

УДК 543.544

МЕТОД ИСПОЛЬЗОВАНИЯ LOGP В ВЭЖХ. I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

В. И. Дейнека
г. Белгород

В поисках взаимосвязи между удерживанием вещества в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ или ТСХ (а также его биологической активностью) и его строением (QSRR и QSAR соответственно [1]) большое значение уделяется корреляции между временем удерживания вещества и логарифма коэффициента распределения этого вещества ($\log P$) между октанолом и водой. Для полуэмпирического расчета этого параметра предложено несколько программных продуктов: CLogP [2], SciLogP [3], KOWWIN [4], XLogP [5], ACD/LogP и ряд других. При этом корреляцию между параметрами ищут в простейшем случае в виде линейной зависимости [6, 7]:

$$\lg k = a + b \cdot \text{Log}P \quad (1)$$

Однако надежность такого метода невысока, что не удивительно. Специалистам хорошо известно, что для ряда веществ наблюдается инверсия порядка элюирования при изменении состава подвижной фазы (даже без изменения состояния ионизации), которая не может быть предсказана по уравнению 1 поскольку $\text{Log}P = \text{const}$. Стандартизация условий, предложенная Калижаном [7] в виде аппроксимации времен удерживания на чисто водные подвижные фазы, кажется частично оправданной. Но возникают, например, проблемы в надежности аппроксимации, поскольку данные для водно-метанольных и водно-ацетонитрильных элюентов различаются [7] существенно. Метод быстрого градиента [8] с использованием в качестве стандартов двух веществ с известным $\text{Log}P$ является по сути лишь стандартизацией без использования экстраполяции.

Данная работа посвящена определению роли и метода применения экспериментальных и расчетных значений $\text{Log}P$ в высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием предложенного ранее метода относительного анализа удерживания [9-12].

Коэффициент распределения вещества A в системе *октанол – вода* является следствием суммы гидрофобно-гидрофильных взаимодействий A в обеих фазах (при данной температуре). Очевидно, что при замене октанола на, например, гептанол величина $\text{Log}P$ изменится. В ВЭЖХ каждый параметр удерживания вещества A , соответствующий конкретному составу элюента, также является следствием суммы гидрофобно-гидрофильных взаимодействий, но с поправкой на фазовое соотношение.

В предложенном ранее методе [10-12] по осям координат откладывают значения логарифмов факторов удерживания двух веществ A' и A . Удерживание определяют в изократическом режиме при различных составах элюента, вещество A принимается за вещество сравнения. Как было показано в работах [10-13], экспериментальные данные достаточно надежно описываются линейным уравнением в широком диапазоне составов подвижных фаз:

$$\lg k(A') = q + p \cdot \lg k(A) \quad (2)$$

Для распределения вещества А между подвижной (п.ф.) и неподвижной (н.ф.) фазами равновесие соответствует равенству химических потенциалов этого вещества в обеих фазах:

$$\mu_{пф}(A) = \mu_{нф}(A) \quad (3)$$

Отсюда с учетом линейности изотермы Генри (при малых нагрузках обеих фаз) при каждом составе подвижной фазы (и соответствующему этому составу состоянию неподвижной фазы) концентрационная константа распределения выражается уравнением:

$$RT \ln K(A) \cong RT[\ln X_{пф}(A) - \ln X_{нф}(A)] = \mu_{пф}^o(A) - \mu_{нф}^o(A) = \Delta\mu_p^o(A) \quad (4)$$

где $\Delta\mu_p^o(A)$ – разность стандартных химических потенциалов вещества А в обеих фазах (со включением коэффициентов активности); X – мольная доля вещества А в соответствующих фазах (при очень малых мольных долях вещества А в обеих фазах отношение мольных долей равно отношению молярных концентраций).

Для вещества А' коэффициент распределения выражается аналогично:

$$RT \ln K(A') = \Delta\mu_p^o(A') \quad (5)$$

Пусть вещество А' является продуктом добавления некоторого фрагмента R к реперному веществу А. Тогда при отсутствии специфических внутримолекулярных взаимодействий в молекуле А' при фрагментарной аддитивности свободных энергий можно записать уравнение:

$$\Delta\mu_p^o(A') = \Delta\mu_p^o(A) + \Delta\mu_p^o(R) \quad (6)$$

Распространяя широко используемую идею линейности свободных энергий на энергетические изменения при введении в молекулу заместителей, можно ожидать линейную зависимость между двумя членами в правой части уравнения (6) при всех составах подвижной фазы:

$$\Delta\mu_p^o(R) = a + b\Delta\mu_p^o(A) \quad (7)$$

Такое предположение подтверждается линейной зависимостью инкрементов от фактора удерживания реперного соединения, установленное для многих соединений [6, 10 – 12].

