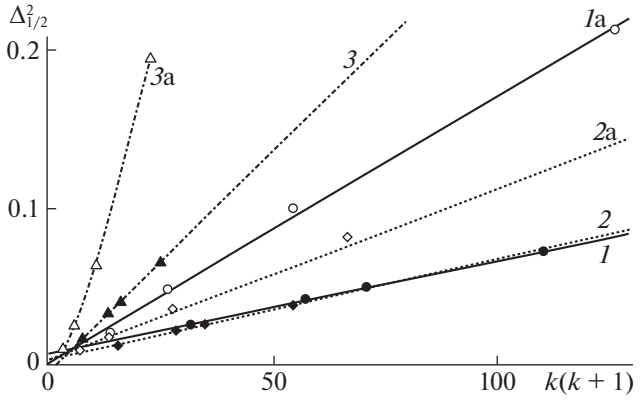


Рис. 2. Карта эффективности для удерживания трех антоцианов: *1* – Cy3Glu, *2* – Cy3Sopho, *3* – Cy3.5diGlu. Колонка 150 × 4.6 мм SymmetryC18, 3.5 мкм, 40°C. Элюенты: "9–11 об. % ацетонитрила, 1 об. % ортофосфорной кислоты в воде" и (помечены добавление буквы *а*) "9–11 об. % ацетонитрила, 0.24 об. % ортофосфорной кислоты в воде", 0.8 мл/мин.

висимости σ^2 от $(k + 1)^2$ была принципиально важной, то для предлагаемых в настоящей работе карт эффективности эта зависимость может иметь и нелинейный характер.

Еще одной особенностью корреляции по уравнению (6) является необходимость расчета $k(i)$ не по времени элюирования неудерживаемого компонента, а по времени, соответствующего проходу подвижной фазы по межчастичному пространству т.к. в методе теоретических тарелок нет понятия "застойные зоны" в порах сорбента и удерживание веществ рассчитывается так же, как в гель-проникающей хроматографии. Для расчета этой характеристики в настоящей работе использовали теоретическое значение межчастичной пористости колонок, заполненных наносферами ($\varepsilon = 0.35$), рассчитанные по [10, 11].

На рис. 1 представлены результаты использования уравнения (6) для оценки эффективности удерживания бензола на двух различных хроматографических колонках. Такие рисунки предлагаем называть картами эффективности.

На рисунке для обеих колонок уравнения (5) имеют, действительно, линейный вид с высокими коэффициентами корреляции:

а) для колонки 150 × 4.6 мм Eclips SDB-C18 (5 мкм) с $R^2 = 0.9995$:

$$\left(\Delta_{1/2}\right)^2 = 3.94\times10^{-4} + 5.37\times10^{-4}k(k+1);$$

б) для колонки 150 × 4.6 мм Kinetex C18 (5 мкм) с $R^2 = 0.9998$:

$$\left(\Delta_{1/2}\right)^2 = 7.84\times10^{-4} + 4.66\times10^{-4}k\left(k+1\right).$$

Вертикальные срезы на карте селективности показывают, что при любом составе подвижной фазы из диапазона "30–60 об. % ацетонитрила и 40–70 об. % воды" эффективность колонки б выше поскольку соответствующая линия располагается на карте эффективности ниже линии для колонки а.

На рис. 2 представлена карта эффективности для разделения трех антоцианов: одного моногликозида (цианидин-3-глюкозида, Cy3Glu) и двух дигликозидов различного строения: цианидин-3-(2"-глюкозилглюкозида (цианидин-3-софорозида, Cy2Sopho), и цианидин-3,5-диглюкозида, (Cy3,5diGlu).

Из представленных данных следует, что характеры изменения эффективности пиков двух антоцианов Cy3Glu и Cy3Sopho (отличающегося от Cy3Glu добавлением глюкозильного радикала к существующему глюкозидному в положение 2") с ростом удерживания довольно близки между собой. Но для Cy3,5diGlu, в котором второй глюкозидный радикал добавляется в положение 5 агликона цианидин-3-глюкозида, уже содержащего один такой заместитель в положении 3, эффективность существенно снижена. Это указывает на близость механизмов сорбции Cy3Glu и Cy3Sopho с одной стороны и существенного отличия механизма сорбции Cy3,5diGlu – с другой стороны. Найденные различия усиливаются при снижении pH (при уменьшении концентрации *орто*-фосфорной кислоты от 1 до 0.05 об. %). Причем наиболее сильно это сказывается на Cy3,5diGlu; более того, эффективность пика Cy3-Glu неожиданно уменьшается сильнее, чем пика Cy3Sopho, хотя причину такого различия объяс-

