

## Контроль корректности вариаций параметров удерживания в обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием рекуррентных соотношений

**\*И.Г. Зенкевич, А. Деруиш, Д.А. Никитина, Т.А. Корнилова, А.А. Хакулова**

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

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

Поступила в редакцию 30 марта 2021 г., после исправления – 14 апреля 2021 г.

Рекуррентная аппроксимация абсолютных времен удерживания аналитов ( $t_R$ ) в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) при разных содержаниях органического компонента в составе элюента (С) рекомендована как способ выявления обратимого образования гидратов. Критерием их образования являются отклонения зависимостей  $t_R(C + DC) = at_R(C) + b$  (\*) от линейности (DC – постоянный «шаг» вариаций концентраций; в нашем случае выбрано DC = 5 % объем.). Однако такие отклонения достаточно невелики и поэтому их измерение предъявляет особые требования к надежности используемого оборудования. Кроме того, их причиной могут быть и другие факторы, например, сложно контролируемое несоответствие реальных расходов элюента их заданным значениям. Сравнение значений  $t_R$ , полученных для одних и тех же аналитов с применением одной и той же колонки в одинаковых условиях, но на разных приборах, с использованием системы метанол – вода в качестве элюента подтвердило, что один набор значений составляет 76-98 % от величин, измеренных на другом приборе. Следовательно, расходы элюента во втором случае в такой же пропорции меньше, чем в первом. Предложен простой способ выявления подобных отклонений по результатам рекуррентной аппроксимации наборов значений  $t_R = f(C)$  любых соединений, не образующих гидратов в условиях ОФ ВЭЖХ (в нашем случае выбран хлорбензол). Значения коэффициентов корреляции (R) рекуррентных зависимостей (\*) превышающие 0.999 указывают на отсутствие влияния любых искажающих факторов.

**Ключевые слова:** Высокоэффективная жидкостная хроматография, контроль потока элюента, рекуррентные соотношения, тест-соединение (хлорбензол).

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2021, vol. 25, no. 2, pp. 117-125

DOI: 10.15826/analitika.2021.25.2.005

## Controlling the correctness of retention parameters variations in reversed phase HPLC using recurrent relations

**\*Igor G. Zenkevich, Abdennour Derouiche, Darja A. Nikitina,  
Tatiana A. Kornilova, Anna A. Khakulova**

*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 30 March 2021, received in revised form 14 April 2021

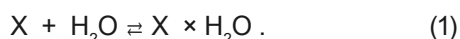
Recurrent approximation of analytes' net retention times ( $t_R$ ) in reversed phase high performance liquid chromatography (RP HPLC) at different contents of organic constituent in the eluent (C) is recommended as a method of revealing the reversible hydrate formation. The criterion of that are the deviations of the dependences  $t_R(C + DC) = at_R(C) + b$  (\*) from linearity, where DC is the constant increment of concentration variations; in our case DC = 5%. However, such deviations are rather small and, hence their measuring requires high robustness of the equipment involved. Besides hydrate formation, there are additional reasons for deviations, namely discrepancies between the real and the selected flows of the eluent. Comparing  $t_R$  values obtained

for the same analytes using the same chromatographic column at the same conditions, but with different HPLC instruments using the systems methanol – water as the eluent confirms that  $t_R$  values of one data set are equal only to approx. 76-98%  $t_R$  values of another data set. Therefore, the eluent flow in the second case exceeds that in the first regime at the same proportion. The simple method for revealing such flow deviations is proposed. It is based on the recurrent approximation of  $t_R = f(C)$  data sets for any compounds forming no hydrates in RP HPLC conditions (chlorobenzene was selected). The absence of the influence of any distorted factors is confirmed with values of correlation coefficients for recurrent dependencies (\*) exceeding 0.999.

**Keywords:** High performance liquid chromatography, eluent flow controlling, recurrent relations, test-compound (chlorobenzene).

## ВВЕДЕНИЕ

Выявление зависимостей параметров удерживания от состава элюентов,  $t_R = f(C)$ , относится к важнейшим приемам характеристики различных свойств как аналитов, так и сорбентов хроматографических колонок в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) [1-6]. Так, определение констант диссоциации органических кислот этим методом предполагает вариации состава (рН) и расхода элюента [7-10]. Обратимое образование гидратов некоторых лекарственных препаратов и N-замещенных арилсульфонамидов в условиях анализа методом ВЭЖХ [11-14] удалось установить на основании аномалий зависимостей их параметров удерживания от содержания органического компонента элюента:



Характеристикой устойчивости гидратов аналитов являются константы равновесия:

$$K_{\text{равн}} = [X \cdot H_2O] / \{[X] \times [H_2O]\} \quad (2)$$

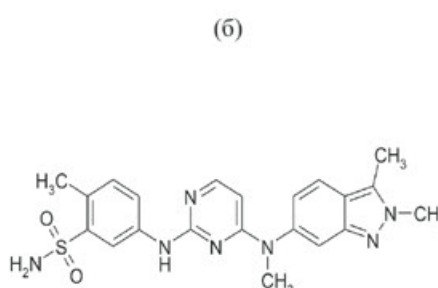
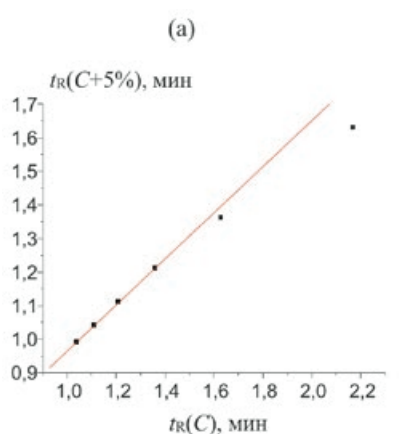
Гидраты большинства органических соединений отличаются нестабильностью ( $K_{\text{равн}} \ll 1$ ) [12]. Если

же  $K_{\text{равн}} \gg 1$ , то изменение содержания органического компонента (и, следовательно, содержания воды) в элюенте (C) может приводить к аномалиям рекуррентных зависимостей времен удерживания,  $t_R(C)$ :

$$t_R(C + DC) = at_R(C) + b \quad (3)$$

где DC = const – постоянный «шаг» изменения концентрации органического компонента элюента (в рассмотренных нами случаях [11-14] DC = 5 %), а и b – коэффициенты, вычисляемые методом наименьших квадратов.

