

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE

ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN CHIMIE
CATEDRA DE CHIMIE ANALITICĂ

**Mecanismul de retenție în cromatografia de lichide în
fază inversă cu eluție izocratică. Modelare și parametri
extraanalitici**

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător științific
Prof. Dr. Victor David

Doctorand
Toma Galaon

Cuprins

(numerotarea paginilor este cea corespunzătoare tezei de doctorat)

1. Partea teoretică.....	6
1.1. Mecanisme de retenție în cromatografia de lichide în fază inversă.....	6
1.1.1. Mecanismul simplu.....	6
1.1.2. Mecanismul în fază inversă bazat pe formare de perechi ionice.....	19
1.1.3. Mecanismul mixt fază normală - fază inversă.....	25
1.2. Modele de retenție în RP-LC.....	26
1.2.1. Introducere.....	26
1.2.2. Modelul partiției.....	26
1.2.3. Modelul adsorbției.....	28
1.2.4. Modelul solvofobic.....	30
1.2.5. Modelul puterii elutropice liniare.....	31
1.2.6. Modelul bazat pe parametri de solubilitate.....	32
1.2.7. Modelul ET-30.....	32
1.2.8. Modele de retenție bazate pe parametri de polaritate.....	33
1.2.9. Modelarea retenției în funcție de pH.....	34
1.2.10. Modelarea termodinamică a retenției în RP-LC.....	39
1.3. Parametri de hidrofobicitate.....	43
1.3.1. Introducere.....	43
1.3.2. Alți descriptori moleculari.....	44
1.3.3. Coeficientul de partiție apa – octanol ($\log K_{ow}$).....	47
1.3.4. Coeficientul de distribuție apa – octanol ($\log D_{ow}$).....	48
1.3.5. Determinarea indicelui de hidrofobicitate din procese de extracție.....	50
1.3.6. Metode teoretice de calcul a indicelui de hidrofobicitate.....	51
1.3.7. Determinarea indicelui de hidrofobicitate prin RP-LC.....	53
2. Partea experimentală.....	55
2.1. Prezentarea cadrului general de cercetare.....	55
2.2. Influența hidrofobicității analiților asupra retenției cromatografice. Determinarea $\log K_{ow}$ prin RP-LC.....	56
2.2.1. Problematika studiului.....	56
2.2.2. Modelul teoretic aplicat.....	57
2.2.3. Condiții experimentale.....	60
2.2.4. Rezultate și discuții.....	62
2.2.5. Influența naturii fazei staționare asupra determinării $\log K_{ow}$ prin RP-LC.....	85
2.2.6. Concluzii.....	91
2.3. Influența pH-ului componentei apoase a fazei mobile și a caracterului acido-bazic al analiților asupra mecanismului de retenție în RP-LC.....	95
2.3.1. Problematika studiului.....	95

2.3.2. Modelul teoretic aplicat.....	97
2.3.3. Condiții experimentale.....	99
2.3.4. Rezultate și discuții.....	99
2.3.5. Concluzii.....	127
2.4. Influența hidrofobității modificadorului organic asupra retenției în RP-LC. Modelul adsorbției competiționale analit – modificador organic hidrofob.....	129
2.4.1. Problematika studiului.....	129
2.4.2. Condiții experimentale.....	131
2.4.3. Rezultate și discuții.....	134
2.4.3.1 Caracterul hidrofob al analiților și al modifcatorilor organici.....	134
2.4.3.2 Influența componentei organice a fazei mobile asupra retenției.....	135
2.4.3.3 Estimarea hidrofobității compușilor model prin extrapolarea datelor de retenție.....	143
2.4.3.4. Dependența dintre retenția analiților și hidrofobitatea modifcatorilor organici hidrofobi.....	148
2.4.3.5. Modelul adsorbției competiționale analit – modificador organic hidrofob.....	151
2.4.4. Concluzii.....	155
2.5. Mecanisme mixte de retenție în cromatografia de lichide. Retenția a două biguanidine în cromatografia de lichide pe o fază staționară de tip cianopropil.....	157
2.5.1. Problematika studiului.....	157
2.5.2. Condiții experimentale.....	158
2.5.3. Rezultate și discuții.....	159
2.5.4. Concluzii.....	167
2.6. Termodinamica partiției în cromatografia de lichide în fază inversă.....	169
2.6.1. Problematika studiului.....	169
2.6.2. Modelul teoretic aplicat.....	171
2.6.3. Condiții experimentale.....	172
2.6.4. Date experimentale.....	174
2.6.5. Rezultate și discuții.....	192
2.6.6. Concluzii.....	201
2.7. Variația atipică a retenției cu temperatura în RP-LC. Modificarea structurii Drotaverinei cu temperatura coloanei cromatografice și pH-ul fazei mobile.....	203
2.7.1. Problematika studiului.....	203
2.7.2. Condiții experimentale.....	205
2.7.3. Rezultate și discuții.....	207
2.7.4. Concluzii.....	217
Concluzii finale.....	219
Bibliografie.....	221