Исключая изменения химических потенциалов из уравнений 5-7, получаем в конечном итоге:

$$RT \ln K(A') = a + (1 + b)RT \ln K(A). \quad (8)$$

После добавления фазового отношения (φ) получаем:

$$\ln k(A') = \frac{a}{RT} + (1 + b) \ln k(A) - b \ln \varphi. \quad (8)$$

Уравнение 8 эквивалентно уравнению 2 при постоянстве фазового соотношения в рассматриваемом диапазоне составов элюентов.

Линейная зависимость между коэффициентами емкости позволяет выполнять аппроксимацию далеко за пределы использованного диапазона. Следовательно, полученная линия является совокупностью точек на плоскости с различным балансом гидрофобно-гидрофильных взаимодействий, лишь смещенная по обеим осям на логарифмы фазового соотношения. Тогда и точка, соответствующая значениям LogP

для веществ А' и А, также может быть точкой этой же регрессионной прямой (но без указанного смещения).

На рис. 1 (А и Б) представлены результаты сопоставления экспериментальных данных (полученных при выполнении работы [9]) по удерживанию (в виде $\lg k$) триглицеридов: дилинолеата-олеата по отношению к трилинолеату и расчетных значений $\log P$ (экспериментальные данные по этим соединениям отсутствуют). При поразительном несоответствии абсолютных значений $\text{Log}P$, рассчитанных по различным моделям, близость соответствующих точек к линии тренда, построенной по хроматографическим данным, говорит о том, что тем не менее эти данные не лишены смысла. Очевидно, что при разработке соответствующих моделей использовались «тренировочные» ряды веществ в условиях с различным балансом гидрофобно-гидрофильных взаимодействий.

Линия регрессии по данным ВЭЖХ проходит выше всех точек, построенных по расчетным значениям $\text{Log}P$, но это не удивительно. И дело не только в том, что хроматографические данные на рис. 1 приведены без учета фазового соотношения (или его изменения при варьировании состава подвижной фазы). При введении поправок на фазовое соотношение вплоть до 2 в логарифмических единицах (что соответствует диапазону фазовых соотношений от 1 до 0,01) линия регрессии смещается по оси Y только на 0,01 (пунктирная линия на рис. 1 А и Б).