Важнейшие особенности рекуррентной аппроксимации рассмотрены в работах [11-14]; там же приведены ссылки на публикации, в которых свойства рекуррентных соотношений обсуждаются более подробно. Для соединений с  $K_{\text{равн}} \ll 1$  или  $K_{\text{равн}} \gg 1$  уравнения линейной регрессии (3) характеризуются коэффициентами корреляции (R), превышающими 0.999. При столь высоких значениях R соответствующие этим уравнениям графики визуально не отличимы от прямых линий. Если же в области вариаций концентраций органического компонента элюента ( $C_{\text{мин}} - C_{\text{макс}}$ ) соотношение гидратированных и негидратированных форм аналитов (3) варьирует, то это приводит к нарушениям линейности зависимостей (3). Типичный вид графика рекуррентной



**Рис. 1. а)** Типичный вид графика, соответствующего рекуррентной аппроксимации времен удерживания аналита, образующего гидрат в условиях анализа методом ВЭЖХ; точки, соответствующие наибольшим значениям  $t_R$  и, следовательно, максимальному содержанию воды в элюенте, отклоняются «вниз» от линии регрессии. Использованы данные для соединения с тривиальным названием «Пазопаниб», структурная формула приведена на рисунке (б); элюент – система ацетонитрил – вода [11].

**Fig. 1. a)** Typical plot of recurrent approximation of retention times of analyte formed hydrate in HPLC conditions; the points, corresponding to the maximum  $t_R$  values and, therefore, to the maximum water content in the eluent, are located below the regression line. The data for the compound with trivial “Pazopanib” name are used, structure is presented at Fig. (b); Eluent acetonitrile – water [11].

аппроксимации времен удерживания ( $t_R$ ) соединения с тривиальным названием «Газопаниб», образующего гидрат в условиях анализа методом ВЭЖХ, приведен на рис. 1, а (структура аналита представлена на рис. 1, б): точки, соответствующие наибольшему значению  $t_R$  и, следовательно, максимальному содержанию воды в элюенте, заметно отклоняются «вниз» от линии регрессии [11].

Интерпретация такого эффекта основана на том, что соотношение (3) аппроксимирует ничем не искаженные зависимости  $t_R(T)$  в газовой хроматографии (где  $T$  – абсолютная температура) и  $t_R(C)$  в ВЭЖХ с коэффициентами корреляции  $R > 0.999$ . Если же на такие зависимости накладываются дополнительные искажающие факторы, в том числе гидратация аналитов, то линейность рекуррентных аппроксимаций нарушается. Помимо нескольких синтетических лекарственных препаратов этот эффект был подтвержден на примерах ряда специально синтезированных гомологов *N*-замещенных *p*-толуолсульфонамидов [12, 14].

Однако отклонения отдельных точек на графиках зависимостей (3) от линий регрессии достаточно малы (обычно на уровне нескольких сотых долей минуты, редко до 0.1–0.2 мин). Это предъявляет особые требования к точности измерения параметров удерживания и, следовательно, к характеристикам используемого оборудования. Прежде всего, это касается соответствия расходов элюентов заданным значениям и, как следствие, корректности соотношений их водной и органических составляющих. Эта проблема достаточно широко затронута в современной литературе как на уровне монографий [6, 15], так и оригинальных публикаций [16–19]. В связи с этим же небезынтересно заметить, что вопросы несоответствия заданных и установленных расходов элюента даже на современных приборах часто обсуждают в Интернете (см., например, <https://www.chromforum.org/viewtopic.php?t=18050>, дата обращения – март 2021 г.). В нашем случае по такому критерию только данные, полученные лишь на одном хроматографе (Режим 3, см. далее) [11, 13, 14] при использовании системы ацетонитрил-вода, не вызывают сомнений, поскольку соответствующий прибор регулярно проходит поверки различных уровней. В то же время, проверка линейности или нелинейности аппроксимации (3) при использовании системы метанол-вода на другом приборе (режим 1, см. далее) [12] не привела к столь же однозначным заключениям: для трех сульфонамидов были выявлены разные виды этой зависимости<sup>1</sup>.

В наибольшей степени это касается использования в качестве элюентов систем «метанол-вода»,

поскольку, в отличие от систем «ацетонитрил-вода», метанол способен к образованию водородных связей и, следовательно, теоретически может «конкурировать» с водой при образовании гидратов и сольватов с молекулами аналитов [20]. Однако весьма вероятным представляется и противоположный эффект: на многочисленных примерах газовых гидратов показано [21–24], что метанол способствует их разрушению за счет образования более устойчивых собственных гидратов. Показателем интереса к гидратам метанола являются номера CAS его моногидрата 118240-86-1 (ChemSpider) и 151900-28-6 (PubChem). Экспериментально определенная энергия гидратации метанола составляет –5.1 ккал/моль [22].

Выявление параметров зависимости (3) предполагает определение значений  $t_R$  характеризуемых соединений при разных составах элюента с последующей рекуррентной аппроксимацией времен удерживания, то линейность зависимости (3) может нарушаться в результате не только образования гидратов, но и влияния других искажающих факторов, в том числе, к сожалению, несоответствия расходов элюента заданным величинам. Проверка значимости этого фактора и способ его выявления являются целями настоящей работы.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реакционные смеси и их подготовка к анализу

Характеристики некоторых лекарственных препаратов, выпускаемых ЗАО «Биокад» (Санкт-Петербург) рассмотрены в работе [11]. Описание синтеза *p*-толуолсульфамидов из *p*-толуолсульфохлаорида (99%, ACROS ORGANICS, Бельгия) и аминов описано в работе [12]. Перед анализом 10 мкл реакционных смесей в хлористом метиле добавляли 10 мл метанола или изопропилового спирта (все растворители – ХЧ, «Вектон», Санкт-Петербург). Анализировали непосредственно реакционные смеси, поскольку избытки исходных аминов и их солей не мешают УФ-детектированию продуктов реакции. Примесь *p*-толуолсульфофосфорной кислоты регистрируется в виде пика в области несорбируемого компонента. В качестве тест-соединения для проверки корректности сравнения его параметров удерживания в разных режимах выбран хлорбензол (ХЧ «для хроматографии», «Реахим», Москва).

