

Август

2005

α УМУЧЕСКИЙ
НАУЧ

Редактор

К.С. Сычев

Рецензенты

Э.Л. Гоголашвили

Л.В. Сапрыкин

С.Н. Сычев

А.В. Удалов

Е.К. Федоров

Пространство для хроматографии

Константин С. Сычев

Найтек Инструментс, chromplus@list.ru, www.nytek.ru

Статья посвящена сравнительному анализу терминов "механизм удерживания" и "тип удерживания". Показано, что при помощи такой качественной, большей частью умозрительной характеристики как "механизм удерживания" (так, как она понималась ранее и продолжает пониматься теперь), нельзя достаточно удовлетворительно описывать и предсказывать закономерности удерживания в произвольных хроматографических системах. Для более строгого описания предложено применять экспериментально определяемую, количественную характеристику, которую можно назвать "типом удерживания", или "составляющей удерживания (определенной природы)". Составляющие удерживания вычисляются при помощи статистической процедуры факторного анализа из хроматографических данных по удерживанию представительной выборки адсорбатов в исследуемых хроматографических системах.

Таким образом, совокупность нескольких типов (составляющих) удерживания может применяться для описания произвольной системы, и, таким образом, рассматриваться как некоторый базис "хроматографического пространства".

1. Введение
2. "Тип удерживания" как характеристика хроматографической системы
3. Логическая связь между типом удерживания и видом хроматографии
4. Расчет количественной характеристики типа удерживания (составляющей удерживания) при помощи метода факторного анализа
5. Пример расчета составляющих удерживания
6. Л.В. Сапрыкин. Рецензия на статью
7. Е.К. Федоров. Рецензия на статью
8. Ответ автора на рецензию Е.К. Федорова

Уважаемые коллеги!

Любую хроматографическую систему, теоретически, наверное, можно было бы описать путем суперпозиции типов физико-химических взаимодействий с какими-либо коэффициентами. В сущности, этой, на мой взгляд, принципиально неразрешимой задачей и пытались заниматься многие хроматографисты-теоретики на протяжении уже десятков лет.

На поверку, однако, оказывается, что моделирование на этом уровне обречено на неудачу, если речь идет не об одной-двух наиболее "простых" системах, а о десяти или ста системах, причем достаточно "сложных".

Основная причина сложности моделирования на уровне типов взаимодействий (или, как их называли на "хроматографический" лад, - механизмов удерживания) заключается в том, что, во-первых, физические модели этих взаимодействий являются слишком простыми фактически и слишком сложными расчетно; во-вторых, проверка этих моделей, как правило, осуществляется на наиболее "простых" системах, специально подобранных для этих целей. В реальности же "простые" системы встречаются крайне редко; в большинстве хроматографических систем удерживание и селективность определяются целым комплексом межмолекулярных взаимодействий, которые нельзя разделить на составляющие их типы ни экспериментально, ни даже "умозрительно" (и тем более нельзя определить загадочные коэффициенты, см. цитату из Ричарда Фейнмана).

Таким образом, описание свойств хроматографических систем на языке типов межмолекулярных взаимодействий (механизмов удерживания) являются недостаточно удобным и практичным (здесь эти прилагатель-

Тут в плане выяснения механизмов сорбции важно помнить, что обычно наука не делается ради науки. Знание механизма, хотя бы в первом приближении, ценно в плане практике тем, что позволяет целенаправленно делать какие то телодвижения по улучшению разделения, формы и асимметричности пика, экспрессности анализа. А в некоторых случаях позволяет и предсказать (пусть даже не на 100%) результат эксперимента, а значит - экономить силы время и средства за счет исключения необходимости проведения заведомо бесперспективных экспериментов, а также бессистемного варьирования состава элюента в надежде методом "научного тыка" найти оптимальный вариант разделения.

Далее, важно видеть за всей цифровой эквилибристикой физический смысл получающихся зависимостей и границы применимости предлагаемых моделей.

Леонид В. Сапрыкин,
аналитический форум anchem.ru

Мы обнаружили, что всякое состояние в мире может быть представлено в виде суперпозиции (линейной комбинации с подходящими коэффициентами) базисных состояний. Вы вправе спросить, во-первых: каких именно базисных состояний? Что ж, возможностей тут немало... Имеется очень много различных представлений - аналогов различных систем координат, которые можно применять для представления обычных векторов. Затем можно спросить: с какими коэффициентами их брать? А это уж зависит от физических обстоятельств. Различные совокупности коэффициентов отвечают различным физическим условиям.

Здесь важно знать одну вещь - "пространство", в котором вы работаете, иными словами, знать, что эти базисные состояния означают физически. Так что первое, что вы, вообще говоря, должны знать, - это на что похожи базисные состояния. Тогда вам станет понятно, как описывать положение вещей на языке этих базисных состояний.

Ричард Фейнман,
Фейнмановские Лекции по Физике

ные звучат как синонимы).

Когда у меня оформлялась идея альтернативного подхода к проблеме, для формального описания хроматографических систем я все еще пользовался термином "механизмы удерживания". Соответственно, постепенно приписывал привычному термину совсем иное

значение, что не было хорошо.

Вадим А. Даванков сразу назвал мои механизмы "типами удерживания", а Леонид В. Сапрыкин сказал: "Только мой совет: не стоит использовать в статьях укоренившихся в сознании людей определений и понятий, наделяя их несколько другим значением и/или смыслом. Лучше придумать свой термин и дать ему четкое определение. А дальше использовать в свое удовольствие. Так даже солидней будет, да и "гуси" раздражаться не будут. Я бы, например, для твоих вычисляемых факторов ввел бы дополнительное определение "составляющая (компонента) хроматографического удерживания (такой-то природы)". А механизм удерживания - всегда суперпозиция этих компонент. Вот тогда все становится на свои места". Я решил придерживаться этих советов. Пока, правда, вопрос с названием все еще "на повестке дня". Временно (и в этой статье) буду говорить о типах, или составляющих удерживания.

