

Некоторые особенности определения индексов удерживания в обращенно-фазовой ВЭЖХ

***И.Г. Зенкевич, А. Деруиш, Д.А. Никитина**

Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии,
Российская Федерация, 198504, Санкт-Петербург, Университетский просп., 26

*Адрес для переписки: Зенкевич Игорь Георгиевич, E-mail: izenkevich@yandex.ru

Поступила в редакцию 20 января 2022 г., после исправления – 7 февраля 2022 г.

Обсуждаются особенности определения индексов удерживания в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ), в том числе разнообразные возможности применения рекуррентных соотношений. Показано, что в ОФ ВЭЖХ в качестве параметров удерживания несорбируемого компонента («мертвое» время, t_0) предпочтительнее использовать не экспериментально определенные значения, а вычисленные величины. Они обеспечивают линейность зависимостей $\lg(t_R - t_0) = an_C + b$, где n_C – число атомов углерода в молекулах гомологов, выбранных в качестве реперных компонентов (*n*-алкилфенилкетоны). Для теоретической оценки t_0 по временам удерживания трех последовательных реперных компонентов вместо известного уравнения Петерсона и Хирша рекомендованы рекуррентные соотношения $t_R(n_C - 1) = at_R(n_C) + b$, откуда следует $t_0 = \lim_{(n_C \rightarrow 0)} (t_R) = b / (1 - a)$ при условии $0 < a < 1$. Еще одна область эффективного применения рекуррентных соотношений обусловлена тем, что диапазоны концентраций органических компонентов элюентов при разделении гидрофильных аналитов с малыми временами удерживания и более гидрофобных реперных *n*-алкилфенилкетонов могут не перекрываться или же перекрываться лишь частично. В подобных случаях целесообразно расширение массивов данных за счет экстраполированных значений или для целевых аналитов, или же (предпочтительнее) для реперных компонентов. Для этого рекомендован еще один вариант рекуррентных соотношений, а именно $t_R(C \pm \Delta C) = at_R(C) + b$, $\Delta C = \text{const}$. Рассмотренные особенности применения рекуррентных соотношений в ОФ ВЭЖХ иллюстрированы примерами.

Ключевые слова: Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография, реперные *n*-алкилфенилкетоны, индексы удерживания, особенности определения и вычисления.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2022, vol. 26, no. 1, pp. 57-63

DOI: 10.15826/analitika.2022.26.1.007

Important features of retention indices determination in reversed-phase high performance liquid chromatography

***Igor G. Zenkevich, Abdennour Derouiche, Daria A. Nikitina**

St. Petersburg State University, Institute for Chemistry, Universitetskii prosp., 26,
St. Petersburg 198504, Russian Federation

*Corresponding author: Igor G. Zenkevich, E-mail: izenkevich@yandex.ru

Submitted 20 January 2022, received in revised form 07 February 2022

The features of the retention indices determination in reversed phase high performance liquid chromatography (RP HPLC) are discussed, namely the different possibilities of the application of the recurrent relations. At first, not the experimental, but the precalculated values are recommended as the retention parameters of non-sorbable compound (dead time, t_0) in RP HPLC. It is because just the precalculated values provide the linearity of relationships $\lg(t_R - t_0) = an_C + b$, where n_C is the number of carbon atoms in molecules of homologs selected as reference compounds (*n*-alkyl phenyl ketones). Besides the known Peterson and Hirsch equation for the theoretical evaluation of t_0 using the retention times of three consecutive homologs, the following recurrent relations are also recommended: $t_R(n_C - 1) = at_R(n_C) + b$, from where it

follows that $t_0 = \lim (t_R)_{(n \rightarrow 0)} = b / (1 - a)$ under the condition that $0 < a < 1$. Another area of the effective application of the recurrent relations is caused by the following fact: the ranges of the concentrations of the eluent's organic constituents during the separation of hydrophilic analytes and hydrophobic reference n -alkyl phenyl ketones may not overlap, or overlap only partially. In such cases, expanding the data arrays seems to be reasonable using the extrapolated values both for the target analytes, and (preferably) for the reference compounds. For these purposes, another kind of recurrent relations can be recommended, namely $t_R(C \pm \Delta C) = at_R(C) + b$, $\Delta C = \text{const}$. All recommendations on the application of recurrent relations in RP HPLC are illustrated with examples.

Keywords: Reversed-phase high performance liquid chromatography, reference n -alkyl phenyl ketones, retention indices, important features of determination and calculation.

