

УДК 543.544

МЕТОД ИСПОЛЬЗОВАНИЯ LOGP В ВЭЖХ. II. УДЕРЖИВАНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

*В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека,
Г.М. Фофанов, Л.Н. Балятинская
г. Белгород*

Предложенный в работе [1] подход является, вероятно, единственным методом, известным в настоящее время, способным обоснованно оценить результаты определения значений LogP (экспериментальных и расчетных по различным моделям) либо предсказать эти величины на основе относительного анализа удерживания в обращенно-фазовой ВЭЖХ. Однако при линейной зависимости факторов удерживания избранной пары веществ (в широком диапазоне составов подвижных фаз) остается вопрос об общности такой зависимости для стационарных фаз различных производителей и роли качественного состава подвижных фаз. Так, в работе [2] на основе анализа известных данных делается вывод о предпочтительности использования смесей на основе метанола и воды (в сравнении, например, с другим популярным модификатором элюента в обращенно-фазовой хроматографии – ацетонитрилом).

Задача данной работы состояла в сопоставлении хроматографического поведения ряда веществ на обращенных фазах различных производителей и в подвижных фазах с ацетонитрилом или метанолом в качестве органических модификаторов с использованием предложенного метода анализа.

Экспериментальная часть

Хроматографические исследования проводили с использованием микроколоночного хроматографа «Милихром-5» и хроматографа фирмы «Gilson» с спектрофотометрическим детектором «Holochrome». Использовали колонки размером 250×4.0 мм Диасфер-110-C18, 6 мкм (Биохиммак, Россия) Kromasil 100 C18, 5μ (Maisch GmbH), Separon SGX C18, 7 мкм (Элсико, Россия), 8×2.0 мм Диасфер-110-C18, 6 мкм (Биохиммак, Россия), 12×2.0 мм Separon SGX C18, 7 мкм (Элсико, Россия). Ввод пробы (20 мкл) осуществляли при помощи крана-дозатора Rheodyne 7125.

Для приготовления подвижных фаз использовали ацетонитрил (о.с.ч. УФ-205, ООО «ХромРесурс»), метанол и остальные вещества – квалификации от ч. до ч.д.а.

Использованные в настоящей работе экспериментальные и расчетные значения LogP взяты из сравнительных данных, представленных на сайте ACD, и получены интерактивным расчетом на сайте <http://146.107.217.178/lab/alogps/>.

Результаты и обсуждение

По предложенному [1] методу исследуется зависимость логарифмов факторов удерживания пары веществ в изократических условиях при различных составах подвижной фазы. Точка с координатами, определяемыми логарифмами коэффициентов распределения этих же веществ в системе октанол – вода, также (с рядом оговорок [1]) должна быть точкой регрессионной прямой, полученной по данным ВЭЖХ.

1. Относительное удерживание толуола относительно бензола

Подвижные фазы системы ацетонитрил – вода.

На рис. 1 представлены результаты, полученные с использованием стационарных обращенных фаз четырех различных производителей – двух колонок, заполненных сорбентом Диасфер-110-C18, по одной колонке с сорбентами Kromasil 100 C18, Nucleosil 100 C18, Separon SGX C18, причем последняя фаза изучалась в условиях микроколоночной хроматографии. Как видно из представленных данных, все точки хорошо укладываются на одну прямую линию ($r=0.95$; $n = 16$):

$$\lg k(\text{толуол}) = 0.140(\pm 0.007) + 1.140(\pm 0.011) \cdot \lg k(\text{бензол}) \quad (1)$$

Общность уравнения (1) подтверждается пересчетом по уравнениям зависимости удерживания этих же веществ от концентрации модификатора для еще одной фазы – Zorbax ODS [3] (пунктирная линия на рис. 1).