"Тип удерживания" как характеристика хроматографической системы

Идея выхода из трудной ситуации следует из наблюдения, что различные типы межмолекулярных взаимодействий наиболее часто встречаются в хроматографических системах лишь в определенных сочетаниях, а в каких-то сочетаниях не встречаются совсем. Более того, приемлемых сочетаний такого рода существует на практике весьма ограниченное количество.

Назовем модель некоторого "часто встречающегося" в хроматографических системах сочетания типов межмолекулярных взаимодействий термином "тип удерживания". Это будет являться не точным определением, а, для начала, первым, грубым приближением. Следующий важный вопрос, на который следует исчерпывающе ответить, звучит так: "Что же определенный таким образом тип удерживания будет означать на практике?"

Допустим, проведено хроматографирование некоторого (довольно представительного) набора адсорбатов на одной неподвижной фазе, но при различных подвижных фазах. В результате, пусть наблюдается, что, несмотря на различную элюирующую силу (соответственно, различное удерживание), все примененные подвижные фазы обеспечивают неизменную селективность системы по отношению к выбранной группе адсорбатов.

Этот факт прежде всего свидетельствует о том, что в разных хроматографических системах удерживание адсорбатов обусловлено теми же физико-химическими взаимодействиями, величина которых если и изменилась (точнее, действительно изменилась, так как изменилось удерживание), то для всех адсорбатов пропорционально, - ведь селективность осталась неизменной.

Сделаем второе, и последнее, допущение: что коэффициенты емкости (или исправленные времена удерживания) адсорбатов изменяются в ряду, хорошо соответствующем какому-либо их физико-химическому свойству, независимо определенному, или рассчитанному не из хроматографических данных. Этот факт может свидетельствовать о том, что один из типов межмолекулярных взаимодействий является в этом случае доминирующим.

В жидкостной хроматографии существуют всего несколько видов систем, отвечающих двум указанным выше условиям в достаточно широких рамках изменения химии неподвижной фазы и состава подвижной фазы. Назовем такие хроматографические системы "базовыми". Все дальнейшее изложение будет построено, исходя из такого утверждения: тип удерживания - это модель удерживания в базовой хроматографической системе. Это второе, более точное, определение типа удерживания, уже сочетающее в себе теорию жидкостной хроматографии с ее практикой. Согласно этому определению, понятие типа удерживания, с одной стороны, привязывается к характерному порядку

элюирования, селективности, свойственным определенным типам хроматографических систем. С другой стороны, тип удерживания - это также определенное "сочетание" различных межмолекулярных взаимодействий. Разработанная модель удерживания предполагает обладание как можно большей информацией о хроматографической системе: о структуре поверхности неподвижной фазы, характере взаимодействий адсорбата с подвижной фазой, строении адсорбционного комплекса и т.д.

Тип удерживания, выраженный количественно, можно называть составляющей удерживания (определенной природы), или дескриптором удерживания, или оставить название "тип удерживания" и для численной величины. По моему личному мнению, гораздо удобнее говорить о жидкостной хроматографии на языке "типов удерживания", чем на языке "типов взаимодействий". Особо следует отметить, что, как будет показано далее, тип удерживания является четко определяемой экспериментально, количественной характеристикой хроматографической системы, в отличие от гипотетических качественных (большей частью) типов взаимодействий, или механизмов удерживания.

Теперь попробую дать короткое определение типа удерживания "для учебников". Итак, тип удерживания - это модель системы, в которой реализуется определенный комплекс физико-химических взаимодействий, на практике проявляющийся как линейно независимая тенденция изменения селективности хроматографической системы.

Логическая связь между типом удерживания и видом хроматографии

Для жидкостной хроматографии можно выделить следующие основные типы удерживания: нормально-фазовый, обращенно-фазовый, ионообменный, лигандо-обменный, квази-нормально-фазовый, эксклюзионный. В принципе, в отдельные типы можно выделить ион-парные (нормально-фазовый, квази-нормально-фазовый, обращенно-фазовый) и ион-эксклюзионный типы.

Если попытаться кратко охарактеризовать каждый из типов удерживания, то получится следующая таблица (см. табл. 1).

Из таблицы видно, что практически каждому механизму удерживания, определенному таким образом, можно поставить в соответствие базовую хроматографическую систему, в которой бы он встречался в наиболее чистом виде. В такой базовой системе селективность разделения сравнительно нечувствительна к изменениям условий хроматографирования, и может служить признаком доминирования соответствующего типа удерживания в произвольной системе.

Термин "вид хроматографии" (или "режим хроматографии") обозначает все хроматографические системы, в которых доминирует определенный механизм удерживания (см. табл. 2).

В некоторых случаях, когда вклады двух (или более) механизмов становятся приблизительно равными, появляются трудности в названии режима хроматографирования. Иногда из этого положения выходят, называя такие режимы "смешанными" (mixed).