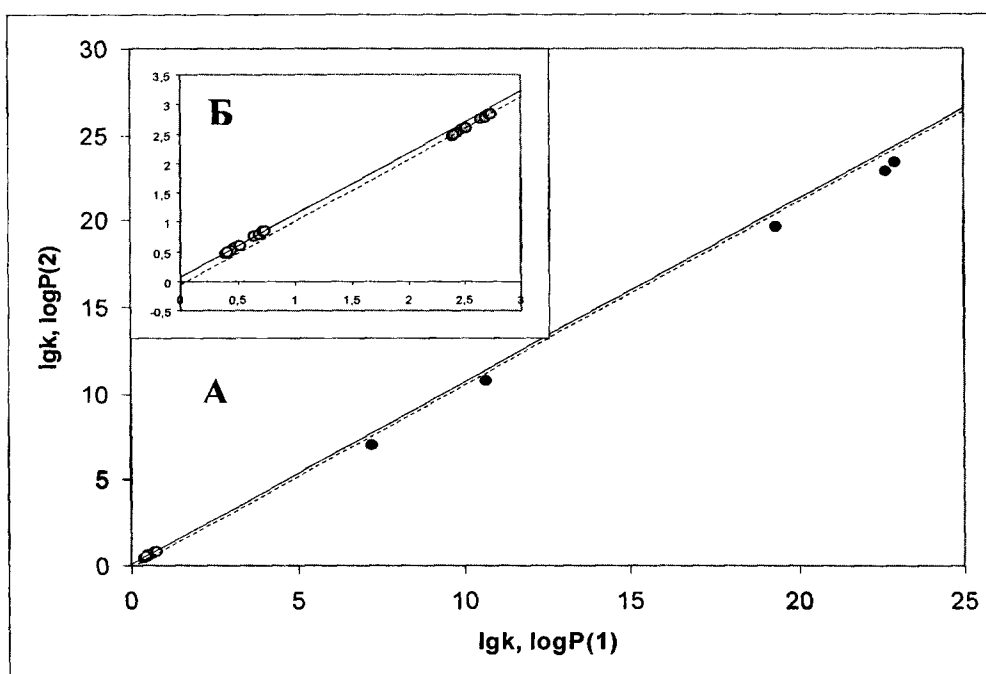


Рис. 1. Сопоставление данных по удерживанию в условиях ВЭЖХ и расчетных значений $\log P$
 1 – Л₃; 2 – Л₂О; (○) – данные ВЭЖХ исследований [10]; (⊙) – те же данные с поправкой
 на фазовое соотношение 0,01; (●) – расчетные данные по программам: 1 – IA_LogP; 2 – ALogP;
 3 – XLogP; 4 – KOWWIN; 5 – CLogP. Б – фрагмент графика А

Объяснение указанного несоответствия кроется в высокой чувствительности хроматографических данных по отношению к структурным изменениям исследуемых веществ. Так, известно, что при замене олеиновой (9-цис-С18:1) кислоты на петрозелиновую (6-цис-С18:1), т.е. при изменении положения двойной связи в молекуле смещением на три метиленовые группы в сторону глицерольного фрагмента, удерживание соответствующих производных заметно увеличивается [13]. Это соответствует увеличению угла наклона регрессионной прямой. Соответственно, перемещение двойной связи в противоположном направлении должно привести к уменьшению угла наклона, т.е. расчетные значения $\text{Log}P$, вероятно, получены без поправок на положение двойной

связи в углеродной цепи. Поэтому предлагаемый метод сопоставления способен привести к разработке моделей, более точно учитывающих структурные тонкости строения веществ тренировочного ряда или их фрагментов.

Отметим, что при использовании надежных расчетных данных LogP оптимизация разделения группы веществ может быть существенно упрощена. Параметров удерживания веществ в произвольном элюенте и точек, построенных по расчетным значениям LogP , достаточно (вследствие прямолинейной зависимости) для построения полной карты относительного удерживания всех компонентов сложной смеси.

По другому способу использования предлагаемого пространства относительного удерживания следует учесть, что при идеальной обращенно-фазовой хроматографии относительное удерживание пары веществ не должно зависеть от типа используемой обращенной фазы (до тех пор, пока не изменяется доминирующий механизм удерживания). Это подтверждается пересчетом данных, приведенных в работе [14]. Например, для зависимости относительного удерживания дифенила относительно бензола только данные для C18-фазы лежат несколько в стороне от прямой линии регрессии для остальных данных с включением в базис значений LogP (рис. 2). Для пары *пирен* – *хризен* прямолинейная зависимость почти идеальна для всех приведенных в цитируемой работе данных.

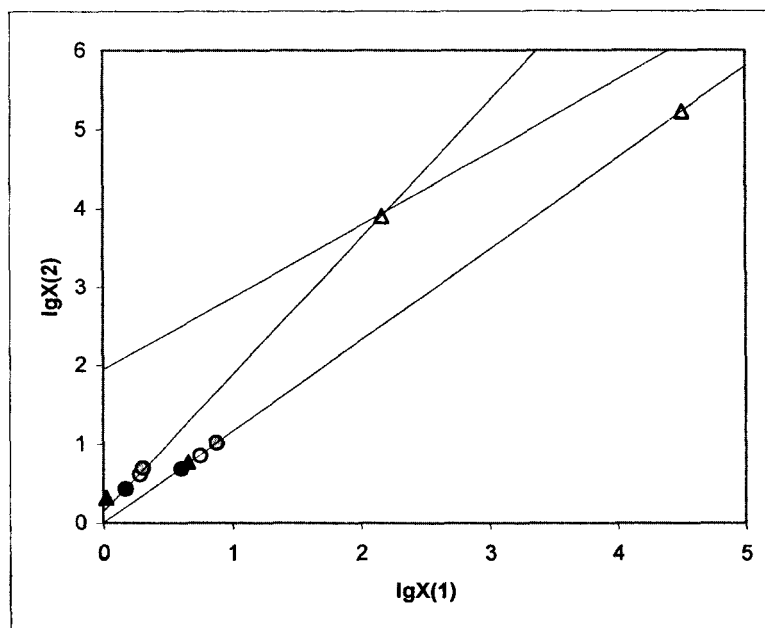


Рис.2. Сопоставление данных по удерживанию в условиях ВЭЖХ [14] и величин logP
 X_1 – k (бензол) и R (бензол) – 1, k (пирен) и R (пирен) – 2; X_2 – k (дифенил) и R (дифенил) – 1, k (хризен) и R (хризен) – 2. Стационарные фазы: (○) – C2; (●) – CР; (▲) – C8; (△) – C18; (○) – logP