ВВЕДЕНИЕ

К наиболее воспроизводимым характеристикам удерживания в хроматографии относят индексы удерживания (ИУ, в формулах RI) [1]. Это обусловлено компенсацией влияния различных параметров режимов разделения за счет учета параметров удерживания двух (обычно ближайших к целевому аналиту) реперных компонентов:

$$RI_x = RI_n + (RI_{n+k} - RI_n) [f(t_{R,x}) - f(t_{R,n})] / [f(t_{R,n+k}) - f(t_{R,n})], \quad (1)$$

где t_R , $t_{R,n}$ и $t_{R,n+k}$ – времена удерживания целевого аналита (x) и реперных компонентов с присвоенными им значениями RI_n и RI_{n+k} . Вид функции $f(t_R)$ определяется режимом разделения: $f(t_R) = \lg(t_R - t_0)$ (изотермический или изократический, t_0 – время удерживания несорбируемого компонента), $f(t_R) = t_R$ (программирование температуры или градиентное элюирование), $f(t_R) = t_R + q \lg(t_R)$ – любой режим, причем для вычислений не требуется определение величин t_0 .

Концепцию ИУ широко применяют в газовой хроматографии [1] (в том числе при хромато-масс-спектрометрической идентификации). В обращенно-фазовой (ОФ) ВЭЖХ ее используют существенно реже, что обусловлено характером решаемых задач; преобладает определение известных целевых компонентов, доступных в качестве образцов сравнения. Кроме того, диапазон определяемых значений RI меньше, а сами ИУ сложным образом зависят от состава элюентов [2].

Для вычисления ИУ необходим выбор реперных компонентов с присвоенными им условными значениями индексов. В ОФ ВЭЖХ в качестве таких компонентов чаще всего используют n -алкилфенилкетоны $C_6H_5COC_nH_{2n+1}$ с $RI = 100n_C$, где n_C – суммарное число атомов углерода в молекуле. Иными словами, для ацетофенона $C_6H_5COCH_3$ $RI = 800$, пропиофенона $C_6H_5COC_2H_5$ – 900 и т.д. [1, 2]. Вычисления ИУ по формуле (1) в изократических режимах элюирования просты, за исключением того, что дополнительно требуется определение времен удерживания несорбируемого компонента (t_0).

В газовой хроматографии (кроме газо-адсорбционного варианта) в качестве оценок t_0 обычно принимают параметры удерживания метана ($T_{кип} - 161.5^\circ C$), – «нулевого» гомолога ряда реперных n -алканов. В ОФ ВЭЖХ в ряду n -алкилфенилкетонов аналогичного гомолога не существует, так что для

экспериментальной оценки t_0 иногда используют разбавленные растворы либо бромида калия (KBr), либо тиомочевины $[CS(NH_2)_2]$ [1]. Такие значения t_0 обычно сильно зависят не только от расхода элюента, но и от его состава. Следовательно, единичные значения t_0 , определенные для элюентов известного состава, нельзя «распространять» на другие режимы, отличающиеся содержанием органического компонента элюента. Если же пренебречь вариациями t_0 , то это существенно снижает точность определения малых значений ИУ, типичных для гидрофильных соединений. В целом же, разные способы оценок t_0 намного подробнее разработаны для газовой хроматографии, нежели для ОФ ВЭЖХ (см. литературу, цитированную в работе [3]).

Вторая проблема, связанная с вычислением ИУ в ОФ ВЭЖХ, состоит в том, что первый реперный компонент – ацетофенон – не относится к гидрофильным соединениям (среднее значение его фактора гидрофобности $\log P$ равно 1.70 ± 0.09). Существует большое число гидрофильных соединений, параметры удерживания которых меньше, чем ацетофенона. Следовательно, вычисление их индексов удерживания возможно только экстраполяцией в область малых времен удерживания. С этой целью для использования в режиме градиентного элюирования был разработан алгоритм экстраполяции ИУ в шкале квадратов времен удерживания [4, 5]. Несмотря на это наиболее гидрофильные соединения характеризуются большим разбросом индексов удерживания, который часто превышает 50 ед.