Достаточно часто в жидкостной хроматографии встречаются случаи, когда селективность произвольной системы не соответствует в точности селективности базовой системы, а в той или иной степени отклоняется от нее при изменении условий хроматографирования по определенному (возможно, априори неизвестному) правилу. Применение специального статистического метода (факторного анализа, о котором речь пойдет далее) в этих случаях дает следующий результат: в исследуемой хроматографической системе существует более одной линейно независимой тенденции изменения селективности. Основная, как правило, соответствует доминирующему механизму удерживания, а дополнительная - некоторому минорному "сочетанию" типов

Таблица 1. Основные типы удерживания в жидкостной хроматографии

Тип удерживания	Типы физико-химических взаимодействий	Соотносимые с механизмом удерживания физико-химические свойства адсорбатов	Базовые хроматографические системы
Нормально-фазовый	Диполь-дипольные (диполь-полевые), образование водородных связей	Дипольные моменты	НФ: силикагель, ПФ: гексан-диоксан-уксусная к-та, Адсорбаты: бензойные кислоты
Обращенно-фазовый	Дисперсионные и "сольвофобные" ("гидрофобные")	Коэффициенты распределения в системе "октанол-вода", растворимость в различных водно-органических системах	НФ: C18 модифицированный силикагель, ПФ: ацетонитрил-вода, Адсорбаты: монозамещенные бензолы, ароматические углеводороды
Нормально-фазовый в гидрофильной хроматографии	Образование водородных связей	-	НФ: NH ₂ модифицированный силикагель, ПФ: ацетонитрил-вода, Адсорбаты: полиспирты, сахара
Ионообменный	Ион-ионные и ион-дипольные	"Эффективная" плотность заряда иона	НФ: ионообменные фазы на основе крупнопористого силикагеля, "слабого" и "сильного" типов, ПФ: водный буфер, Адсорбаты: однозарядные неорганические ионы
Лигандо-обменный	Координационные взаимодействия	Константы диссоциации комплексов	-
Квази-нормально-фазовый	Пи-взаимодействия	Энергия перехода с переносом заряда в пи-комплексе адсорбата с НФ	НФ: сверхсшитый полистирол, HyperCarb, ПФ: гексан-хлороформ; Адсорбаты: монозамещенные бензолы, ароматические углеводороды
Эксклюзионный	-	Эффективный размер молекулы аналита	НФ: крупнопористый силикагель, ПФ: хлороформ, Аналиты: стандарты полистирола

Таблица 2. Виды жидкостной хроматографии и наблюдаемые в их условиях типы удерживания

Вид хроматографии	Типы удерживания, основной + (возможные дополнительные)	Профиль градиента ПФ
Нормально-фазовая	Нормально-фазовый + (квази-нормально-фазовый)	-
Обращенно-фазовая	Обращенно-фазовый + (нормально-фазовый, ионообменный)	Увеличение доли органического растворителя в системе органический растворитель-водный буфер
Гидрофильная	Нормально-фазовый + (различные)	Увеличение доли воды в системе органический растворитель-водный буфер
Гидрофобная	Обращенно-фазовый	Уменьшение ионной силы в системе органический растворитель-водный буфер
Эксклюзионная	Эксклюзионный + (различные)	-
Ионная	Ионообменный +(различные)	Увеличение ионной силы водного буфера, изменение pH водного буфера
Лигандообменная	Лигандообменный + (различные)	Увеличение концентрации добавки - лиганда, уменьшающего удерживание. Увеличение ионной силы водного буфера, изменение pH водного буфера
Квази-нормально-фазовая	Квази-нормально-фазовый + (обращенно-фазовый, нормально-фазовый)	Увеличение доли органического растворителя, способного к образованию пи-комплексов
Аффинная хроматография, "смешанные" режимы (полярный органический режим)	Различные	-

взаимодействий (которое, возможно, еще следует интерпретировать и назвать). Достаточно опометчиво было бы каждую такую тенденцию называть "типом удерживания"; в дальнейшем, можно называть ее просто фактором. Описать "сложную" хроматографическую систему можно будет, указав доминирующий механизм удерживания, а также возможные дополнительные факторы, влияющие на селективность системы.

Такое описание имеет важное следствие: нельзя формально утверждать, что какая-либо хроматографическая система является нормально-фазовой, обращенно-фазовой и т.д. лишь на основе марки адсорбента и состава подвижной фазы. Каждая система характеризуется определенным механизмом (механизмами) удерживания и определенными факторами, вклад которых в удерживание зависит не только от параметров системы, но также и от выборки адсорбатов.

Расчет количественной характеристики типа удерживания (составляющей удерживания) при помощи метода факторного анализа

Факторный анализ является статистическим методом обработки экспериментальных данных. Этот метод позволяет обобщить результаты эксперимента, то есть уменьшить количество исходных экспериментальных данных без потери информативности описания изучаемой системы.

Факторный анализ применяется в том случае, когда наблюдаемые параметры исследуемой системы коррелируют между собой, то есть описывают в какой-то мере сходные явления. Основное предположение, обосновывающее применение факторного анализа в хроматографии, состоит в том, что если наблюдаемые параметры (в данном случае - параметры удерживания в исследуемой хроматографической системе, $\log k'$) коррелируют (то есть не являются линейно независимыми величинами), то они описывают некоторые тенденции изменения селективности хроматографической системы. Число таких тенденций по определению должно быть меньше, чем число наблюдаемых параметров (условие применимости факторного анализа).

Эти тенденции и являются типами удерживания. Количественные характеристики типа удерживания (в дальнейшем будем называть их составляющими удерживания) не могут быть измерены напрямую, экспериментально, но могут быть математически выделены из наблюдаемых экспериментальных данных при помощи метода факторного анализа как факторы.

С математической точки зрения задача нахождения факторов сводится к задаче нахождения собственных векторов матрицы корреляции исходной матрицы экспериментальных данных. Собственные векторы пропорциональны факторам, а собственные значения пропорциональны вкладам факторов в описание исходных данных.