### Условия анализа методом ОФ ВЭЖХ

Хроматографический анализ реакционных смесей проводили на четырех хроматографах в различных режимах:

**Режим 1:** на хроматографе «Стайер-М» с УФ-детектором и колонкой Phenomenex C18, 250 × 4.6 мм, размер частиц сорбента 5 мкм. Компоненты подвижной фазы: деионизованная вода (удельное сопротивление 18.2 МОм×м) и метанол (99.8 %,

<sup>1</sup> Авторы хотели бы специально отметить, что критическое сравнение возможностей использованных в работе приборов разных моделей не входило в их задачи. Признаки несоответствия рабочих и заданных параметров у какого-либо из них чаще всего указывает не столько на недостатки оборудования, сколько является результатом его интенсивной эксплуатации.

HPLC Grade, J.T. Baker, США и ХЧ, «Вектон», Санкт-Петербург). Использовали режимы изократического элюирования при варьировании содержания метанола (С) в элюенте пределах от 40 до 80 объемн. %. Шаг варьирования концентрации метанола (DC) в этом и других режимах был выбран равным 5 %, так как при больших значениях DC число точек недостаточно для характеристики рекуррентных зависимостей, а при меньшем – существенно возрастают затраты времени и суммарный расход растворителей. Расход элюента 1.0 мл/мин, температура термостата колонки 30 °С, объем проб 20 мкл. Длины волн детектирования – 254 и 220 нм.

**Режим 2:** на хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence с той же самой колонкой, что и в режиме 1, и диодно-матричным детектором SPD-M20A (сканирование проводили в диапазоне длин волн 190-600 нм). Элюент – та же система вода-метанол, что и в режиме 1, расход элюента 1.0 мл/мин, температура термостата колонки 30 °С, объем проб 20 мкл. Для этого хроматографа предусмотрено регулярное техническое обслуживание.

**Режим 3:** на хроматографе Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным детектором и колонкой Agilent Poroshell 120 EC-CN, 100 × 3.0 мм (размер частиц сорбента 2.7 мкм) при температуре 40 °С. Элюент: система ацетонитрил (HPLC-gradient grade, Panreac, Испания) – деионизованная вода (получена на установке Milli-Q (Millipore, США, удельное сопротивление не менее 18.2 МОм×м). Сканирование проводили в диапазоне длин волн 220-340 нм; для обработки хроматограмм выбирали длины волн 220 и 254 нм. Расход элюента 0.5 мл/мин. Для дозирования использовали автосамплер SN G1329A, объем проб 5 мкл. Время удерживания несорбируемого компонента (0.94 мин при содержании ацетонитрила в элюенте 50 % объемн.) определяли по 0.1 М водному раствору бромида калия (ХЧ, Sigma-Aldrich). Хроматограммы получали, обрабатывали и хранили в программе Mass Hunter (Agilent Technologies). Этот хроматограф подвергают периодической проверке сторонней организацией и внутренней квалификации.

**Режим 4:** на хроматографе Waters с УФ-детектором и колонкой RTP-18, 100 × 4.0 мм (размер частиц сорбента 7 мкм) при температуре 25.0 ± 0. °С. Элюент: система ацетонитрил («Криохром», СПб) – бидистиллированная вода, объем проб 10 мкл. Для регистрации параметров хроматографических пиков использовали интегратор Spectrophysics (модель 745).

Во всех режимах для каждого образца было проведено не менее трех параллельных определений времен удерживания. Разброс значений не превышал 0.01- 0.02 мин. Для статистической обработки данных, вычисления параметров рекуррентных зависимостей и построения графиков использовали ПО Excel (Microsoft Office, 2010) и ORIGIN (версии 4.1 и 8.1).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

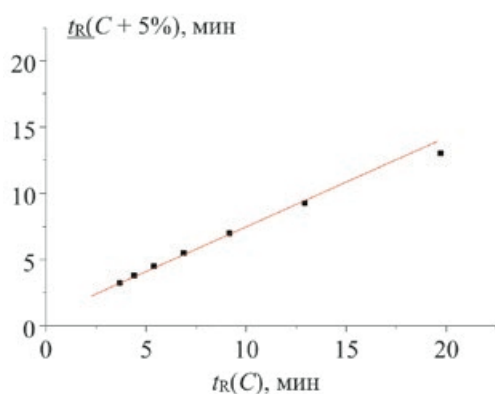
**Рекуррентная аппроксимация параметров удерживания при разных составах элюента как способ выявления образования гидратов аналитов.** Важнейшим свойством рекуррентных соотношений для хроматографических целей является возможность аппроксимации температурных зависимостей  $t_R(T)$  различных аналитов в газовой хроматографии и концентрационных зависимостей  $t_R(C)$  в ВЭЖХ [25] с коэффициентами корреляции ( $R$ ) не менее 0.999. Если же результаты такой аппроксимации демонстрируют отклонения от линейности, то это свидетельствует о дополнительных химических или инструментальных факторах, влияющих на химическую природу аналитов или на параметры режима разделения. Из факторов первого типа наиболее важны два: во-первых, это изменение соотношения молекулярных и ионизированных форм аналитов в результате возможного смещения положений кислотно-основных равновесий при вариациях состава элюента:



Однако для рассмотренных нами арилсульфонамидов [11-14] влияние этого фактора можно исключить, так как значения  $pK_a$  для них находятся в интервале  $11.2 \pm 0.8$ , что значительно больше pH используемых элюентов. В результате объяснение подобных аномалий возможно лишь за счет обратимого образования гидратов аналитов (1).

Второй причиной отклонения рекуррентных аппроксимаций параметров удерживания от линейности могут быть, к сожалению, инструментальные факторы, а именно несоответствие реальных расходов элюентов их заданным значениям и, в некоторых случаях, нарушение установленных соотношений их водной и органической составляющих.