Учитывая изложенное, задача настоящей работы состояла в критическом сопоставлении способов оценки параметра t_0 в ОФ ВЭЖХ и новых возможностей вычисления индексов удерживания с использованием рекуррентных соотношений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты, растворители. В работе использованы препараты трех последовательных гомологов n -алкилфенилкетонов $C_6H_5COC_nH_{2n+1}$ с $n = 1 \div 3$ (ацетофенон, пропиофенон, бутирофенон, Sigma-Aldrich Rus LLC, Россия) и бромида калия (х.ч., CAS № 7758-02-3; Sigma-Aldrich, Москва). Препарат «Бисептол» приобретен в аптеке. Образцы для анализа готовили растворением компонентов в 2-пропаноле (х.ч., Криохром, Санкт-Петербург), после чего их смешивали с подвижной фазой. Для

приготовления элюентов для ВЭЖХ использовали ацетонитрил (HPLC gradient grade, PanReac, Испания), метанол (х.ч., Крioxром, Санкт-Петербург) и деионизованную воду (удельное сопротивление 18.2 МОм см) с добавкой 0.1 % муравьиной кислоты (98 % «для анализа», PanReac, Испания). Дегазирование водно-ацетонитрильных растворов осуществляли фильтрованием под вакуумом и обработкой ультразвуком с использованием установки Сапфир ТТЦ, 420 Вт (Сапфир, Россия).

Условия хроматографического анализа. Определение времен удерживания реперных *n*-алкилфенилкетонов и отдельных аналитов в различных изократических режимах (водно-ацетонитрильные элюенты) проводили на жидкостном хроматографе высокого давления Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным детектором при сканировании в диапазоне длин волн 220–340 нм; обработку хроматограмм проводили для длин волн 220 и 254 нм. Использовали колонку Agilent Poroshell 120 EC-18 длиной 100, внутренним диаметром 3.0 мм (размер частиц сорбента 2.7 мкм). Расход элюента 0.5 мл/мин, температура колонки 35 °С, объем дозируемых проб 5 мкл. Кратность параллельных определений для каждого образца в каждом из режимов 2-3; разброс времен удерживания не превышал 0.01- 0.02 мин.

Определение времен удерживания в различных изократических режимах (водно-метанольные элюенты) проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence с диодно-матричным детектором и колонкой Phenomenex C18 длиной 250 мм, внутренним диаметром 4.6 мм (размер частиц сорбента 5 мкм). Расход элюента 1.0 мл/мин, температура колонки 30 °С. Пробы дозировали с использованием автосамплера SIL-20A/AC, объем проб 20 мкл. Кратность параллельных определений 2-3; разброс времен удерживания аналитов в диапазоне до 10 мин не превышал 0.01-0.02 мин.

Обработка результатов. Хроматограммы (водно-ацетонитрильные элюенты) получали, обрабатывали и хранили в программе Mass Hunter (Agilent Technologies). Для статистической обработки параметров удерживания использовали ПО Excel (Microsoft Office, 2010). Вычисление параметров рекуррентных зависимостей с шагом варьирования концентраций органического растворителя в составе элюентов ΔС = 5 % и построение графиков проводили с использованием ПО Origin (версии 4.1 и 8.1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Параметры удерживания несорбируемого компонента (t_0) при вычислении индексов удерживания. Логарифмические индексы удерживания [$f(t_R)$ = $\lg(t_R - t_0)$ в формуле (1)] используют как в газовой хроматографии (изотермические условия), так и в ОФ ВЭЖХ (изократические режимы элюирования). Логарифмы исправленных времен удерживания $\lg(t_R - t_0)$ теоретически должны линейно зависеть от числа атомов углерода в молекулах однотипных

гомологов, причем это соотношение справедливо как в газовой хроматографии, так и в ОФ ВЭЖХ [6, 7], что является следствием аддитивности свободных энергий взаимодействия «сорбат – неподвижная фаза» или «сорбат – сорбент»:

$$\lg(t_R - t_0) = an_c + b. \quad (2)$$

Поскольку для реперных компонентов $RI = 100n_c$, то соотношение (2) эквивалентно следующему:

$$RI = a' \lg(t_R - t_0) + b', \quad (3)$$

Из этого следует, что при вычислении ИУ можно пользоваться и интерполяционным соотношением (1), и уравнением линейной регрессии (3) как эквивалентными.

Смысл параметра t_0 интерпретируют по-разному. В газовой хроматографии [6] он соответствует реальному времени удерживания несорбируемого компонента значительно лучше, чем в ОФ ВЭЖХ [7]. С другой стороны, его можно рассматривать как некоторый коэффициент, который обеспечивает линейность соотношений (2) и (3), например, по критерию максимумов коэффициентов корреляции, R (см. литературу, цитированную в работе [3]). Однако экспериментальные значения и теоретические оценки t_0 могут существенно отличаться друг от друга, причем в наибольшей степени это типично именно для ОФ ВЭЖХ. Кроме того, в последнем случае экспериментальное определение t_0 обычно связано с дополнительными затратами времени и расходом элюента.