Таким образом, регрессионная зависимость относительного удерживания одного вещества по другому имеет фундаментальное значение во взаимосвязи структуры вещества и его удерживания, что подтверждается применимостью нехроматографических расчетных значений LogP .

Но, строго говоря, абсолютная применимость экспериментальных значений LogP к удерживанию в ВЭЖХ неочевидна. Для удерживания в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ предложены как механизмы распределения вещества между подвижной и неподвижной фазой, так и гидрофобное вытеснение вещества на поверхность сорбента [7]. При реализации механизма гидрофобного вытеснения также возможно соответствие экспериментальных результатов прямолинейной зависимости вследствие относительного характера используемых координат. Но такой компенсации может и не быть при рассмотрении пары веществ, удерживающихся по различным доминирующим меха-

низмам удерживания. Возможно, некоторое различие механизмов удерживания объясняет выпадение точки, соответствующей С18-фазе на рис. 2. Отметим, что это находится в соответствии с выводами о необходимости использования элюентов с возможно меньшим содержанием органического модификатора [8]. А с учетом известного факта перестройки неподвижной фазы (phase collapse [15]) при высоком содержании воды в подвижной фазе можно предположить, что условия для реализации механизма гидрофобного вытеснения предпочтительны для сопоставления параметров удерживания с LogP. Действительно, точки на рис. 2, полученные с использованием С2, С8 и фенильной фаз (для которых гидрофобное выталкивание представляется как наиболее вероятный механизм удерживания) и величинами LogP, явно лучше описываются прямолинейной зависимостью.

Причина хорошо известной веерообразной зависимости удерживания гомологов от состава элюента [7] достаточно проста [11]: увеличение неполярности элюента в случае идеальной обращенно-фазовой хроматографии должно в конце концов привести к ситуации, при которой стационарная и подвижная фазы станут неразличимыми (т.е. исчезнет и граница раздела фаз). Соответственно, удерживание всех веществ окажется одинаковым. Применительно к рассматриваемому методу это обозначает, что на графике относительного анализа должна существовать точка, общая для всех веществ – точка пересечения каждой линии с (пунктирной, рис. 3) линией $y=x$.

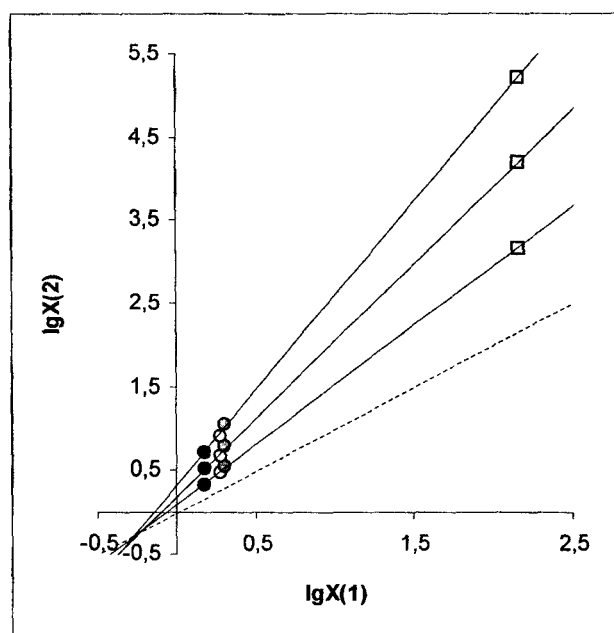


Рис.3. Сопоставление данных по удерживанию в условиях ВЭЖХ [14] и величин $\log P$
 X_1 – k (бензол) и P (бензол); X_2 – k (нафталин) и P (нафталин) – 1, k (антрацен) и P (антрацен) – 2, k (нафтацен) и P (нафтацен) – 2; 4 – k (бензол) и P (бензол). Стационарные фазы: (O) – C2; (●) – CP; (●) – C8; (□) – $\log P$