Если кратко резюмировать полученные к настоящему моменту результаты, то для всех представителей серии N-замещенных *п*-толуолсульфонамидов  $\text{CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{-NHR}$  или  $\text{-NR}_2$  ( $R =$  аллил, диэтил, *трет*-бутил, фенил, бензил и гексил) при использовании ацетонитрила в качестве органической составляющей элюента образование гидратов, проявляющееся в нелинейности рекуррентных зависимостей (3), было подтверждено однозначно [11, 13, 14]. Во всех случаях был использован режим анализа 3 (см. экспериментальную часть) на приборе, который регулярно проходит проверки двух уровней: внешнем (свидетельство о проверке) и внутреннем (протокол квалификации). Типичный график рекуррентной аппроксимации параметров удерживания N-замещенных *п*-толуолсульфонамидов (на примере N-гексильного производного) при разном содержании ацетонитрила в составе элюента [14] приведен на рис. 2. Отклонения от линии регрессии двух точек, отвечающих минимальным концентрациям  $\text{CH}_3\text{CN}$  (55-60 % и 50-55 %), составляют -0.40 и -1.62 мин,



**Рис. 2.** Типичный вид рекуррентной аппроксимации параметров удерживания N-замещенных *p*-толуолсульфонамидов (на примере N-гексильного производного) при разном содержании ацетонитрила в составе элюента [14]. Отклонения от линии регрессии двух точек, отвечающих минимальным концентрациям CH<sub>3</sub>CN (55-60 % и 50-55 %), составляют -0.40 и -1.62 мин, соответственно.

**Fig. 2.** Typical plot of the linear approximation of retention parameters of N-substituted *p*-toluenesulfonamides (on the example of N-hexyl derivative) at different content of acetonitrile in the eluent [14]. The deviations of two points for minimal concentrations of CH<sub>3</sub>CN (55-60 % and 50-55 %) from the regression line are -0.40 and -1.62 min, respectively.

соответственно. Однако при использовании в качестве элюента системы метанол-вода аппроксимация параметров удерживания (3) не привела к столь же однозначным результатам [12]: для трех сульфонамидов были выявлены три неодинаковые зависимости. При R = фенил график (3) линейен, при R<sub>2</sub> = диэтил – очевидно нелинеен, а при R = аллил его

интерпретация затруднительна. Важно отметить, что анализ образцов в системе метанол – вода проводили на другом приборе (режим 1).

**Особенности метанола как органического компонента элюента.** Одной из важных особенностей метанола как органического компонента элюента в ВЭЖХ является значительная вязкость его смесей с водой (максимальные значения при различных температурах соответствуют растворам, содержащим 40-50 % метанола по объему). Так, при 20 °С вязкость воды равна 1.00 спз, метанола – 0.60 спз, а его 50 %-ного водного раствора – 1.83 спз [26-30]. Для ацетонитрила максимумы вязкости его водных растворов приходится на 10-20 %-ные растворы; соответствующие значения при 20 °С равны 1.00, 0.37 и 1.14 спз. Поскольку выявление обратимого образования гидратов предполагает измерение параметров удерживания аналитов в некоторых диапазонах содержаний органических компонентов элюентов (ориентировочно от 80 до 50% объёмн.), то это сопровождается увеличением вязкости при 20 °С приблизительно на 0.58 спз (для системы ацетонитрил-вода только на 0.34 спз, т.е. в 1.7 раза меньше). Для компенсации таких вариаций вязкости давления на входе в колонки значительно возрастают. При наличии неконтролируемых утечек элюента это может приводить к несоответствию его реальных расходов через колонки заданным значениям [6, 15-19]. Такой эффект выражен в наибольшей степени именно при работе с водно-метанольными элюентами. Подобные вариации расходов элюентов в ВЭЖХ во многих случаях неприципиальны (особенно если они воспроизводимы), но в рассматриваемом случае они недопустимы.

Поскольку измерение и сравнение абсолютных расходов элюента через колонку в ВЭЖХ доста-

**Таблица**

Абсолютные времена удерживания (мин) трех N-замещенных *p*-толуолсульфонамидов в идентичных режимах 1 и 2 и их отношения, характеризующие различия в расходах элюентов

**Table**

Net retention times (min) of three N-substituted *p*-toluenesulfonamides in the identical regimes 1 and 2 and their ratios characterizing the eluent flow differences

Содержание CH <sub>3</sub> CN в элюенте, % объёмн., (C)	R = аллил (I)			R <sub>2</sub> = диэтил (II)			R = фенил (III)		
	Режим 1 [12]	Режим 2	Отношение $t_R(2)/t_R(1)$	Режим 1 [12]	Режим 2	Отношение $t_R(1)/t_R(2)$	Режим 1 [12]	Режим 2	Отношение $t_R(1)/t_R(2)$
80	4.38	3.34	0.76	4.05	3.93	0.97	3.83	3.57	0.93
75	4.67	3.62	0.77	5.01	4.53	0.90	4.37	4.06	0.93
70	5.01	4.07	0.81	6.12	5.43	0.89	5.24	4.80	0.92
65	5.37	4.72	0.88	7.86	6.94	0.88	6.68	6.10	0.91
60	6.32	5.71	0.90	10.39	9.31	0.90	9.08	8.19	0.90
55	8.16	7.40	0.91	14.94	13.53	0.91	13.38	12.08	0.90
50	11.12	10.20	0.91	-*	-	-	-	-	-

**Примечание:** Прочерки в таблице соответствуют не определяемым временам удерживания аналитов, явно превышающим 15 минут.

точно нетривиальная задача (обычно проводят только при проверке оборудования), то вместо их сравнения целесообразнее сопоставить абсолютные времена удерживания одних и тех же аналитов, определенные на одной и той же колонке в идентичных условиях, но на разных приборах. В таблице для трех сульфонамидов, рассмотренных ранее в работе [12], представлены значения времен удерживания в режимах 1 и 2, а также их отношения  $t_R(2)/t_R(1)$ , характеризующие различия в расходах элюентов. В целом такие отношения варьируют в диапазоне 0.76 – 0.93, причем при увеличении содержания метанола в элюенте они могут убывать (сульфонамид I), незначительно возрастать (III), или же сохраняться приблизительно на одном и том же уровне (соединение II). Так как выявленные вариации обусловлены приборными факторами, то ожидать воспроизводимости их значений не следует, однако во всех случаях при содержании метанола в элюенте от 50 до 65 % они составляют  $0.90 \pm 0.01$ . При наличии подобных несоответствий заданных и реальных расходов элюента причиной отклонений рекуррентных аппроксимаций параметров удерживания вполне может быть не образование гидратов, а именно приборные факторы.