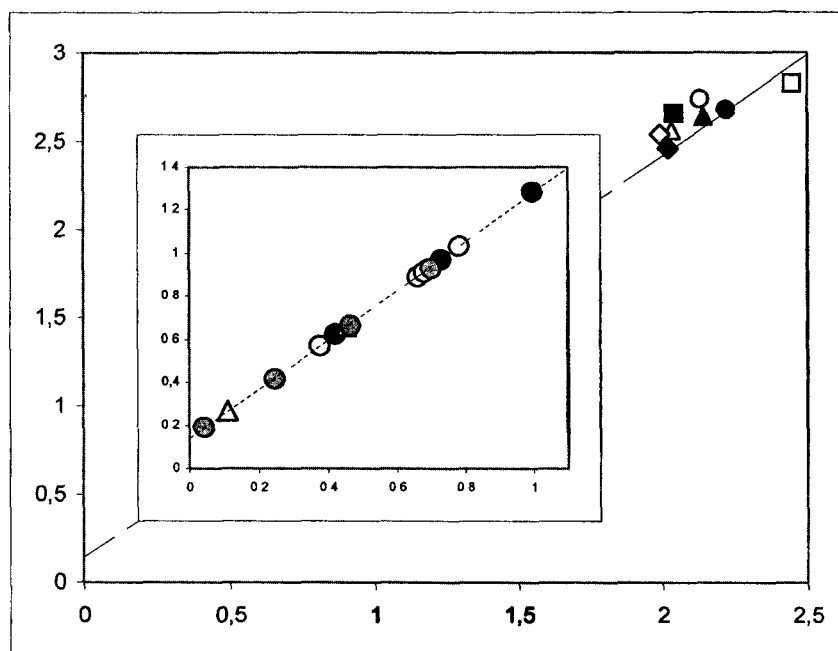


Рис. 1. Сопоставление удерживания толуола относительно бензола в элюентах системы ацетонитрил – вода

X_1 – k (бензол); X_2 – k (толуол), стационарные фазы: (○) – Диасорб-110-C18; (●) – Диасорб-110-C18; (●) – Кромасил-100-C18; (■) – Нуклеосил-100-C18; (△) – Сепарон SGX C18

Процедура аппроксимации удерживания веществ на чисто водные элюенты [4] весьма проблематична ввиду условной линейности зависимости удерживания веществ от концентрации органического модификатора. Это подтверждается анализом положения точек, построенных по данным, приведенным в работе [4]. Лишь две из восьми точек (полученных для подвижных фаз системы ацетонитрил – вода) с небольшой погрешностью ложатся на линию тренда (уравнение 1), рис. 2. Для других точек отклонения весьма заметны, причем различия в значении абсцисс точек свидетельствуют о том, что аппроксимация проведена на области с различным гидрофобно-гидрофильным балансом.

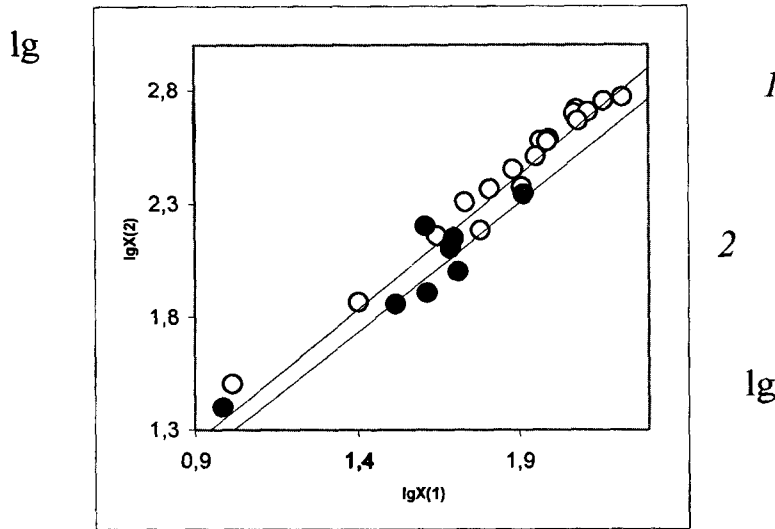


Рис.2. Сопоставление удерживаний толуола относительно бензола, аппроксимированных на чисто водные элюенты

Подвижные фазы систем. ацетонитрил – вода (1, ●), метанол – вода (2, ○); X_1 – k (бензол); X_2 – k (толуол), точки построены по данным работы [4] для различных стационарных фаз, линии тренда 1 – по уравнению 1; 2 – по уравнению 2

Сопоставление линии тренда (уравнение 1) и значений LogP (экспериментальных, полученных по ряду популярных моделей компьютерного расчета) приведено на рис. 3. Значения логарифмов коэффициентов распределения бензола и толуола (в системе октанол – вода) совпадают с линией тренда только для данных, полученных по программам XLogP и ACD/LogP. Расчетные значения, полученные по другим программам, отличаются от результатов, соответствующих поведению данной пары веществ в условиях ВЭЖХ в системе ацетонитрил – вода. Замечен также довольно большой разброс расчетных параметров по оси абсцисс, что указывает на использование исходных данных (в тренировочных рядах) при различных условиях (по гидрофильно-гидрофобному балансу).