Теперь более подробное объяснение. Рассмотрим такую ситуацию: исходные экспериментальные данные представляют собой матрицу (таблицу) размерности $m \times n$, где m - число строк (объектов), n - число столбцов (параметров). Параметры можно представить как n векторов в m -мерном пространстве объектов. Взаимозависимость двух параметров (их "похожесть") выражается коэффициентом корреляции, который геометрически можно представить как косинус угла между векторами-параметрами. Таким образом, несколько сильно коррелированных параметров выглядят в пространстве объектов как пучок векторов (см. рис. 1).

Метод факторного анализа позволяет выделить наименьшее количество g некоторых новых линейно независимых параметров, которые могут описать систему практически так же хорошо, как и n экспериментальных параметров. Эти линейно независимые параметры, полученные из экспериментальных данных расчетным путем,

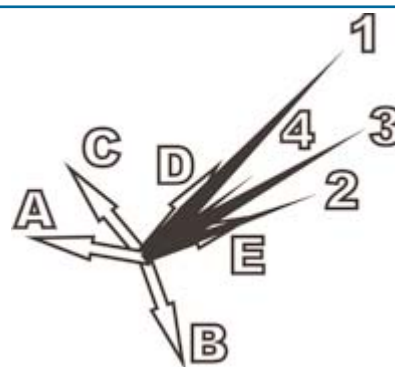


Рисунок 1. Параметры (1,2,3,4) в пространстве объектов (A,B,C,D,E)

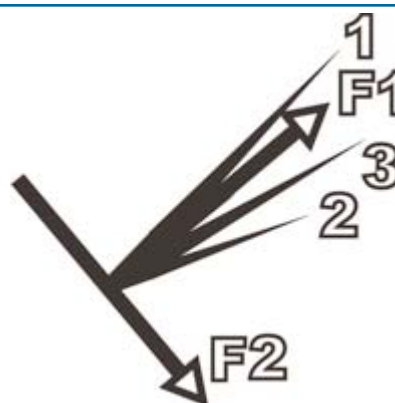


Рисунок 2. Параметры (1,2,3,4) в пространстве факторов (F1,F2)

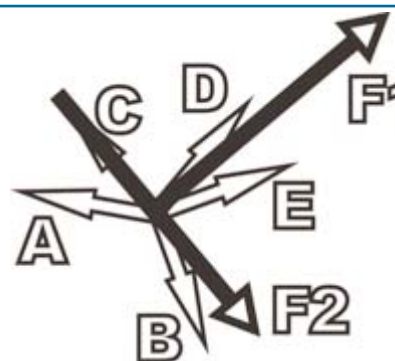


Рисунок 3. Факторы (F1,F2) в пространстве объектов (A,B,C,D,E)

называются факторами. Факторы можно представить как ортогональный базис (прямоугольную систему координат), по которому можно каждый экспериментальный параметр разложить на g составляющих. Геометрически коэффициенты такого разложения соответствуют проекциям параметров-векторов на оси-факторы, и называются факторными нагрузками (factor loadings). Матрица факторных нагрузок представляет собой таблицу размерности $g \times n$ (см. рис. 2). В пространстве объектов полученные факторы выглядят как m -мерные векторы. Матрица размерности $m \times g$, состоящая из проекций факторов на оси объектов, и называется, собственно, матрицей факторов (factor scores) (см. рис. 3). Таким образом, исходная матрица экспериментальных данных может быть представлена в виде произведения матрицы факторов на матрицу факторных нагрузок.

Метод факторного анализа реализован во мно-

гих статистических программных пакетах, к примеру, STATISTICA 5.0 (StatSoft).

Факторный анализ зарекомендовал себя как плодотворный метод исследования систем различных типов. Его применение позволяет получить ответы на несколько наиболее важных вопросов об изучаемой системе, среди которых можно выделить следующие.

1. Какое минимальное количество линейно независимых параметров необходимо для описания системы.
2. Как группируются наблюдаемые параметры (характеристики системы).
3. Как группируются объекты наблюдения.

В некоторых исследованиях наличие подобной первоначальной информации о системе является достаточным условием выполнения поставленной задачи. В этих случаях цель, как правило, состоит в группировке параметров и объектов согласно их свойств (кластерный анализ), то есть просто в систематизации имеющихся данных.

В более широком плане факторный анализ может применяться как метод формулирования и проверки новых гипотез. В этом случае факторы рассматриваются как дескрипторы, описывающие определенные тенденции к изменению наблюдаемых характеристик системы. Задача исследователя состоит прежде всего в планировании необходимого эксперимента и грамотной интерпретации получаемых дескрипторов-факторов. Интерпретацию факторов обычно проводят, рассматривая значения факторов и факторных нагрузок, а также проводя корреляции между факторами и какими-либо независимо определенными свойствами объектов или/и параметров.

Следует отметить, что факторный анализ может применяться только в том случае, когда исследуемая система переопределена наблюдаемыми параметрами, то есть когда в исходной матрице заведомо содержится избыток информации о системе. При недостатке информации количество факторов всегда равно числу параметров, то есть применение факторного анализа не дает никакого результата.

Понятие "системы" всегда определяется самим исследователем - так же, как и выбор наблюдаемых характеристик системы и объектов наблюдения.

Факторный анализ не может дать информации о системе больше, чем изначально заложено в матрице экспериментальных данных. По этой причине, эксперимент необходимо проводить таким образом, чтобы при минимуме затрат он обеспечивал максимум информации об исследуемой системе.

Итак, для определения составляющих удерживания для ряда схожих хроматографических систем необходимо:

1. Измерить ряд величин удерживания для выборки адсорбатов в исследуемых системах.

Варьировать можно и состав подвижной фазы, и неподвижные фазы. Однако, чем больше разнородных систем входит в эксперимент, тем все большее число факторов выделяется в результате, и тем менее очевидны получаемые закономерности (и воспроизводимы составляющие удерживания).