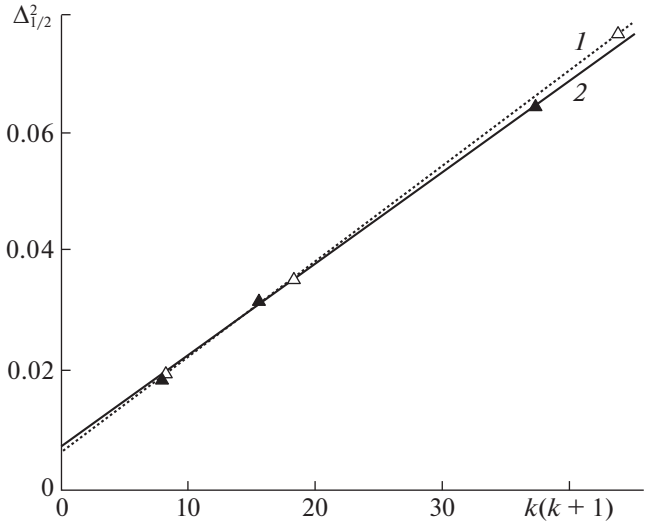


Рис. 3. Карта эффективности Cy3Rut в двух элюентных системах. Колонка 150 × 4.6 мм Symmetry C18, 3.5 мкм; 40°C. Элюенты: *1* – " 6–7.4 об. % ацетонитрила, 10 об. % муравьиной кислоты в воде" и *2* – "4–6 об. % ацетона, 10 об. % муравьиной кислоты в воде", 0.8 мл/мин.

нить изменением строения антоциана проблематично. Напомним, что в работе [12] указывалось на неодинаковое уменьшение площадей пиков для 3-глюкозидов шести основных природных антоцианидинов при уменьшении кислотности подвижных фаз вследствие различных констант гидратации флавилиевых форм антоцианов.

В любом случае анализ карт селективности является важнейшим способом обнаружения особенностей механизмов сорбции веществ различного строения в одних и тех же условиях хроматографирования. Так, в работе [6] было показано, что для кверцетин-3-рутинозида изменение $\Delta_{1/2}$ пика при уменьшении концентрации как ацетонитрила, так и муравьиной кислоты описывалось одной и той же прямолинейной зависимостью от функции удерживания соединения. В то же время для Cy3Glu различия были очевидны и они были связаны с усилением гидратации флавилиевой формы, что приводило к дополнительному уширению пиков, при снижении концентрации муравьиной кислоты, но не ацетонитрила.

На рис. 3 сопоставлены карты эффективности для цианидин-3-рутинозида на одной и той же колонке (марки Symmetry), но в различных водно-органических элюентных системах: для элюентов, содержащих 6–7.4 об. % ацетонитрила и 4–8 об. % ацетона при использовании в обеих системах 10 об. % муравьиной кислоты в качестве подкислителя.

При такой замене, во-первых, дорогостоящий ацетонитрил заменяется на менее дорогой ацетон с полуторакратным уменьшением расхода растворителя, а эффективности по числу теоретических тарелок очень близки, и даже несколько выше при переходе к ацетону.

В работе [12] наименьшую $(\Delta_{1/2})^2$ имели флавоноиды, для которых возможна плоская конформация (лютеолин и кверцетин), благоприятная для проникновения в разряженный [13] привитой слой октадецилсилановых сорбентов. При переходе к неплоскому дигидрокверцетину пик уширялся. Однако, повторное исследование, выполненное в настоящей работе на той же колонке, длительное время использовавшейся при определении антоцианов, показало несколько отличающиеся результаты. В этом случае экспериментальные точки для зависимости $\Delta_{1/2}$ от $k(k+1)$ для лютеолина, апигенина и дигидрокверцетина аппроксимируются одной и той же прямой линией. Это может быть объяснено тем, что в жестких условиях использования данной колонки с pH около 1.5, что меньше гарантированного диапазона устойчивости привитой фазы, произошел частичный гидролиз привитой фазы. И поэтому появились более широкие пустоты между привитыми радикалами, что снижает чувствительность к плоскому строению сорбатов, тем более что природный дигидрокверцетин, (2*R*,3*R*)-2-(3,4-дигидроксифенил)-3,5,7-тригидрокси-2,3-дигидрохромен-4-он, имеет форму, близкую к плоской, рис. 4. Отметим, что для гесперидина, 3',5,7-тригидрокси-4'-метоксифлавонона 7-рутинозида, который как гликозид должен удерживаться по поплавочному механизму, наклон прямой линии оказался существенно более высоким, чем для выше указанных соединений (как и рутина в работе [14]).

Таким образом, анализ карт эффективности может быть альтернативным методом контроля механизмов удерживания веществ в условиях обращенно-фазовой хроматографии. Это важно, поскольку в литературе признается возможность существования двух существенно различающихся механизмов удерживания сорбатов в условиях обращенно-фазовой хроматографии – распределения и адсорбции [15]. Однако нами не обнаружено работ по влиянию механизма удерживания сорбатов на уширение пиков, хотя вторичные равновесия между формами сорбата в подвижной и стационарной фазах были учтены [16].