Наиболее известным соотношением для оценки t_0 по временам удерживания трех последовательных гомологов реперных компонентов в изотермических или изократических условиях является формула Петерсона и Хирша [8]:

$$t_0 = (t_{R,1} t_{R,3} - t_{R,2}^2) / (t_{R,1} + t_{R,3} - 2t_{R,2}). \quad (4)$$

Эта формула предложена для газохроматографического варианта разделения, но применима и в ОФ ВЭЖХ. Она является следствием соотношения (2), а именно условия $\lg(t_{R,2} - t_0) - \lg(t_{R,1} - t_0) = \lg(t_{R,3} - t_0) - \lg(t_{R,2} - t_0)$, решенного относительно t_0 . Если так, то вычисленные таким способом величины t_0 закономерно приводят значения логарифмов исправленных времен удерживания всех реперных компонентов к линейной зависимости от числа атомов углерода в молекуле, что схематически изображено рисунке. Поскольку коэффициент корреляции в этом примере $R = 1$, то погрешностями коэффициентов a и b можно пренебречь.

Из факта эквивалентности соотношений (1) и (3) проистекает несколько важных следствий, редко принимаемых во внимание в практической работе, особенно в ОФ ВЭЖХ. Во-первых, при использовании «классической» формулы (1) для вычисления ИУ можно выбирать любые сочетания

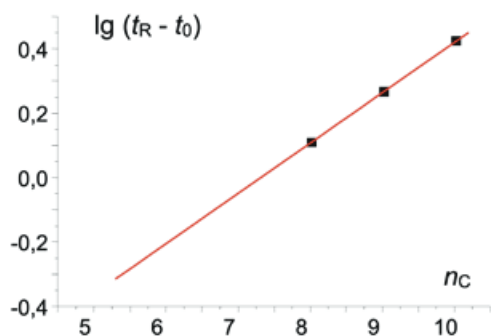


Рис. Линейная зависимость логарифмов исправленных времен удерживания реперных *n*-алкилфенилкетонов в ОФ ВЭЖХ от числа атомов углерода в их молекулах. Использовано вычисленное значение t_0 , обеспечивающее параметры линейной регрессии (2): $a = 0.158$, $b = -1.15$ при условии $R = 1$.

Fig. Linear dependence of the logarithms of the reference *n*-alkyl phenyl ketones adjusted retention times in RP HPLC vs. the number of carbon atoms in molecule. Precalculated t_0 value providing the parameters of linear regression (2) $a = 0.158$, $b = -1.15$ at the condition $R = 1$ was selected.

реперных компонентов, например C_8 и C_9 , C_9 и C_{10} , а также C_8 и C_{10} . В последнем случае множитель $(RI_{n+k} - RI_n)$ в формуле (1) закономерно равен 200. Кроме того, вместо этой формулы можно использовать уравнение линейной регрессии (3). Оба способа вычислений можно применять не только в области $t_{R,n} < t_{R,x} < t_{R,n+k}$, но и за ее пределами (экстраполяция), причем (важно!) даже для малых времен удерживания гидрофильных соединений, лишь незначительно превышающих значения t_0 . Экстраполяция в область больших времен удерживания не должна превышать приблизительно 200 ед. инд, из-за возможного увеличения погрешностей.

В табл. 1 приведены времена удерживания реперных *n*-алкилфенилкетонов $C_8 - C_{10}$ при разном содержании ацетонитрила в составе элюента (от 40

до 65 объемн. %), а также соответствующие им экспериментальные (определены по KBr) и вычисленные по уравнению (4) значения t_0 . И те, и другие имеют свои особенности. Экспериментальные значения t_0 представляются слишком завышенными, тогда как расчетные величины варьируют в широком диапазоне и в отдельных случаях даже отрицательны (-0.145). Тем не менее, именно они гарантируют линейность зависимостей (2) и, следовательно, предпочтительнее при вычислении ИУ. Для газовой хроматографии (изотермические условия) появление отрицательных вычисленных значений t_0 не отмечено.

Главной причиной больших различий экспериментально определенных значений t_0 и оценок по временам удерживания реперных компонентов в ОФ ВЭЖХ, по-видимому, следует считать то, что они могут относиться к соединениям, обладающим разной гидрофильностью, закономерности удерживания которых по-разному зависят от состава элюента. Если этот довод принять во внимание, то получается, что использование экспериментальных значений t_0 менее желательно, чем расчетных.