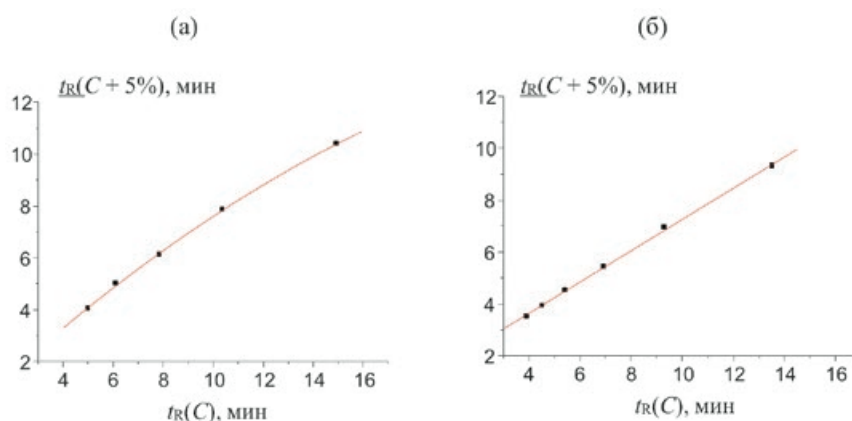
Выявленные несоответствия расходов элюентов заставили предпринять дополнительную проверку предварительных результатов рекуррентной аппроксимации параметров удерживания N-замещенных л-толуолсульфонамидов [12], определенных в режиме 1. Как и в табл. 1, в качестве «референтного» к режиму 1 выбран режим анализа 2 на хроматографе «Shimadzu LC-20 Prominence». Этот хроматограф не проходит периодическую поверку, но подвергается более или менее регулярному техническому обслуживанию. Естественно, что гарантировать «идеальное» соответствие заданных и реальных

расходов элюента для него нельзя, то тот факт, что на этом хроматографе (режим 2) расходы в 1.08-1.32 раза больше, чем в режиме 1, позволяет, по крайней мере, надеяться, что они ближе к заданным.

Результаты проверки этого предположения на примере ранее охарактеризованных сульфонамидов [12] согласуются с предположением о том, что альтернативной причиной нарушения линейности рекуррентных аппроксимаций времен удерживания являются непредсказуемые и трудно учитываемые вариации расхода элюента. На рис. 3 приведены графики рекуррентных зависимостей абсолютных времен удерживания N,N-диэтил-л-толуолсульфонамида (II) (элюент метанол-вода), измеренных в режиме 1 (а) [12] и в режиме 2 (б) [14]. Зависимость (а) визуально нелинейна, параметры линейной регрессии (б) приведены в подписи к рисунку.

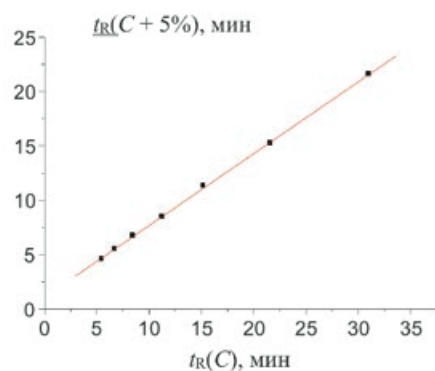
Таким образом, решение аналитических задач, связанных с измерением и интерпретацией малых вариаций параметров удерживания в качестве необходимой стадии, предшествующей формулировке итоговых заключений, должно сопровождаться оценкой соответствия реальных расходов элюента их заданным значениям. Конечно же, для этого можно воспользоваться такой простейшей операцией как волюмометрический контроль расходов элюента в разных режимах (измерение объемов элюента, прошедшего через колонку в единицу времени). Однако для этих целей более информативной представляется процедура, предполагающая анализ некоторого тест-аналита, заведомо не образующего гидратов. Мы выбрали для этих целей хлорбензол, который вполне можно заменить другим соединением.

**Тестирование линейности рекуррентной аппроксимации параметров удерживания в обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием не образующего гидрат соединения (хлорбензол).**



**Рис. 3.** Графики рекуррентных зависимостей абсолютных времен удерживания N,N-диэтил-л-толуолсульфонамида (элюент метанол – вода), измеренных на хроматографах «Стайер-М» (а) (режим 1 [12]) и «Shimadzu LC-20 Prominence» (б) (режим 2 [14]). Зависимость (а) визуально нелинейна; параметры линейной регрессии (3) (б):  $a = 0.603 \pm 0.009$ ,  $b = 1.22 \pm 0.08$ ,  $R = 0.9995 > 0.999$ ,  $S_0 = 0.08$ .

**Fig. 3.** Plots of recurrent dependences of N,N-diethyl-*p*-toluenesulfonamide (eluent methanol – water) net retention times measured with «Staiер-М» (a) (regime 1 [12]) and «Shimadzu LC-20 Prominence» HPLC (б) (regime 2 [14]) instruments. Parameters of the linear regression (3) (б):  $a = 0.603 \pm 0.009$ ,  $b = 1.22 \pm 0.08$ ,  $R = 0.9995 > 0.999$ ,  $S_0 = 0.08$ .



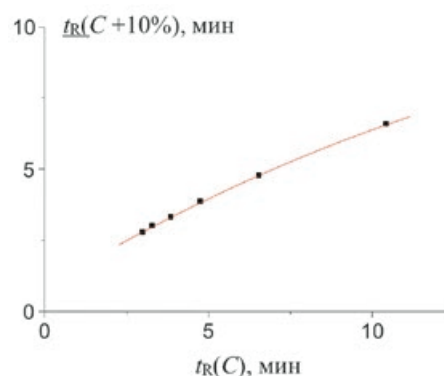
**Рис. 4.** График рекуррентной зависимости абсолютных времен удерживания хлорбензола (элюент метанол-вода), измеренных на хроматографе «Shimadzu LC-20 Prominence» (режим 2). Параметры линейной регрессии (3):  $a = 0.662 \pm 0.005$ ,  $b = 1.05 \pm 0.08$ ,  $R = 0.9998 > 0.999$ ,  $S_0 = 0.11$ .

**Fig. 4.** Plot of the recurrent dependence of the chlorobenzene (eluent methanol-water) net retention times measured with «Shimadzu LC-20 Prominence» HPLC instrument (regime 2). Parameters of linear regression (3):  $a = 0.662 \pm 0.005$ ,  $b = 1.05 \pm 0.08$ ,  $R = 0.9998 > 0.999$ ,  $S_0 = 0.11$ .

В публикациях [12, 13] приведены перечни различных органических соединений, для которых по литературным данным подтверждено или предполагалось образование гидратов. Значительная часть из них отличается нестабильностью: значения констант гидратации  $K_{\text{равн}} \ll 1$  (соотношение 2). Однако даже в подобных случаях в качестве одного из критериев существования гидратов можно полагать приписанные им номера CAS.