В качестве экспериментально определяемой величины удобно применять логарифм фактора емкости $\ln k'$. Эта характеристика удерживания является безразмерной величиной, пропорциональной изменению энергии Гиббса при адсорбции (при определенной температуре и, строго говоря, давлении).

2. Расположить экспериментальные данные в таблицу (матрицу): параметры (столбцы) должны соответствовать различным хроматографическим системам, а объекты

(строки) - различным адсорбатам.

3. Провести обработку данных методом факторного анализа; выделить основные факторы.

4. Основываясь на первоначальных предположениях, интерпретировать полученные факторы как определенные составляющие удерживания. Что может произойти не всегда - шансы успешно интерпретировать результаты повышаются, если в эксперимент включаются только схожие системы (к примеру, варьируется лишь состав подвижной фазы при неизменной неподвижной).

С помощью этого метода можно отслеживать закономерности изменения селективности хроматографических систем в рамках заданных условий эксперимента. На основании корреляции с селективностями базовых систем факторы можно приписывать к соответствующим типам удерживания и, таким образом, находить вклады (составляющие) различных типов удерживания в общее удерживание.

Динамику изменения вкладов в зависимости от состава элюента можно проследить, к примеру, следующим образом:

1. получить $\ln k'$ для десяти составов элюента (десять параметров) и расположить их в порядке изменения концентрации одного из компонентов;
2. составить из десяти параметров шесть матриц по пять параметров, на каждом шаге исключая по одному параметру "слева" и добавляя один параметр "справа";
3. с помощью факторного анализа получить шесть значений вклада определенного механизма в удерживание и отложить их по оси ординат; на оси абсцисс каждому значению вклада должна соответствовать концентрация выбранного компонента элюента, взятая "в середине" матрицы.

Осталось выразить надежду, что этот, безусловно, очень перспективный метод получит свое развитие в последующих работах теоретиков и практиков хроматографии.

Пример расчета составляющих удерживания

Для иллюстрации процесса расчета составляющих удерживания и их интерпретации осмелюсь предложить небольшой пример, взятый из моей кандидатской работы. Пр процитирую дословно выдержку из автореферата. Думаю, комментарии здесь не понадобятся.

Ряд экспериментов, проведенных на нейтральном гидрофобном сверхсшитом полистироле в рамках данной работы, выявили уникальное свойство этого материала - способность удерживать ненасыщенные соединения, в особенности с сопряженными пи-системами, при применении подвижных фаз на основе гексана и других неполярных растворителей.

Такого рода системы не соответствовали "классическим" канонам разделения хроматографических систем на нормально-фазовые ("полярная НФ и неполярная ПФ") и обращенно-фазовые ("неполярная НФ и полярная ПФ"), так как они соответствовали ситуации "неполярная НФ и неполярная ПФ". Такого рода хроматографические системы были нами названы "квази-нормально-фазовыми" (КНФ).

Основная исходная гипотеза удерживания ненасыщенных соединений на сверхсшитом полистироле в квази-нормально-фазовом режиме заключалась в том, что удерживание здесь происходит за счет образования лабильных пи-комплексов между адсорбентом и адсорбатами. Для экспериментальной проверки этой гипотезы, а также для возможной оценки вклада пи-взаимо-

действий в удерживание в разных хроматографических режимах, были проведены две серии экспериментов.

Первая серия экспериментов была проведена на фазе 250x4.6 Chromalite 5HGN (сверхсшитый полистирол) в квази-нормально-фазовом режиме: были получены значения $\ln k'$ для трех хроматографических систем (системы 1-3, см. табл. 1) на одной модельной смеси адсорбатов (ароматические углеводороды, в том числе монозамещенные бензолы); в дополнение, значения $\ln k'$ были получены и в обращенно-фазовом режиме для сокращенной модельной смеси адсорбатов (системы 4-6, см. табл. 1). Для сравнения, в обращенно-фазовом режиме для сокращенной модельной смеси были получены значения $\ln k'$ на C18 фазе 250x4.6 Zorbax SB-C18 в двух хроматографических системах (системы 7-8, см. табл. 3).

Таблица 3. Исследованные системы

Система 1	Пентан-хлористый метилен-изопропанол 60:20:20
Система 2	Пентан-хлористый метилен-изопропанол 70:20:10
Система 3	Пентан-хлористый метилен-изопропанол 85:5:10
Система 4	Ацетонитрил-тетрагидрофуран-вода 70:10:20
Система 5	Ацетонитрил-хлористый метилен-вода 80:10:10
Система 6	Ацетонитрил-изопропанол-вода 70:20:10
Система 7	Ацетонитрил-вода 60:40
Система 8	Ацетонитрил-вода 50:50

Из хроматографических данных, полученных в квази-нормально-фазовом режиме, были выделены два фактора: первый $F_{1КНФ}$ основной, со вкладом 95.8%, и второй $F_{2КНФ}$ минорный, со вкладом 3.8%. Из данных, полученных на сверхсшитом полистироле в обращенно-фазовом режиме, был выделен лишь один фактор $F_{ОФ}$ со вкладом 99.85%; также один фактор $F_{ОФ-C18}$ (99.96%) описывал удерживание на C18 фазе в обращенно-фазовом режиме.

Основная гипотеза, таким образом, была переформулирована следующим образом: доминирующий фактор $F_{1КНФ}$ является дескриптором, отражающим пи-взаимодействия в квази-нормально-фазовой хроматографической системе. Доказательство этого утверждения являлось основной целью первой серии экспериментов.