В качестве дополнительного теста как правильности оценок t_0 при использовании трех реперных компонентов, так и, следовательно, корректности последующих вычислений, можно рекомендовать вычисление индекса реперного компонента C_9 по временам удерживания реперных компонентов C_8 и C_{10} . Естественно, во всех случаях должно получаться $RI = 900$. Для иллюстрации рассмотрим тот же набор данных, который был выбран в качестве примера для рисунка (табл. 1, $C = 55\%$):

$$RI = 800 + 200 \times [\lg(2.16 - 0.29) - \lg(1.59 - 0.29)] / [\lg(2.98 - 0.29) - \lg(1.59 - 0.29)] = 800 + 200 \times (0.272 - 0.114) / (0.430 - 0.272) = 800 + 100 = 900.$$

Рекуррентные соотношения для оценки параметров удерживания несорбируемого компонента. Кроме известного уравнения Петерсона и Хирша (4) для оценки параметров удерживания несорбируемого компонента в изотермических или изократических условиях может быть рекомендован

Таблица 1

Времена удерживания реперных *n*-алкилфенилкетонов в разных режимах элюирования и соответствующие им экспериментальные и вычисленные (уравнение 4) значения t_0

Table 1

Retention times of reference *n*-alkyl phenyl ketones in various elution regimes together with the experimental and precalculated (equation 4) t_0 values

Реперный компонент	Содержание CH_3CN в элюенте, объемн. %					
	40	45	50	55	60	65
$C_6H_5COCH_3$	2.46	2.13	1.78	1.59	1.49	1.33
$C_6H_5COC_2H_5$	4.23	3.32	2.58	2.16	1.92	1.65
$C_6H_5COC_3H_7$	7.19	5.18	3.78	2.98	2.50	2.05
Экспериментальные значения t_0 , мин	*	-	1.24	-	-	1.30
Вычисленные значения t_0 , мин (формула 2)	-0.145	0.016	0.180	0.290	0.257	0.050
Рекуррентные оценки t_0 (соотношения 8 и 9)	-0.145	0.016	0.180	0.290	0.257	0.050

Примечание: * – экспериментальные значения t_0 в этих режимах не определяли.

и другой способ, основанный на использовании рекуррентных соотношений. Он был предложен еще в 2013 г [3], но до настоящего времени находит ограниченное использование, видимо, из-за «непривычности» самих рекуррентных уравнений, которые применимы к непрерывным функциям (A) целочисленных (уравнение 5) или равноотстоящих (уравнение 6) значений аргументов [9]:

$$A(n+1) = aA(n) + b, \quad (5)$$

$$A(x+\Delta x) = a'A(x) + b', \quad (6)$$

где Δx – постоянный инкремент значений аргумента, a и b – коэффициенты, вычисляемые методом наименьших квадратов.

Суть рекуррентных соотношений в том, что они позволяют привести к линейному виду самые разнообразные зависимости, в том числе даже такие, математический вид которых неизвестен. В число свойств, аппроксимируемых рекуррентными соотношениями, входят многочисленные физико-химические характеристики органических соединений, а также функции температуры, давления и концентраций компонентов смесей.

Если записать уравнение (6) для расположенных по убыванию абсолютных времен удерживания реперных n -алкилфенилкетонов, то получаем его следующую модификацию:

$$t_R(n_C - 1) = a''t_R(n_C) + b''. \quad (7)$$

Пользуясь этим уравнением по временам удерживания реперных n -алкилфенилкетонов $C_8 - C_{10}$ мы можем последовательно оценить времена удерживания гипотетических (реально не существующих) гомологов C_7 , C_6 , C_5 , и т.д., вплоть до нулевого числа атомов углерода в молекуле. Именно это значение равно времени удерживания несорбирующегося компонента t_0 . Однако вместо повторения однотипных вычислений можно сразу вычислить предельное значение $t_{R,x}$ для условия $n_C \rightarrow 0$ [3, 9]:

$$t_0 = \lim_{(n_C \rightarrow 0)} (t_R) = b'' / (1 - a''). \quad (8)$$

Критерием существования такого предела является условие $0 < a'' < 1$.

Для вычисления коэффициентов уравнения (8) фактически необходимо решить следующую систему уравнений, для чего можно воспользоваться любым доступным ПО (Excel, Origin и др.):

$$\begin{aligned} t_R(n_C + 1) &= at_R(n_C) + b, \\ t_R(n_C + 2) &= at_R(n_C + 1) + b. \end{aligned} \quad (9)$$