Для гидрата хлорбензола номер CAS и, тем более, его свойства, неизвестны, следовательно, даже если он и предполагается, то крайне нестабилен. Упоминание такого гидрата обнаружено только на сайте PubChem. Следовательно, рекуррентная аппроксимация параметров удерживания (3) этого соединения в режимах, различающихся содержанием органического компонента элюента, должна соответствовать коэффициенту корреляции ( $R$ ) не менее 0.999. В противном случае можно говорить об искажениях параметров удерживания, вызванных несоответствием установленных и заданных расходов элюента. На рис. 4 приведен график рекуррентной зависимости абсолютных времен удерживания хлорбензола (элюент метанол-вода), измеренных на хроматографе «Shimadzu LC-20 Prominence» (режим 2). Параметры линейной регрессии (3) приведены в подписи к рисунку.

На основании значения коэффициента корреляции  $R = 0.9998 > 0.999$  можно заключить, что рекуррентная аппроксимация в данном случае не искажена влиянием каких-либо искажающих факторов. Все заключения, относящиеся к образованию гидратов в этом режиме разделения, и, более того, все данные, полученные на этом приборе, можно полагать корректными.



**Рис. 5.** График рекуррентной зависимости абсолютных времен удерживания ацетофенона (элюент ацетонитрил – вода), измеренных на хроматографах «Waters» (режим 4). Признаком ее нелинейности (различима даже визуально) является значение  $R = 0.998 < 0.999$ .

**Fig. 5.** Plot of the recurrent dependence of acetophenone (eluent acetonitrile – water) net retention times measured with «Waters» HPLC instrument (regime 4). The sign of non-linearity (may be observed visually) is the value  $R = 0.998 < 0.999$ .

В заключение обсуждения факторов, искажающих линейность рекуррентных аппроксимаций параметров удерживания, представляется целесообразным рассмотреть еще один пример, а именно представление параметров удерживания ацетофенона (элюент ацетонитрил-вода, содержание ацетонитрила варьировало от 90 до 20 % с «шагом» 10 % объемн., расход элюента 1.0 мл/мин), полученных на хроматографе Waters в режиме 4 [использованы данные одного из авторов (И.З.) 1996 г.]. Для ацетофенона известна константа гидратации, равная  $\sim 6.6 \cdot 10^{-6}$  [13, 31], что исключает присутствие в водных растворах его гидратов в сколько-нибудь заметных концентрациях. Однако график рекуррентной аппроксимации времен удерживания ацетофенона (рис. 5) даже визуально отчетливо нелинеен ( $R = 0.998 < 0.999$ ), что однозначно указывает на несоответствие реальных расходов элюента заданным значениям.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показано, что причиной отклонений рекуррентных зависимостей вида (3) от линейности может быть не только обратимое образование гидратов аналитов, но и влияние иных искажающих факторов, например, сложно контролируемое несоответствие реальных расходов элюента их заданным значениям. Тем не менее, предложен простой способ выявления подобных несоответствий, который предполагает рекуррентную аппроксимацию наборов значений  $t_R = f(C)$  любых соединений, не образующих гидратов в условиях ОФ ВЭЖХ (в нашем случае выбран хлорбензол). Отсутствие влияния искажающих факторов подтверждается значениями коэффициентов корреляции таких зависимостей, превышающими 0.999.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Часть приведенных в статье экспериментальных данных получена с использованием оборудования Ресурсного центра «Методы анализа состава вещества» Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета. Авторы благодарят сотрудников Центра за содействие.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Parts of experimental results presented in the current paper has been obtained using the equipment of the Resource Centre "Methods of analysis of substances' properties" of Scientific Park of St. Petersburg State University. The authors are grateful to the staff of this Center for assistance.