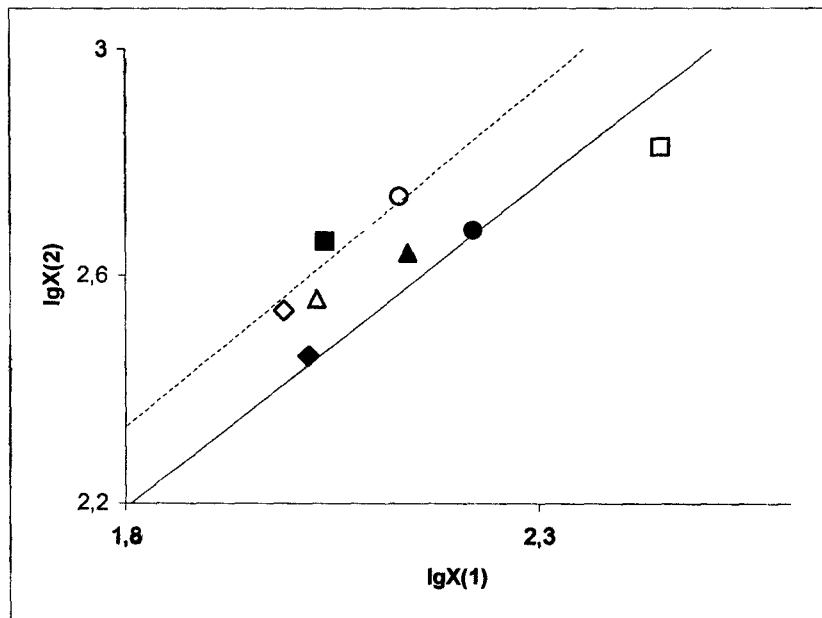


Рис. 3. Сопоставление расчетных и экспериментальных значений LogP и уравнений регрессии lgk толуола относительно бензола

X_1 – k (бензол); X_2 – k (толуол), системы ацетонитрил – вода (1) и метанол – вода (2); данные LogP: (○) – экспериментальные; (●) – ACD/LogP; (□) – SciLogP; (■) – BioByte; (△) – ALogP; (▲) – CLogP; (◇) – KOWWIN; (◆) – XLogP

Полученные результаты, однако, не свидетельствуют о том, что указанные две программы дают более правильные результаты по LogP и что экспериментальные результаты содержат большую погрешность. Напомним, что в работе [2] делается вывод о предпочтении использования для расчета LogP параметров удерживания веществ в элюентах системы метанол – вода по сравнению с данными, полученными в системе ацетонитрил – вода. Для проверки такого утверждения нами было проведено исследование удерживания толуола и бензола в системе метанол – вода.

Подвижные фазы системы метанол – вода.

При использовании микроколоночной ВЭЖХ на колонке, заполненной сорбентом Сепарон SGX C18, были получены результаты, также удовлетворяющие линейной зависимости ($r = 0.95$, $n = 4$) (рис. 4):

$$\lg k(\text{толуол}) = 0.176(\pm 0.020) + 1.199(\pm 0.060) \cdot \lg k(\text{бензол}) \quad (2)$$

При этом точка, определенная по экспериментальным значениям logP, оказывается точкой, принадлежащей данной прямой (рис. 3). Это свидетельствует о справедливости упомянутого выше утверждения (о предпочтительности использования для расчетов данных по удерживанию в системе метанол – вода). Линия тренда (с включением в базис экспериментальных значений logP бензола и толуола) показывает условность метода Калижана [4] по аппроксимации удерживания веществ на чисто водные элюенты и в системе метанол – вода: разброс точек по оси абсцисс значителен (рис. 2).