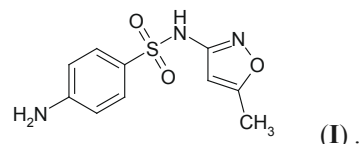
Поскольку из времен удерживания трех последовательных гомологов n -алкилфенилкетонов можно составить только два уравнения вида (9), то значения коэффициентов a и b не имеют оценок погрешностей, так же как и следующая из них величина t_0 . Важнейшей особенностью оценок

t_0 по соотношениям (9) и (8) оказывается то, что они равны значениям t_0 , вычисленным по уравнению Петерсона и Хирша (4). Математическое доказательство этого факта приведено в работе [3], так что здесь можно ограничиться только его упоминанием и анализом численного примера. В качестве такого примера рассмотрим вычисление аномального отрицательного значения $t_0 = -0.145$ для режима с содержанием ацетонитрила $C = 40\%$ (табл. 1). Исходная система уравнений для времен удерживания имеет вид:

$$\begin{aligned} 2.46 &= 4.23a + b \\ 4.23 &= 7.19a + b. \end{aligned}$$

Ее решением являются значения коэффициентов $a = 0.596$, $b = -0.0587$ и, далее, $t_0 = -0.0587 / (1 - 0.596) = -0.145$, что совпадает с результатом вычислений по формуле (4), который указан в табл. 1. Такое же совпадение наблюдается и в остальных режимах элюирования.

Применение рекуррентных соотношений при вычислении индексов удерживания гидрофильных соединений. Еще одна область применения рекуррентных соотношений возникает при необходимости определения индексов удерживания гидрофильных соединений, обладающих малыми временами удерживания даже при низких содержаниях органического компонента элюента. При этом времена удерживания реперных компонентов могут стать настолько большими, что их определение становится нерациональным. В результате составы элюентов для разделения n -алкилфенилкетонов и целевых аналитов могут не перекрываться или же перекрываться лишь в незначительной степени. Такая ситуация возникла, например, при определении индексов удерживания гидрофильного сульфаметоксазола (I) – действующего компонента препарата «Бисептол»:



В табл. 2 приведены параметры удерживания сульфаметоксазола (от 1.6 до 4.2 мин), определенные при содержании метанола в элюенте от 55 до 35 объемн. %. Параметры удерживания трех реперных n -алкилфенилкетонов определены в диапазоне концентраций метанола от 60 до 50 %. При последнем значении $C(\text{CH}_3\text{OH})$ время удерживания бутирофенона уже достигает 23.6 мин, так что дальнейшее уменьшение концентрации метанола нецелесообразно из-за слишком больших затрат времени. Таким образом, индексы удерживания соединения (I) могут быть непосредственно вычислены только при $C(\text{CH}_3\text{OH})$ 55 и 50 %, когда его времена удерживания составляют 1.62 и 1.90 мин и лишь незначительно превышают оценки параметра t_0 в этих режимах (1.52 и 1.45 мин). Исправленные времена удерживания (I) составляют всего 0.10 и 0.45 мин (всего две значащих цифры), что соответствует

Таблица 2

Экспериментальные времена удерживания реперных *n*-алкилфенилкетонов (при содержании метанола в элюенте от 50 до 60 объемн. %), вычисленные времена удерживания (при 40 и 45 %), экспериментальные времена удерживания сульфаметоксазола (от 35 до 55 %) и соответствующие им оценки t_0

Table 2

Experimental retention times of reference *n*-alkyl phenyl ketones (at methanol content in the eluent $50 \leq C \leq 60\%$ v/v), precalculated retention times (at $40 \leq C \leq 45\%$ v/v), experimental retention times of sulfamethoxazole (at $35 \leq C \leq 55\%$ v/v), and corresponding t_0 evaluations

Реперный компонент	Содержание CH ₃ OH в элюенте, объемн. %					
	60	55	50	45	40	35
C ₆ H ₅ COCH ₃	5.27	6.28	7.72	-*	-	-
C ₆ H ₅ COC ₂ H ₅	7.60	9.85	13.24	-	-	-
C ₆ H ₅ COC ₃ H ₇	11.41	16.10	23.64	-	-	-
Сульфаметоксазол	-	1.62	1.90	2.26	2.75	4.24
Реперный компонент	Параметры рекуррентных уравнений (10)			-		
C ₆ H ₅ COCH ₃	$a = 1.635, b = -1.023$			11.70**	17.94	-***
C ₆ H ₅ COC ₂ H ₅	$a = 1.510, b = -1.630$			18.37	26.11	-***
C ₆ H ₅ COC ₃ H ₇	$a = 1.604, b = -2.187$			35.73	55.12	-***
Вычисленные значения t_0 , мин (формулы 2 или 8 + 9)	1.60	1.52	1.45	1.36	1.29	-***
Индексы удерживания сульфаметоксазола	-****	608	611	613	614	-***

Примечания: * – слишком большие значения t_R не определяли; ** – курсивом набраны расчетные значения времен удерживания; *** – применение более двух «шагов» экстраполяции в область меньших концентрации органического компонента элюента не рекомендуется из-за возможного увеличения погрешностей результатов; **** – время удерживания целевого компонента практически совпадает со значением t_0 , что эквивалентно большой погрешности вычисления индекса удерживания.