## ЛИТЕРАТУРА

- Lanin S.N., Ledenkova M.Y., Nikitin Y.S. Influence of the concentration of adsorbate and modifier in the mobile phase on retention in HPLC // *J. Chromatogr. A*. 1998. V. 797. P. 3-9.
- Zapala W. Influence of mobile phase composition on retention factors in different HPLC systems with chemically bonded stationary phases // *J. Chromatogr. Sci.* 2003. V. 41. № 6. P. 289-294.
- Сайфутдинов Б.Р., Даванков В.А., Ильин М.М. Термодинамика сорбции производных 1,3,4-оксадиазола и 1,2,4,5-тетразина гиперкроссшитым полистиролом из растворов // *Журн. физич. химии*. 2014. Т. 88, № 3. С. 373-379.
- Термодинамика жидкофазной адсорбции гиперкроссшитым полистиролом с предельной степенью сшивки / Б.Р. Сайфутдинов [и др.] // *Доклады РАН*. 2015. Т. 462, № 6. С. 675-680.
- Савченкова А.С., Буряк А.К., Курбатова С.В. Сорбция производных 4-карбоксихинолина из водных растворов на поверхности пористого графитированного углерода // *Журн. физич. химии*. 2015. Т. 89, № 9. С. 1450-1454.
- Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography* / 3rd Ed. Hoboken: J. Wiley & Sons Inc. 2010. 912 p.
- Canals I., Portal J.A., Roses M., Bosch E. Retention of ionizable compounds on HPLC. Modelling retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of pH and solvent composition with methanol-water mobile phases // *Chromatographia*. 2002. V. 55, № 9/10. P. 565-571.
- Sanli N., Sanli S., Ozkan G., Denizli A. Determination of pKa values of some sulfonamides by LC and LC-PDA methods in acetonitrile-water binary mixtures // *J. Braz. Chem. Soc.* 2010. V. 21, № 10. P. 1952-1960.
- Remko M. Molecular structure, pKa, lipophylicity, solubility, and absorption of biologically active aromatic and heterocyclic sulfonamides // *J. Molec. Struct. THEOCHEM*. 2010. V. 941. P. 34-42.
- Caine B.A., Bronzato M.B., Popelier L.A. Experiment stands corrected: accurate prediction of the aqueous pKa values of sulfonamide drugs using equilibrium bond lengths // *J. Chem. Sci.* 2019. V. 10. P. 6368-6381.
- Зенкевич И.Г., Никитина Д.А. Особенности рекуррентной аппроксимации параметров удерживания полифункциональных соединений в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Журн. физ. химии*. 2021. Т. 95, № 2. С. 285-293.
- Корнилова Т.А., Деруиш А., Зенкевич И.Г. Рекуррентная аппроксимация параметров удерживания как способ подтверждения образования гидратов N-замещенных сульфонамидов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ // *Аналитика и контроль*. 2020. Т. 24, № 4. С. 315-322.
- Зенкевич И.Г., Никитина Д.А., Деруиш А. Особенности образования и хроматографического детектирования гидратов органических соединений // *Журн. аналит. химии*. 2021. Т. 76, № 4. С. 331-341.
- Зенкевич И.Г., Никитина Д.А., Корнилова Т.А. Рекуррентная аппроксимация параметров удерживания N-замещенных п-толуолсульфонамидов в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии для выявления образования их гидратов // *Журн. физ. химии*. 2021. Т. 95, № 00. С. 000-000 (В печати).
- Dong M.W. *HPLC and UHPLC for Practical Scientists*. / 2nd Ed. Hoboken: J. Wiley & Sons Inc. 2019. 416 p.
- Macko T., Berek D. Pressure effects in HPLC: influence of pressure and pressure changes on peak shape, base line, and retention volume in HPLC separations // *J. Liquid Chromatogr. & Rel. Technol.* 2001. V. 24, № 9. P. 1275-1293.
- De Vos J., Broeckhoven K., Eelting S. Advances in ultra-pressure liquid chromatography. Technology and system design // *Anal. Chem.* 2016. V. 88. P. 262-278.
- Broeckhoven K., Shoykhet K., Dong M.W. Modern HPLC pumps: perspectives, principles, and practices // *LCGC North America*. 2019. V. 37, № 6. P. 374-384.
- Podgornik A. Pressure drop in liquid chromatography // *J. Sep. Sci.* 2019. V. 42, № 1. P. 72-88.
- Королев Г.В., Могилевич М.М., Ильин А.А. Ассоциация жидких органических соединений. М., Мир: 2002. 264 с.
- Anderson F.E., Prausnitz J.M. Inhibition of gas hydrates by methanol // *AIChE J.* 1986. V. 32, № 8. P. 1321-1333.
- Zhong Y., Warren G.L., Patel S. Thermodynamic and structural properties of methanol – water solutions using non-additive interaction model // *J. Comput. Chem.* 2008. V. 29, № 7. P. 1142-1152.
- Vatani Z., Amini G., Samadi M., Fuladgar A.M. Prediction of gas hydrate formation in the presence of methanol, ethanol (ethylene, diethylene, and triethylene) glycol thermodynamic inhibitors // *Petrol. Sci. Technol.* 2018. V. 36, № 15. P. 1150-1157.
- Kvamme B., Selvag J., Saedi N., Kuznetsova T. Methanol as hydrate inhibitor and hydrate activator // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2018. V. 20, № 34. P. 21968-21987.
- Zenkevich I.G. Application of Recurrent Relationships in Chromatography // *J. Chemometrics*. 2009. V. 23. P. 179-187.
- Dale W.D.T., Flavelle P.A., Kruus P. Concentration fluctuations in methanol-water mixtures as studied by ultrasonic absorption // *Can J. Chem.* 1976. V. 54. P. 355-366.
- Kubota H., Tsuda S., Murata M. Specific volume and viscosity of methanol-water mixtures under high pressure // *Rev. Phys. Chem. Japan*. 1979. V. 49, № 2. P. 59-69.
- Thompson J.W., Kaiser T.J., Jorgenson J.W. Viscosity measurements of methanol-water and acetonitrile water mixtures at pressures up to 3500 bar using a novel capillary time-of-flight viscometer // *J. Chromatogr. A*. 2006. V. 1134. P. 201-209.
- Xiang H.W., Laesecke A., Huber M.L. A new reference correlation for the viscosity of methanol // *J. Phys. Chem. Ref. Data*. 2006. V. 35, № 4. P. 1597-1620.
- Инвариантное описание экспериментальных изотерм вязкости бинарных жидких систем, применяемых в хроматографии / М.А. Преображенский [и др.] // *Сорбц. хроматогр. процессы*. 2013. Т. 13, № 3. С. 298-306.
- Rawn J.D., Quillette R. *Organic Chemistry*. 2nd Ed. N.Y.: Acad. Press, 2019. 1056 p.