Впрочем, замена ацетонитрила на метанол не приводит к кардинальным изменениям. Расчет LogP толуола по уравнению 1 (при LogP бензола равном 2,13) приводит к результату, лишь менее чем на 6% заниженному по сравнению с рекомендуемым экспериментальным значением (2,59 против 2,73). Найденные несовпадения, возможно, следует отнести к различию свойства использованных органических модификаторов подвижной фазы. При близких значениях элюирующей силы метанола и ацетонитрила (S равно 3,0 и 3,1; P' равно 5,1 и 5,8 соответственно [4]) наличие неопределяемой связи в молекуле ацетонитрила способствует сольватации ароматического кольца, что подтверждается заметным различием элюирующей силы ацетонитрила и метанола для адсорбции на саже [5].

В работе [1] отмечалось, что одной из причин особенностей зависимостей относительного удерживания пар веществ может быть различие в механизмах удерживания. Если для бензола, малорастворимого в алифатических углеводородах, более вероятна плоская адсорбция на обращенной фазе, то для толуола возможно «якорное» внедрение метильной группой в углеводородную подложку. В таком случае, например, для пары орто-ксилол – толуол, для которой «якорный» механизм равновероятен, различие в поведении веществ при замене метанола на ацетонитрил может быть уменьшено.

2. Относительное удерживание орто-ксилола относительно толуола

Как показано на рис. 4 различие в поведении этой пары веществ в ацетонитрильных и метанольных растворах существует, но степень различия действительно уменьшена по сравнению с ранее рассмотренным случаем. Уравнения линий трендов ($r = 0.95$, $n = 12$ и 5 соответственно) для систем ацетонитрил – вода:

$$\lg k(o\text{-ксилол}) = 0.104(\pm 0.005) + 1.091(\pm 0.006) \cdot \lg k(\text{толуол}) \quad (3)$$

и метанол – вода:

$$\lg k(o\text{-ксилол}) = 0.142(\pm 0.004) + 1.110(\pm 0.010) \cdot \lg k(\text{толуол}) \quad (4)$$

экспериментальное значение LogP(толуол), равное 2,73, соответствует экстраполяционным значениям LogP(o-ксилол) 3,09 и 3,17 соответственно, которые различаются между собой лишь на 2,5 %, а различие между ними и экспериментальным значением (3,12) еще меньше.

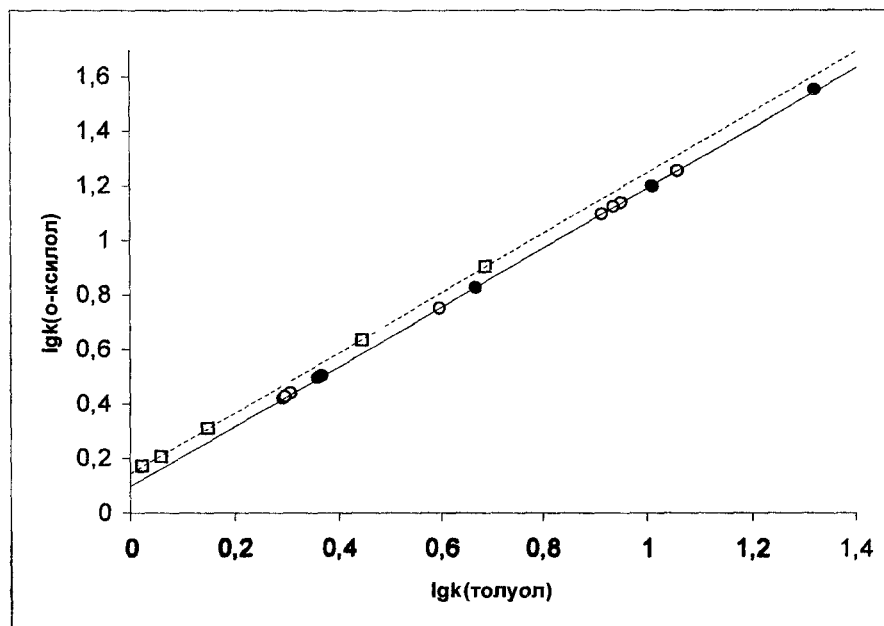


Рис. 4. Сопоставление удерживания *орто*-ксилола относительно толуола
 Подвижные фазы системы: (—) – ацетонитрил – вода; (---) – метанол – вода. Стационарные фазы: (●) – Диасорб-110-C18; (○) – Кромасил-100-C18; (□) – Сепарон SGX C18

Анализ удерживания в относительных координатах является подходящим методом для оценки расчетных значений LogP. Для пары веществ *о*-ксилол – толуол можно утверждать (рис. 5), что в расчетных программах KOWWIN и ALogP существенно преувеличен вклад метильной группы. Наиболее сбалансированы параметры расчетов по методу SciLogP, поскольку введение поправок на фазовое соотношение [1] может привести к совпадению линии тренда и двух точек: по экспериментальным данным и по расчетам по SciLogP. По смещению точек по оси абсцисс (рис. 3 и рис. 5) можно утверждать, что расчетные параметры не соответствуют системе октанол – вода, а смещены в пространстве гидрофобно-гидрофильных взаимодействий.