На рисунке 4 показана типичная хроматограмма тестовых адсорбатов в одной из исследованных квази-нормально-фазовых хроматографических систем. Из хроматограммы видно, что наименьшим удерживанием обладают толуол (и бензол); производные бензола с мощными либо электрон-донорными, либо электрон-акцепторными заместителями в ароматическом кольце обладают большим удерживанием. Этот эффект можно интерпретировать, рассматривая лабильные пи-комплексы "адсорбат-адсорбент" как комплексы с переносом заряда (КПЗ). В первом приближении, энергия адсорбции в этом случае должна быть пропорциональна разнице в пи-электронной плотности ароматических систем адсорбата и адсорбента, или, в терминах теории МО, обратно пропорциональна разнице ВЗМО адсорбента и НСМО адсорбата (если адсорбат - акцептор), или разнице НСМО адсорбента и ВЗМО адсорбата (если адсорбат - донор).

Квантовомеханический расчет энергий молекулярных орбиталей - чрезвычайно непростая задача. С другой стороны, для заместителей в бензольном кольце разработан ряд эмпирических параметров - кон-

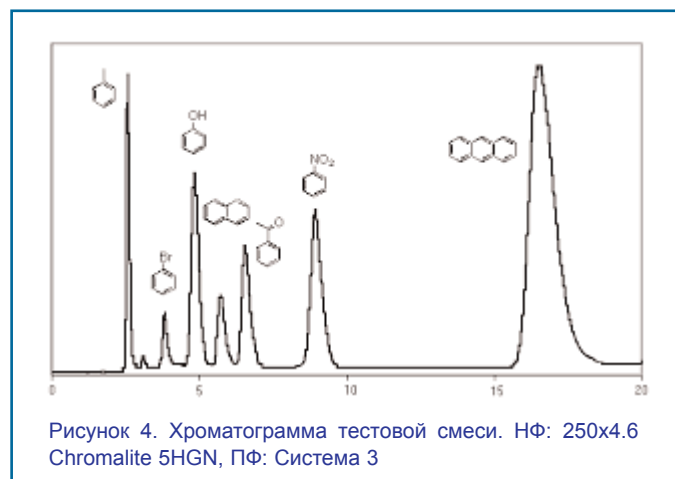


Рисунок 4. Хроматограмма тестовой смеси. НФ: 250x4.6 Chromalite 5HGN, ПФ: Система 3

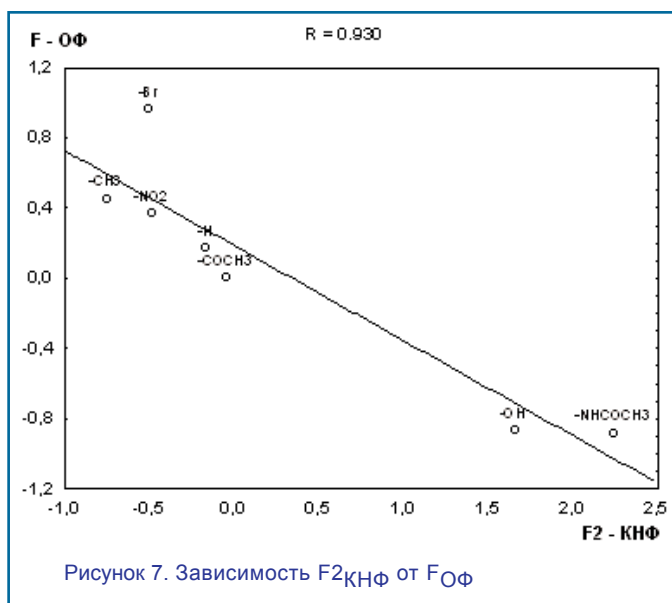
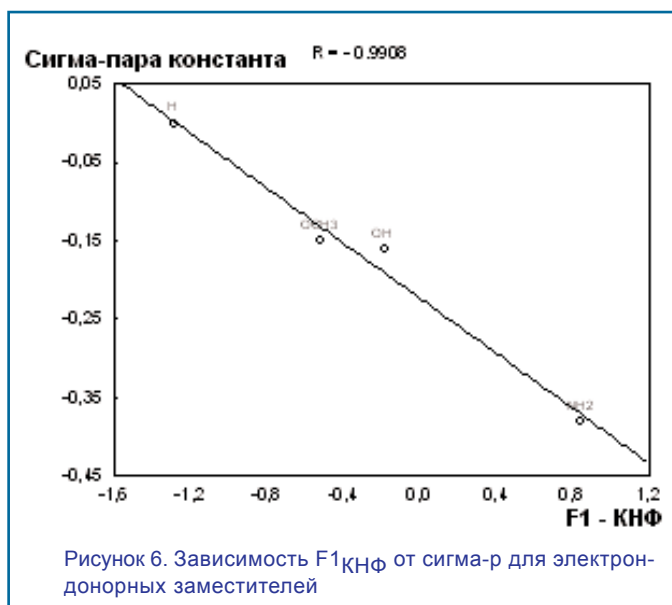
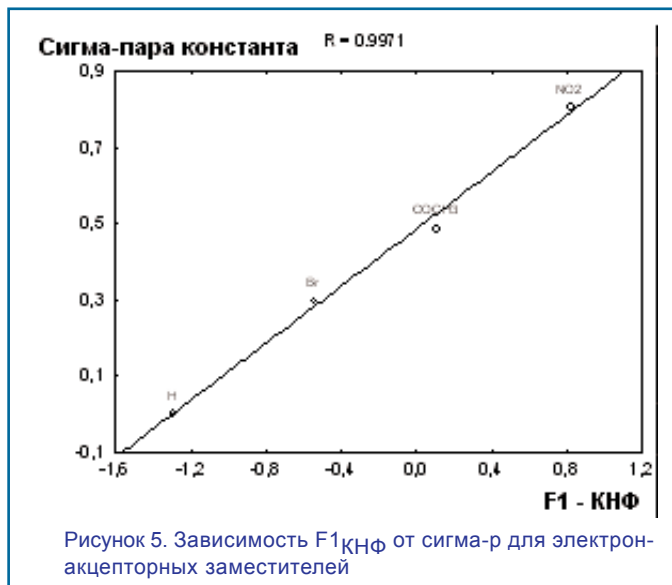
стант Гаммета-Тафта. В частности, сигма-р константа отражает величину мезомерного эффекта заместителя (в этом случае реализуется сопряжение через пи-систему кольца с реакционным центром другого заместителя, находящегося в пара-положении). В случае образования комплексов с переносом заряда реакционным центром является сама ароматическая система, а заместитель влияет на процесс образования КПЗ через мезомерный эффект. Таким образом, один и тот же процесс (образование лабильных пи-комплексов) может быть описан и с позиции теории МО, и с позиций теории ВС. Теория МО является более фундаментальной, точной, но и более сложной. Теория ВС же позволяет применять для описания межмолекулярных взаимодействий (с некоторым приближением) различные полуэмпирические схемы, в том числе и такой параметр как константа Гаммета-Тафта. Корреляция фактора $F_{1КНФ}$ с сигма-р константой свидетельствует о том, что $F_{1КНФ}$ является дескриптором пи-взаимодействий.