2.2. Influența hidrofobității analiților asupra retenției cromatografice. Determinarea log K_{ow} prin RP-LC

2.2.1. Problematika studiului

În cromatografia de lichide în fază inversă, faza staționară este considerată hidrofobă, iar faza mobilă (conținând de obicei amestecuri de apă cu solvenți organici relativ polari ca de exemplu acetonitril, metanol sau etanol) este considerată ca fiind polară. Natura celor două faze presupune, astfel, ca analiții ce sunt separați prin această tehnică cromatografică să fie hidrofobi sau, cel puțin, să aibă o polaritate mai mică decât aceea a fazei mobile. În cromatografia de lichide în fază inversă, mecanismul de retenție principal este reprezentat de interacția hidrofobă dintre molecula analitului și faza staționară (bazată pe forțe de tip van der Waals). Astfel, cu cât hidrofobitatea analitului este mai mare cu atât interacția cu faza staționară va fi mai puternică și retenția cromatografică a acestuia va fi mai mare.

Pentru stabilirea corelației hidrofobitate – retenție cromatografică s-a trasat dependența factorului de capacitate funcție de concentrația de modificador organic în faza mobilă. Ca modificador organic s-a folosit atât acetonitril, cât și metanol, pentru a vedea dacă natura modificadorului organic influențează rezultatele obținute la estimarea hidrofobității analiților folosind cromatografia de lichide în fază inversă. Așadar cei șapte compuși, injectați împreună sau separat, au fost monitorizați în condițiile unor faze mobile diferite în ceea ce privește raportul solvent apos / modificador organic. S-au considerat mai multe compoziții ale fazei mobile în funcție de hidrofobitatea moleculelor considerate pentru care s-a măsurat experimental retenția fiecărui compus injectat. Ulterior, după stabilirea dependențelor funcționale (liniare sau polinomiale) dintre retenție și procentul de modificador organic din faza mobilă, prin extrapolare în regresiiile obținute, s-a putut calcula factorul de capacitate pentru o fază mobilă exclusiv apoasă ($\log k'_w$); acest parametru a fost ulterior corelat cu $\log K_{ow}$ – constanta de partiție apă : octanol. Pentru verificarea acurateții modelului s-a comparat valoarea $\log K_{ow}$ obținută din datele experimentale cu valoarea teoretică a acestui parametru determinată prin metoda fragmentelor. Pentru cele două seturi de date s-a încercat obținerea unei corelații care să permită fie predicția retenției în RP-LC a unui compus ce face parte din aceeași clasă structurală pe baza cunoașterii valorii teoretice a $\log K_{ow}$, fie estimarea indicelui de hidrofobitate al acelu compus pe baza retenției în RP-LC.

2.2.2. Modelul teoretic aplicat

Hidrofobitatea prezintă un rol fundamental în RP-LC. Deși nu s-au stabilit încă cu certitudine detaliile mecanistice care să decrie în întregime retenția compușilor separați prin această tehnică cromatografică, un lucru este cert: retenția diferențiată a acestora de-a lungul fazei staționare se face pe baza hidrofobității lor. Acest lucru este ușor de înțeles, deoarece în RP-LC faza staționară este mai puțin polară (mai hidrofobă) decât faza mobilă. Relația între constanta de partiție a unei molecule între faza staționară și faza mobilă și retenția sa, este exprimată cantitativ de expresia:

$$K_{RP-LC} = \frac{k'}{\Phi} = k' \cdot \frac{V_{fm}}{V_{fs}} \quad (2.2.1)$$

unde K_{RP-LC} este constanta de partiție a unei molecule între faza mobilă și faza staționară, k' este factorul de capacitate, iar Φ este o constantă constructivă a coloanei cromatografice dată de raportul volumelor de fază staționară și fază mobilă (V_{fs}/V_{fm}).

Modelul partiției consideră că faza staționară – reprezentată de lanțurile hidrocarbonate cu

proprietăți hidrofobe – poate fi considerată ca un volum de lichid ce acoperă suportul inert de silicagel. Acest lichid se comportă ca un strat nemiscibil cu faza mobilă și în consecință întregul proces cromatografic poate fi asemănat cu un proces de partiție lichid-lichid. Teoria partiției presupune de asemenea că doar moleculele de solut pot penetra acest strat. Astfel partiția moleculelor de solut se face între faza mobilă și locurile vacante dintre lanțurile hidrocarbonate ale fazei staționare, numite regiunea de interfață [20]. Modelul, propus de Dill, ridică câteva întrebări în legătură cu presupunerea că doar moleculele de solut (care sunt în mod uzual mai mari decât cele de apă sau modificator organic) pot penetra stratul lichid de fază staționară, în timp ce apa sau modificatorul organic sunt excluse. Echilibrul care descrie procesul de partiție lichid-lichid al solutului între cele două faze poate fi reprezentat prin relația:

$$A_{fm} \overset{\leftarrow}{\rightarrow} A_{fs} \quad (2.2.2)$$

acesta este caracterizat de o constantă de echilibru, denumită și constanta de repartiție care este egală cu raportul concentrațiilor solutului la echilibru în faza staționară și respectiv în faza mobilă (relația 2.2.3).