низкой точности вычисленных на их основе индексов удерживания. Следовательно, определение $t_R(I)$ при больших концентрациях метанола в составе элюента не имеет смысла.

В подобных случаях целесообразно рекомендовать расширение массивов данных за счет экстраполированных времен удерживания как для целевых аналитов, так и (предпочтительнее, как в рассматриваемом примере) для реперных компонентов. Поскольку *n*-алкилфенилкетоны охарактеризованы значениями t_R при трех концентрациях органического компонента элюента, то для них справедлива еще одна модификация рекуррентных соотношений (6):

$$t_R(C \pm \Delta C) = at_R(C) + b, \quad (10)$$

где ΔC , как и выше, – постоянный «шаг» изменения концентрации органического компонента элюента (в данной работе $\Delta C = 5\%$). Знак «+» в уравнении (10) соответствует экстраполяции в область больших времен удерживания (меньших концентраций метанола), а «-» – меньших (больших концентраций метанола), соответственно.

Поскольку для каждого из реперных компонентов известны времена удерживания при трех значениях $C(\text{CH}_3\text{OH})$ (60, 55 и 50 объемн. %), то это эквивалентно всего двум точкам для вычисления

коэффициентов рекуррентной регрессии (10) (приведены в табл. 2). Однако этого вполне достаточно для оценки экстраполированных значений t_R реперных компонентов при содержаниях метанола 45 и 40 %. Для большей наглядности такие вычисления также можно проиллюстрировать примером для бутирофенона:

$$t_R(C = 45\%) = 1.604 \times 23.64 - 2.187 = 35.73 \text{ мин и}$$

$$t_R(C = 40\%) = 1.604 \times (1.604 \times 23.64 - 2.187) - 2.187 = 55.12 \text{ мин.}$$

Подобную последовательность итераций теоретически можно было бы продолжать и далее, однако из-за возможности накопления погрешностей в результатах целесообразно ограничиться только двумя итерациями. Дальнейшее вычисление величин t_0 по полученным экстраполированным значениям t_R ничем не отличается от использования экспериментальных данных, так же как и вычисление самих индексов удерживания. Таким образом, в результате несложных вычислений вместо двух значений ИУ сульфаметоксазола (для $C = 60$ и 55%) получаем четыре (дополнительно при $C = 45$ и 40%), на основании которых уже можно сделать вывод о незначительной зависимости индексов удерживания аналита от концентрации метанола в составе элюента (dRI/dC). В табл. 2 дополнительно вычисленные значения выделены курсивом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, возможности применения рекуррентных соотношений в обращенно-фазовой ВЭЖХ крайне разнообразны. Во-первых, их использование позволяет предложить метод оценки параметров удерживания несорбирующегося компонента («мертвое» время, t_0), альтернативный известному методу Петерсона и Хирша. Он основан на использовании рекуррентного соотношения $t_R(n_C - 1) = at_R(n_C) + b$, предельное значение которого ($n_C \rightarrow 0$) и соответствует «мертвому» времени удерживания, $t_0 = \lim (t_R)_{(n_C \rightarrow 0)} = b / (1 - a)$ при условии $0 < a < 1$.

Определение индексов удерживания гидрофильных соединений с малыми временами удерживания может быть осложнено несовпадением интервалов концентраций органических компонентов элюентов для таких аналитов и более гидрофобных реперных соединений. Применение рекуррентных соотношений позволяет дополнять массивы экспериментальных данных за счет экстраполированных значений как для целевых аналитов, так и (предпочтительнее) для реперных компонентов. Рекомендуемый для этих целей вариант имеет вид: $t_R(C \pm \Delta C) = at_R(C) + b$, причем знак «+» соответствует экстраполяции в область больших времен удерживания, а «-» – меньших.

БЛАГОДАРНОСТИ

Экспериментальные данные настоящей работы с метанолом в качестве компонента элюента получены в Ресурсном центре «Методы анализа состава вещества» Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета. Авторы благодарят сотрудников Центра за содействие.