На рисунках 5 и 6 показаны зависимости $F_{1КНФ}$ от сигма-р для электрон-донорных и электрон-акцепторных заместителей с коэффициентами корреляции 0.991 и 0.997 соответственно. Таким образом, основная гипотеза была подтверждена: взаимодействие "адсорбент-адсорбат" в квази-нормально-фазовом режиме происходит в основном за счет образования лабильных пи-комплексов между адсорбентом и адсорбатами; в случае данного эксперимента дескриптором пи-взаимодействий являлся фактор $F_{1КНФ}$, его вклад в удерживание составило значение 95.8%.

"Обращенно-фазовый" фактор для сверхсшитого полистирола $F_{ОФ}$ хорошо коррелировал с соответствующим фактором для C18 фазы $F_{ОФ-C18}$. Эта корреляция подтверждает, что в типичных обращенно-фазовых условиях свойства сверхсшитого полистирола подобны свойствам C18 фаз, за исключением сильной разницы в гидрофобности, и в некоторых случаях - селективности.

Одним из наиболее интересных результатов явилась удовлетворительная корреляция минорного "квази-нормально - фазового" фактора $F_{2КНФ}$ с "обращенно-фазовым" фактором $F_{ОФ}$, при удалении из выборки адсорбатов нафталина (см. рис. 7); при удалении из выборки бромбензола корреляция становилась еще более очевидной.

Наиболее простой, "поверхностной" интерпретацией этого результата является предположение о двух типах удерживания в исследованных системах 1-3: доминирующего (95.8%) типа, включающего взаимодействия с переносом заряда, и дополнительного, обращенно-фазового типа (3.8%).



Л.В. Сапрыкин. Рецензия на статью К.С.Сычева "Пространство для хроматографии"

Мне довольно просто было рецензировать эту статью, так как сюда вошли многие положения, вынесенные на защиту кандидатской диссертации Константина, которые мы не раз обсуждали как в процессе личных бесед, так и в форуме anchem.ru.

Не скрою, мне очень приятно, что ряд моих советов был воспринят автором, творчески переработан и использован в данной статье.

В первую очередь это касается четких и выверенных определений, снимающих все вопросы и разночтения при подаче столь непростого материала.

Безусловно, столь интересный подход к такой сугубо качественной характеристике хроматографической системы как "механизм удерживания" требует конкретизации многих понятий, что и было сделано в данной статье.

Стоит согласиться с автором, что составляющая удерживания - суть проявление конкретного типа взаимодействия данного сорбата с данным сорбентом. Причем, в зависимости от структуры сорбата, в одном и том же элюенте, на одной и той же колонке составяющие удерживания могут быть абсолютными разными. К примеру, если спирт или фенол могут удерживаться на силикагеле преимущественно за счет образования водородных связей, то для органического основания, например, при тех же условиях немалый вклад в удерживание будет приносить ионообменный механизм на силанольных группах.

Попытки оценить количественно вклад одной или нескольких функциональных групп и общей структуры сорбата на величину удерживания уже предпринимались. Стоит вспомнить того же В.Д.Шатца и предложенные им критерий гидрофобности, а также инкременты удерживания. Тем не менее, там был в большей степени экстраполяционный подход, который не позволял в большинстве случаев получить хорошее согласование расчетных величин с экспериментом.

В данном же случае, как верно заметил автор, в предложенном подходе нет попыток получить информации больше, чем ее имеется по результатам проведенного эксперимента или серии экспериментов. Просто обработкой некоего экспериментального массива данных методами факторного анализа выявляются и количественно оцениваются неочевидные закономерности, позволяющие количественно, а не только качественно (как было раньше) оценить вклад в удерживание сорбата различных составляющих.

Этот подход на самом деле довольно универсален и интересен именно тем, что позволяет зряче оценить природу взаимодействий, ответственных за удерживание данного сорбата и направлено менять состав элюента для подавления одной из составляющих удерживания и активизации другой, по каким либо причинам на данный момент более выгодной.

Статья написана в хорошем стиле, все положения достаточно обоснованы, а сама работа имеет законченный вид.

Сразу же прослеживаются перспективы по разработке системы сорбатов-тестов для количественного тестирования ВЭЖХ-систем.

Я сам с большим удовольствием при случае воспользуюсь предложенной автором системой для оценки степени проявления различных типов удерживания полифункциональных сорбатов в сложных хроматографических системах. Рекомендую публиковать статью без изменений.