## REFERENCES

- Lanin S.N., Ledenkova M.Y., Nikitin Y.S. Influence of the concentration of adsorbate and modifier in the mobile phase on retention in HPLC. *J. Chromatogr. A*, 1998, vol. 797, pp. 3-9. doi: 10.1016/S0021-9673(97)01206-5.
- Zapala W. Influence of mobile phase composition on retention factors in different HPLC systems with chemically bonded stationary phases. *J. Chromatogr. Sci.*, 2003, vol. 41, no. 6, pp. 289-294. doi: 10.1093/chromsci/41.6.289.
- Saifutdinov B.R., Davankov V.A., Il'in M.M. Thermodynamics of the sorption of 1,3,4-oxadiazole and 1,2,4,5-tetrazine derivatives from solutions on hypercrosslinked polystyrene. *Rus. J. Phys. Chem. A*, 2014, vol. 88, no. 3, pp. 358-364. doi: 10.1134/S0036024414030224.
- Saifutdinov B.R., Davankov V.A., Petukhova G.A., Tsyurupa M.P., Blinnikova Z.K., Il'in M.M. Thermodynamics of liquid-phase adsorption on hypercrosslinked polystyrene networks with ultimate degrees of crosslinking. *Doklady RAN*, 2015, vol. 462, no. 6, pp. 135-139. doi: 10.1134/S0012501615060056.
- Savchenkova A.S., Buryak A.K., Kurbatova S.V. Sorption of 4-carboxyquinoline derivatives from aqueous acetonitrile solutions on the surface of porous graphitized carbon. *Rus. J. Phys. Chem. A*, 2015, vol. 89, no. 9, pp. 1662-1666. doi: 10.1134/S0036024415090277.
- Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography* / 3<sup>rd</sup> Ed. Hoboken: J. Wiley & Sons Inc. 2010, 912 p.
- Canals I., Portal J.A., Roses M., Bosch E. Retention of ionizable compounds on HPLC. Modelling retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of pH and solvent composition with methanol-water mobile phases. *Chromatographia*, 2002, vol. 55, no. 9/10, pp. 565-571. doi: 10.1007/BF02492902.
- Sanli N., Sanli S., Ozkan G., Denizli A. Determination of pKa values of some sulfonamides by LC and LC-PDA methods in acetonitrile-water binary mixtures. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2010, vol. 21, no. 10, pp. 1952-1960. doi: 10.1590/S0103-50532010001000022.
- Remko M. Molecular structure, pKa, lipophilicity, solubility, and absorption of biologically active aromatic and heterocyclic sulfonamides. *J. Molec. Struct. THEOCHEM*, 2010, vol. 944, pp. 34-42. doi: 10.1016/j.theochem.2009.12.017.
- Caine B.A., Bronzato M.B., Popelier L.A. Experiment stands corrected: accurate prediction of the aqueous pKa values of sulfonamide drugs using equilibrium bond lengths. *J. Chem. Sci.*, 2019, vol. 10, no. 25, pp. 6368-6381. doi: 10.1039/c9sc01818b.
- Zenkevich I.G., Nikitina D.A. Features of recurrent approximation of retention parameters of polyfunctional compounds in reversed phase HPLC. *Rus. J. Phys. Chem. A*, 2021, vol. 95, no. 2, pp. 395-402. doi: 10.31857/S004445372102028X.
- Kornilova T.A., Derouiche A., Zenkevich I.G. [Recurrent approximation of retention parameters as confirmation of N-substituted sulfonamides hydrate formation in reversed phase HPLC]. *Analitika i kontrol' [Analytics & control]*, 2020, vol. 24, no. 4, pp. 315-322. doi: 10.15826/analitika.2020.24.4.006. (In Russian).
- Zenkevich I.G., Nikitina D.A., Derouiche A. Features of formation and chromatographic detection of organic compound hydrates. *J. of Analyt. Chem.*, 2021, vol. 76, no. 4, pp. 493-502. doi: 10.1134/S1061934821040146.
- Zenkevich I.G., Nikitina D.A., Kornilova T.A. Recurrent approximation of retention parameters of N-substituted p-toluenesulfonamides in reversed phase HPLC for revealing their hydrates formation. *Rus. J. Phys. Chem. A*, 2021, vol. 95, no. 00, pp. 000-000. (In press).
- Dong M.W. *HPLC and UHPLC for Practical Scientists. I* 2<sup>nd</sup> Ed. Hoboken: J. Wiley & Sons Inc. 2019. 416 p.
- Macko T., Berek D. Pressure effects in HPLC: influence of pressure and pressure changes on peak shape, base line, and retention volume in HPLC separations. *J. Liquid Chromatogr. & Rel. Technol.*, 2001, vol. 24, no. 9, pp. 1275-1293. doi: 10.1081/JLC.100103447.
- De Vos J., Broeckhoven K., Eelting S. Advances in ultra-pressure liquid chromatography. Technology and system design. *Anal. Chem.*, 2016, vol. 88, pp. 262-278. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04381.
- Broeckhoven K., Shoykhet K., Dong M.M.W. Modern HPLC pumps: perspectives, principles, and practices. *LCGC North America*, 2019, vol. 37, no. 6, pp. 374-384.
- Podgornik A. Pressure drop in liquid chromatography. *J. Sep. Sci.*, 2019, vol. 42, no. 1, pp. 72-88. doi: 10.1002/jssc.201800882.
- Korolev G.V., Mogilevich V.V., Il'in F.F. *Assotsiatsiya zhidkikh organicheskikh soedinenii [Association of liquid organic compounds]*, Moscow, "MIR" Publ., 2002, 264 p. (In Russian).
- Anderson F.E., Prausnitz J.M. Inhibition of gas hydrates by methanol. *AIChE J.*, 1986, vol. 32, no. 8, pp. 1321-1333. doi: 10.1002/aic690320810.
- Zhong Y., Warren G.L., Patel S. Thermodynamic and structural properties of methanol – water solutions using non-additive interaction model. *J. Comput. Chem.*, 2008, vol. 29, no. 7, pp. 1142-1152. doi: 10.1002/jcc.20877.
- Vatani Z., Amini G., Samadi M., Fuladgar A.M. Prediction of gas hydrate formation in the presence of methanol, ethanol (ethylene, diethylene, and triethylene) glycol thermodynamic inhibitors. *Petrol. Sci. Technol.*, 2018, vol. 36, no. 15, pp. 1150-1157. doi: 10.1080/10916466.2018.1465960.
- Kvamme B., Selvag J., Saedi N., Kuznetsova T. Methanol as hydrate inhibitor and hydrate activator. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2018, vol. 20, no. 34, pp. 21968-21987. doi: 10.1039/C8CP02447B.
- Zenkevich I.G. Application of Recurrent Relationships in Chromatography. *J. Chemometrics*, 2009, vol. 23, pp. 179-187. doi: 10.1002/cem.1214.
- Dale W.D.T., Flavelle P.A., Kruus P. Concentration fluctuations in methanol-water mixtures as studied by ultrasonic absorption. *Can J. Chem.*, 1976, vol. 54, pp. 355-366. doi: 10.1139/v76-050
- Kubota H., Tsuda S., Murata M. Specific volume and viscosity of methanol-water mixtures under high pressure. *Rev. Phys. Chem. Japan*, 1979, vol. 49, no. 2, pp. 59-69.
- Thompson J.W., Kaiser T.J., Jorgenson J.W. Viscosity measurements of methanol-water and acetonitrile water mixtures at pressures up to 3500 bar using a novel capillary time-of-flight viscometer. *J. Chromatogr. A*, 2006, vol. 1134, pp. 201-209. doi: 10.1016/j.chroma.2006.09.006.
- Xiang H.W., Laesecke A., Huber M.L. A new reference correlation for the viscosity of methanol. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 2006, vol. 35, no. 4, pp. 1597-1620. doi: 10.1063/1.2360605.
- Preobrazhenskii M.A., Rudakov O.B., Krivneva G.G., Barsukova L.G., Khorokhordina E.A., Rudakova L.V. Invariantnoe opisanie eksperimental'nykh isotherm viazkosti binarnykh zhidkikh system, primenyaemykh v khromatografii [Invariant description of experimental viscosity isotherms of binary liquid systems used in chromatography]. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy [Sorption & Chromatogr. Processes]*, 2013, vol. 13, no. 3, pp. 298-306. (In Russian).
- Rawn J.D., Quellerie R. *Organic Chemistry*. 2<sup>nd</sup> Ed. N.Y.: Acad. Press, 2019. 1056 p.