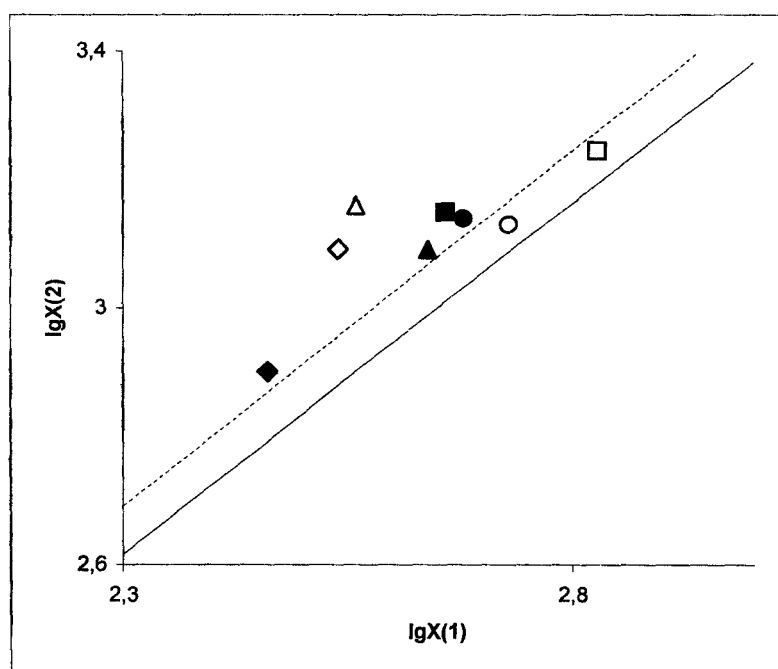


Рис. 5. Сопоставление расчетных и экспериментальных значений LogP и уравнений регрессии $\lg k$ *о*-ксилола относительно толуола
 $X_1 - k$ (толуол); $X_2 - k$ (*о*-ксилол), системы ацетонитрил – вода (1) и метанол – вода (2); обозначение данных LogP как на рис. 3

В работе [1] было показано, что для ряда «псевдогомологов» в относительных координатах характерно пересечение линий трендов с координатной биссектрисой в одной точке, что позволяет использовать данные по удерживанию этих веществ в одном составе подвижной фазы для расчета их LogP по простейшему уравнению:

$$\text{LogP}(i) = a + b \cdot \text{lgk}(i). \quad (6)$$

Но для удерживания этилбензоата и пропилбензоата относительно бензола в системе метанол – вода на колонке Separon SGX C18 получены зависимости:

$$\text{lgk}(\text{этилбензоат}) = 0.085 + 1.199 \cdot \text{lgk}(\text{бензол}) \quad (7)$$

$$\text{lgk}(\text{пропилбензоат}) = 0.236 + 1.303 \cdot \text{lgk}(\text{бензол}) \quad (8)$$

Нетрудно убедиться, что эти две прямые пересекают координатную биссектрису в различных точках. Но в таком случае применение уравнения (6) может привести к значительным погрешностям в расчетных значениях LogP. Следовательно, в общем случае, т.е. для группы веществ (тренировочного ряда), не являющихся «псевдогомологами», оправдан только вариант с использованием координат относительного удерживания. Существенно, что по предлагаемому методу вообще нет необходимости в исследовании удерживания веществ тренировочного ряда – достаточно исследования удерживания только пары веществ, для одного из которых известно (или принято) значение LogP.