ACKNOWLEDGEMENTS

Experimental data of current work with methanol as component of an eluent were performed at the Center for Chemical and Material Researches of Research Park of St. Petersburg State University. The authors are grateful to the staff of this Center for assistance.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kovats' Retention Index System. In *Encyclopedia of Chromatography*. Ed. J. Cazes. 3rd Edn. Boca Raton, CRC Press (Taylor & Francis Group). 2010. V. 2. P. 1304-1310.
2. Smith R.M. Retention indices in reversed-phase HPLC. *Advances in chromatography*. Eds: J.C. Giddings, E. Grushka. Boca-Raton: CRC Press. 2021. P. 277-319.
3. Зенкевич И.Г. Оценка «мертвого» времени газохроматографических систем в различных температурных ре-

жимах с использованием рекуррентных соотношений // *Журн. аналит. химии*. 2013. Т. 68, № 11. С. 1107-1116.

4. Зенкевич И.Г. Особенности использования системы линейно-логарифмических индексов удерживания в обращенно-фазовой ВЭЖХ // *Журн. прикладн. химии*. 1995. Т. 68, № 8. С. 1321-1327.
5. Retention indices as the most reproducible retention parameters in reversed phase HPLC. Calculation for hydrophilic phenolic compounds using reference n-alkyl phenyl ketones [I.G. Zenkevich, e. a.] // *J. Liquid Chromatogr. & Related Technol.* 2005. V. 28. P. 2141-2162.
6. Dead point: volume or time. In *Encyclopedia of Chromatography*. Ed. J. Cazes. 3rd Edn. Boca Raton, CRC Press (Taylor & Francis Group). 2010. V. 1. P. 557-558.
7. Void volume in LC. In *Encyclopedia of Chromatography*. Ed. J. Cazes. 3rd Edn. Boca Raton, CRC Press (Taylor & Francis Group). 2010. V. 3. P. 2430-2431.
8. Peterson M.L., Hirsch J. A calculation for locating the carrier gas front of a gas-liquid chromatogram // *J. Lipid Res.* 1959. V. 1. P. 132-134.
9. Zenkevich I.G. Recurrent Relationships in Separation Science. In "Chemometrics in Chromatography" Eds. L. Komsta, Y.V. Heyden, J. Sherma. N.Y.: Taylor & Francis. 2017. Chapt. 24. P. 449-468.

REFERENCES

1. Kovats' Retention Index System. In *Encyclopedia of Chromatography*. Ed. J. Cazes. 3rd Edn. Boca Raton, CRC Press (Taylor & Francis Group). 2010, vol. 2, pp. 1304-1310.
2. Smith R.M. Retention indices in reversed-phase HPLC. *Advanced in chromatography*. J.C. Giddings, E. Grushka (Eds.). Boca-Raton: CRC Press, 2021, pp. 277-319. doi: 10.1201/9781003209027.
3. Zenkevich I.G. Estimation of the dead time of gas-chromatographic systems under different temperature conditions with the use of recurrence relations. *J. Analyt. Chem.*, 2013, vol. 68, no. 11, pp. 992-1001. doi: 10.1134/S1061934813110178.
4. Zenkevich I.G. [Features of the application of the system of linear-logarithmic retention indices in reversed phase HPLC]. *Zh. Prikladn. Khimii* [Rus. J. Applied Chem.], 1995, vol. 68, no. 8, pp. 1321-1327 (In Russian).
5. Zenkevich I.G., Kochetova M.V., Larionov O.G., Revina A.A., Kosman V.M. Retention indices as the most reproducible retention parameters in reversed phase HPLC. Calculation for hydrophilic phenolic compounds using reference n-alkyl phenyl ketones. *J. Liquid Chromatogr. & Related Technol.*, 2005, vol. 28, pp. 2141-2162. doi: 10.108/JLC-200064000.
6. Dead point: volume or time. In *Encyclopedia of Chromatography*. Ed. J. Cazes. 3rd Edn. Boca Raton, CRC Press (Taylor & Francis Group). 2010, vol. 1, pp. 557-558.
7. Void volume in LC. In *Encyclopedia of Chromatography*. Ed. J. Cazes. 3rd Edn. Boca Raton, CRC Press (Taylor & Francis Group). 2010, vol. 3, pp. 2430-2431.
8. Peterson M.L., Hirsch J. A calculation for locating the carrier gas front of a gas-liquid chromatogram. *J. Lipid Res.*, 1959, vol. 1, pp. 132-134. doi: 10.1016/S0022-2275(20)39104-5
9. Zenkevich I.G. Recurrent Relationships in Separation Science. In *Chemometrics in Chromatography*. Eds. L. Komsta, Y.V. Heyden, J. Sherma. N.Y.: Taylor & Francis, 2017, Chapt. 24, pp. 449-468.