Е.К. Федоров. Рецензия на статью К.С.Сычева "Пространство для хроматографии"

Не подвергая сомнению полезность в целом рассматриваемого подхода, хотелось бы немного побурчать о его ограничениях, как с математической, так и с сугубо практической точек зрения.

Автор не зря упоминает тот факт, что факторный анализ в применении к хроматографии сводится к отысканию вкладов в реальное удерживание некоторого наименьшего числа линейно независимых параметров, которые должны, в идеале, представлять собой ортогональный базис в пространстве факторов. Удовлетворяют ли выбранные типы удерживания, сведенные в таблицу, критериям, выделенным курсивом?

С некоторой натяжкой можно допустить, что все приведенные в таблице типы взаимодействий обусловлены совершенно различными механизмами. Но тогда возникает вопрос, покрывают ли они все факторное пространство, нет ли еще какого типа удерживания, ортогонального ко всем приведенным, но никогда не проявляющегося в чистом виде ни в одной из известных хроматографических систем? То есть, вопрос стоит о полноте базиса, не характеризует ли он лишь некоторое подпространство реальных факторов удерживания?

Вопрос этот не чисто теоретический, а связан с тем, что в выбранном подпространстве факторов, как мне кажется, вряд ли удастся приемлемо описать удерживание многих веществ на неподвижных фазах на основе двуокисей циркония и титана, не говоря уж о циклоспориновых привитых фазах (даже в ахиральном режиме). Полагаю, список можно продолжить. Да и в хорошо "обсосанных" обращенно-фазовых разделениях порядок выхода некоторых близких веществ, допустим, структурных изомеров, иногда можно поменять простой добавкой нескольких процентов тетрагидрофурана в подвижную фазу, либо заменой колонки одного изготовителя на колонку другой фирмы. В моей практике мне приходилось сталкиваться с подобными примерами. Какие факторы из перечисленных могут отвечать за подобное поведение хроматографических систем?

В том виде, в каком предложена данная модель, она несомненно подходит для учебно-методических и справочных целей и может обладать некоторой предсказательной способностью, при условии, что будет обработан достаточный набор экспериментальных данных. Но даже после обработки всего доступного объема хроматографических данных, или постановки множества специальных экспериментов с целью наполнения этой модели реальным содержанием, она вряд ли сможет конкурировать с опытом и интуицией грамотного хроматографиста-практика, хотя окажется несомненным подспорьем для начинающего.

Вобщем, колокольчик предложен, осталось повесить коту на хвост: кто займется?

Ответ автора на рецензию Е.К. Федорова

Насколько понимаю, все замечания сводятся к одному, вобщем-то, обоснованному сомнению: насколько предложенная формалистика жизнеспособна на практике? Буду отвечать по порядку.

1. "Удовлетворяют ли выбранные типы удерживания, сведенные в таблицу, критериям, выделенным курсивом?"

Безусловно, до конца не удовлетворяют. Но тут очень многое зависит от вольностей формулировки. Допустим, Евгений Федоров взял новенькую фазу, в описании которой указано, что это С18 фаза, и что прививка

"proprietary", то есть, грубо говоря, засекреченная фирмой. На основании надписи "С18" делается вывод, что колонка эта "обращенно-фазовая". В результате анализа выясняется, что селективность у нее уж больно какая-то необычная. Евгений говорит: "Константин, картина сия не вписывается в модель "обращенно-фазового" типа удерживания, "ортогональностью" тут и не пахнет". На что я отвечаю: "Евгений, эти фирмачи как-то по-особому вели прививку, или применяли лиганд с полярной группой, или делали полярный эндкеппинг. Все это привело к изменению характера взаимодействий, что эквивалентно появлению других факторов (типов удерживания) в дополнении к обращенно-фазовому. Это надо проверить - процедура описана в статье. Так что ортогональность никуда не пропадает".

2. "...вряд ли удастся приемлемо описать удерживание многих веществ на неподвижных фазах на основе двуокисей циркония и титана, не говоря уж о циклоспориновых привитых фазах..."

Ответ такой - а ты попробуй. Вот мне кажется, что получится.

С примечанием. Если речь идет о фазе, которая может проявлять какую-то специфическую селективность, "узнаваемость" к определенным анализам (комплементарность аффинных, импринтных, многих хиральных фаз), то это тоже выделится в отдельный фактор. Так, привитая белком полистирольная фаза будет проявлять огромную селективность к антигену, а вот бензол на ней будет удерживаться так же, как на любой другой обращенной фазе.

3. "То есть, вопрос стоит о полноте базиса..."

Да, есть такой вопрос. Мне кажется, что если не лезть глубоко в дебри, то можно его считать довольно полным.

4. "...и может обладать некоторой предсказательной способностью... хотя она вряд ли сможет конкурировать с опытом и интуицией грамотного хроматографиста-практика..."

Здесь пока только под мое честное слово. Может, еще как. Нет, не в обращенно-фазовой хроматографии, где хроматограмму иногда можно нарисовать до того, как она будет получена. Речь идет о системах "смешанного" типа. Хроматографист-практик хорошо ориентируется только там, где есть только один фактор. Немного добавился второй - и его рекомендации начинают напоминать вещание оракула.

Все дело в том, что человеческий мозг - идеальная машина для работы с неподробными данными (интуиция). На практике же данных обычно случается избыток, и вот при анализе избыточных данных машина берет реванш. Человека же "стопорит" от обилия материала. Поэтому компьютер незаменим для "отфильтровывания" массивов информации и выделения нескольких основных закономерностей.

(Статья принята для публикации по двум положительным рецензиям)

Код I г, III г