Принятые или «договорные» значения LogP имеют реальный смысл для ВЭЖХ как дескрипторы зависимости «структура – удерживание», поскольку теоретически точная корреляция параметров удерживания с LogP возможна только при учете фазовых отношений используемого сорбента, различий в механизмах удерживания и особенностей сольватации исследуемых соединений для произвольного органического модификатора водных элюентов. В этом отношении разумно построение ВЭЖХ системы QSSR, основанное на предлагаемом методе, поскольку общность линий тренда при смене типа обращенной фазы установлена, по крайней мере, для использованных в данной работе фаз. Впрочем, ориентированная на ВЭЖХ система хроматографических индексов гидрофобности (СНІ) уже предлагалась в работе [6].

В данной работе подтверждена возможность одинакового изменения удерживания веществ для различных основ при одинаковой модификации строения пар веществ в относительных координатах [7]. Среди исследованных соединений существуют три пары веществ, модификация строения которых состоит в добавлении метиленовой группы: бензол → толуол, толуол → *o*-ксилол и этилбензоат → пропилбензоат. Если для первых двух пар добавление метиленовой группы не приводит к эквивалентным изменениям удерживания даже в относительных координатах (сравните уравнения 2 и 4), возможно, вследствие различия механизмов удерживания, то для пар толуол → *o*-ксилол и этилбензоат → пропилбензоат совпадение линий трендов очевидно (колонка Separon SGX C18, элюенты системы метанол – вода). Так при расчете удерживания пропилбензоата по уравнению (4) по экспериментальному значению удерживания этилбензоата (в единицах lgk) получены численные значения, отличающиеся от экспериментальных не более чем на 0,002. Это соответствует разности между расчетными и экспериментальными временами удерживания пропилбензоата 0,02 и 0,05 мин при временах удерживания 5 и 10 мин соответственно. При этом инкременты для обеих пар, определяемые традиционным методом как разность соответствующих логарифмов факторов емкости, неодинаковы для каждого состава подвижной фазы (различие превышает 0,011), т.е. использование констант (инкрементов) при стандартных расчетах (в том числе и LogP), без учета свойств основы неизбежно приведет к неточностям.

Таким образом, в данной работе показана общность линий трендов относительного удерживания пар ароматических веществ на обращенных фазах ряда различных производителей, что может быть использовано для создания ориентированной на ВЭЖХ системы QSRR. Использование предложенного метода подтвердило преимущество метанол-водных подвижных фаз для корреляции относительного удерживания пар веществ и значений их логарифмов коэффициентов распределения в системе октанол – вода. Высказаны предположения о причинах некоторых особенностей хроматографического поведения веществ в элюентах системы ацетонитрил – вода.

Работа выполнена по заданию Министерства образования и науки Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дейнека, В. И. Метод использования LogP в ВЭЖХ. I. Общие положения / В. И. Дейнека // Научные ведомости. Сер. Естественные науки / БелГУ. – 2005. – Вып. 1, № 2 (22). – С. 11-17.
2. Donovan, S. F. Method for measuring the logarithm of the octanol-water partition coefficient by using short octadecyl-poly(vinyl alcohol) high-performance liquid chromatography columns / S. F. Donovan, M. C. Pecsatore // J. Chromatogr. A. – 2002. – Vol. 952, № 1. – P. 47-61.
3. Шатц, В. Д. Высокоэффективная жидкостная хроматография / В. Д. Шатц, О. В. Сахартова. – Рига : Зинатне, 1988. – 390 с.
4. Molecular mechanism of retention in reversed-phase high-performance liquid chromatography and classification of modern stationary phases by using quantitative structure-retention relationships / R. Kaliszan, M. A. Straten, M. Markuszewski, C. A. Cramers, H. A. Claessens // J. Chromatogr. A. – 1999. – Vol. 855. – P. 455-486.
5. Colin, H. Selectivity for homologous series in reversed-phase liquid chromatography. I. Theory / H. Colin, G. Guiochon // J. Chromatogr. Sci. – 1980. – Vol. 18, № 2. – P. 54-63.
6. Valko, K. Chromatographic Hydrophobicity Index by Fast-Gradient RP-HPLC: A High-Throughput Alternative to log P/logD / K. Valko, C. Bevan, D. Reynolds // Anal. Chem. – 1997. – Vol. 69. – P. 2022-2029.
7. Дейнека, В. И. Определение антоцианов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Некоторые закономерности удерживания / В. И. Дейнека, А. М. Григорьев // Журнал аналитической химии. – 2004. – Т. 59, № 3. – С. 305.