Найденное в работе уширение пиков на хроматограммах трех веществ с заметно различающимися временами удерживания, аппроксимирующееся одной линией зависимости $(\Delta_{1/2})^2$ от $k(k+1)$, может свидетельствовать об общем механизме сорбции. Более того, это указывает на существование еще одной причины уширения

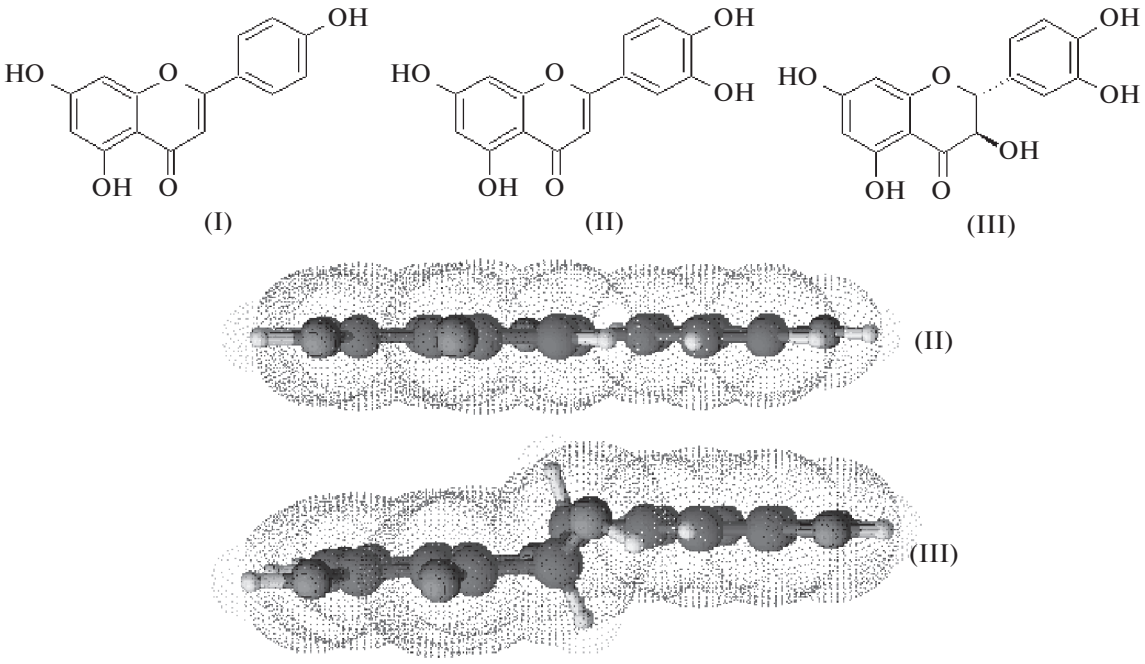


Рис. 4. Структуры апигенина (I), лютеолина (II) и дигидроквецетина (III) и вид молекул лютеолина и дигидрокверцетина параллельно плоскости симметрии лютеолина.

пиков, не зависящей от состава подвижной фазы, состоящей в том, что дисперсия пиков может отражать весьма вероятную неэквивалентность размеров и форм внутричастичных пор сорбентов (а, следовательно, и времен резиденции сорбатов в них).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Martin A.J.P., Synge R.L.M.* // Biochem. J. 1941. V. 35. P. 1358.
2. *Немировский А.М., Сухоручко В.И.* // Заводск. лабор. 1994. Т. 60. № 6. С. 1.
3. *Дейнека В.И.* // Журн. физ. химии. 2004. Т. 78. № 1. С. 144.
4. *Ettre L.S.* // Pure Appl. Chem. V. 65. № 4. P. 819.
5. *van Deemter J.J., Zuiderweg F.J., Klinkenberg A.* // Chem. Eng. Sci. 1958. V. 5. P. 271.
6. *Дейнека В.И., Григорьев А.М.* // Журн. физ. химии. 2005. Т. 79. № 5. С. 900.
7. *Katz E., Ogan K.L., Scott R.P.W.* // J. Chrometogr. 1983. V. 270. P. 51.
8. *Scott R.P.W.* Liquid chromatography column theory, John Willey & Sons, 1992. P. 93.
9. *Claessens H.A., Cramers C.A.M.G., Kuyken M.A.J.* // Chromatogr. 1987. V. 23. P. 189.
10. *Guo Z., Sun Z., Zhang N. et al.* // Powder Technol. 2019. V. 354. P. 842.
11. *Jung S., Stoeckel D., Tallarek U.* // J. Sep. Sci. 2011. V. 34. P. 800.
12. *Дейнека В.И., Олейниц Е.Ю., Саласина Я.Ю. и др.* // Журн. физ. химии. 2021. Т. 95. С. 1278.
13. *Дейнека В.И., Нгуен Ань Ван, Дейнека Л.А.* // Там же. 2019. Т. 93. № 12. С. 1860.
14. *Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Блинова И.П. и др.* // Сорбционные и хроматографические процессы. 2016. Т. 16. № 3. С. 377.
15. *Vailaya A., Horváth C.* // *J. Chromatogr. A*. 1998. V. 829. P. 1.
16. *Melander W.R., Lin H.-J., Jacobson J. et al.* // *J. Phys. Chem*. 1984. V. 88. P. 4527.