Даже при неидеальной обращенно-фазовой хроматографии при одинаковой гомологической разности строения веществ $A \rightarrow A'$; $A' \rightarrow A''$, ... справедливо соотношение (7), тогда для n -го члена гомологического ряда:

$$\ln k(A^n) = \frac{na}{RT} + (1 + nb) \ln k(A) - nb \ln \varphi, \quad (8)$$

что является необходимым и достаточным условием пересечения всех прямых в одной точке. Если структура веществ в ряду изменяется добавлением $-\text{CH}_2$ -фрагмента, то такой ряд принято называть гомологическим. Назовем «псевдогомологическим» ряд с последовательным добавлением произвольных одинаковых групп.

На рис. 3 представлен пересчет результатов работы [14] для выборки «псевдогомологов» (с сохранением максимально возможной симметрии – D_{2h}): бензол – нафталин –

антрацен – нафтацен. Тенденция к пересечению всех линий трендов в одной точке очевидна. Кстати, представленные рассуждения являются обоснованием возможности прямой корреляции между логарифмами факторов емкости группы веществ и их LogP (уравнение 1), эмпирически используемой в практике ВЭЖХ, как пропорциональность отрезков, отсекаемых исходящими из одной точки лучами на двух параллельных прямых (одна – по данным $\lg k$ при данном составе элюента, а другая – по данным LogP).

Таким образом, в данной работе показаны возможности применения метода анализа относительного удерживания веществ в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ для уточнения (или определения) расчетных значений LogP.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bate-Smith, E. C. Chromatographic behaviour and chemical structure / E. C. Bate-Smith, R. G. Westall // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1950. – Vol. 4. – P. 427-440.
2. Chou, J. T. Computer-assisted computation of partition coefficient from molecular structures using fragment constants / J. T. Chou, P. C. Jurs // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* – 1979. – Vol. 19. – P. 172-178.
3. Votano, J. R. Use of E-State Atom Indices and Neural Network Algorithms in SciLogP Ultra / J. R. Votano // *Lipophylicity in Drug Disposition : The 2nd LogP Symposium, Lausanne, 5-9 March 2000.* – Lausanne, 2000.
4. Meylan, W. M. Estimated using Syracuse Research Corporation / W. M. Meylan, P. H. Howard // *J. Pharm. Sci.* – 1995. – Vol. 84. – P. 83-92.
5. Wang, R. A New Atom-Additive Method for Calculating Partition Coefficients / R. Wang, Y. Fu, L. Lai // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* – 1997. – Vol. 37. – P. 615-621.
6. Шатц, В.Д. Высокоэффективная жидкостная хроматография / В. Д. Шатц, О. В. Сахартова. – Рига : Зинатне, 1988. – 390 с.
7. 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.
8. 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.
9. Инкрементный подход при определении состава триглицеридов / В. И. Дейнека, В. М. Староверов, Г. М. Фофанов, Л. Н. Балятинская // *Химико-фармацевтический журнал.* – 2002. – Т. 36, № 7. – С. 44-47.
10. 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.
11. Дейнека, В. И. Относительный анализ хроматографического удерживания гликозидов цианидина / В. И. Дейнека, А. М. Григорьев // *Журнал физической химии.* – 2004. – Т. 78, № 5. – С. 923.
12. Инкрементный подход в анализе антоцианов методом ВЭЖХ / В. И. Дейнека, А. М. Григорьев, В. М. Староверов, О. Н. Борзенко // *Химия природных соединений.* – 2003. – № 2. – С. 137.
13. Дейнека, В. И. Триглицеридный состав масел семян некоторых растений / В. И. Дейнека // *Химия природных соединений.* – 2003. – № 6. – С. 433.
14. Jinno, K. The Use of Fibrous Polymer Materials in Capillary Electrochromatography (Review) / K. Jinno, Y. Saito // *Chromatography.* – 2001. – Vol. 22. – P. 151-158.
15. Przybyciel, M. Column Watch: Phase Collapse in Reversed-Phase Liquid Chromatography / M. Przybyciel, R. E. Majors // *LC•GC Europe.* – 2002. – Vol. 20, № 7. – P. 652.