$$K_{RP-LC} = \frac{[A]_{fs}}{[A]_{fm}} \quad (2.2.3)$$

Una dintre cele mai importante metode de estimare a hidrofobității compușilor organici este reprezentată de distribuția în sistemul apă : octanol, care este caracterizată de constanta de distribuție apă : octanol (K_{ow}), așa-numitul indice de hidrofobitate:

$$K_{ow} = \frac{[A]_{1-oc\ tan\ ol}}{[A]_{apa}} \quad (2.2.4)$$

Comparând relațiile (2.2.3) și (2.2.4) se poate observa că cele două ecuații cuantifică hidrofobitatea unui analit, A, în două sisteme: sistemul RP-LC și respectiv sistemul apă – octanol. Având în vedere similitudinile dintre cele două sisteme (faza staționară hidrofobă din RP-LC fiind asociată 1-octanolului și faza mobilă polară fiind asociată cu apa), este plauzibilă afirmația că cele două sisteme pot fi corelate. Altfel spus, pe baza coeficientului de partiție apă – octanol ($\log K_{ow}$), se poate estima retenția analiților într-un anumit sistem cromatografic ($\log K_{RP-LC}$) și viceversa.

Pentru a se apropia de sistemul apă : octanol din punct de vedere al hidrofobităților relative, un sistem RP-LC ar trebui să aibă o fază mobilă cât mai puțin hidrofobă, adică fără modificator organic; de altfel retenția cromatografică într-o fază mobilă 100% apoasă este considerată a fi modalitatea standard de a face măsurători de hidrofobitate, deoarece singurul efect solvofobic prezent este cel hidrofobic. În acest caz vorbim de factorul de capacitate corespunzător unei faze mobile alcătuită din 100% apă (k'_w pentru $C_m \rightarrow 0$, unde C_m reprezintă concentrația procentuală de modificator organic în faza mobilă) căreia îi corespunde o constantă de partiție ($K_{w, RP-LC}$). Această constantă poate fi corelată cu constanta de distribuție apă : octanol:

$$K_{ow} \approx K_{RP-LC}^{C_m \rightarrow 0} \quad (2.2.5)$$

Considerând argumentele prezentate mai sus, în acest studiu, se va considera constanta de distribuție între faza mobilă (100% componentă apoasă) și faza staționară (lanțurile octadecil) ca fiind un indice de hidrofobitate determinat din date experimentale cromatografice pentru analiții studiați. Comparația acestor valori cu indicele de hidrofobitate teoretic va duce la confirmarea sau infirmarea modelului teoretic expus anterior.

În RP-LC dependența factorului de capacitate de concentrația de modificator organic din faza mobilă (C_m) este cel mai bine descrisă de ecuațiile [44, 92-95]:

$$\log k' = a \cdot C_m + b \quad (2.2.6)$$

$$\log k' = a' \cdot C_m^2 + b' \cdot C_m + c' \quad (2.2.7)$$

unde a, b, a', b' și c' sunt parametrii regresii celor două dependențe.

2.2.4. Rezultate și discuții

Factorul de capacitate k' a fost calculat după formula $k' = (t_r - t_0)/t_0$, unde t_r este timpul de retenție absolut, iar t_0 timpul mort al coloanei. Pentru coloana Purospher folosită în cadrul studiului la debitul de 1,0 mL/min, timpul mort determinat experimental a fost de 0,85 minute. Pe baza datelor experimentale obținute (t_r , k' , $\log k'$) s-au trasat dependențele $\log k'$ funcție de conținutul procentual de modificator organic (acetonitril sau metanol) din faza mobilă pentru fiecare din compușii studiați. Valorile coeficienților de corelație obținuți atât pentru regresii liniare, cât și polinomiale, sunt în toate cazurile (pentru toți cei șapte compuși model) mai mari de 0,99 lucru care confirmă validitatea ecuațiilor matematice alese pentru descrierea retenției în funcție de compoziția fazei mobile. Pe baza modelului teoretic expus anterior a fost calculată – prin extrapolare la 0% modificator organic – constanta de distribuție între faza mobilă (alcătuită 100% din componenta apoasă) și faza staționară de tip octadecil silicagel ($\log K_{w,RP-LC}$) pentru cei șapte compuși model: fenol, acid salicilic, metoprolol impuritate B, betaxolol impuritate D, fenofibrat impuritate A, amiodaronă impuritate D și amiodaronă impuritate E. **Tabelul 2.2.2** prezintă valorile obținute pentru acest parametru prin extrapolare atât în dependențele liniare cât și în cele polinomiale (determinate anterior) folosind cei doi modificatori organici, acetonitrilul și metanolul.

Valorile teoretice ale $\log K_{ow}$ au fost calculate cu metoda fragmentometrică cu ajutorul software-ului EPI Suite – KOWWIN, versiunea 1.67, al Environmental Protection Agency, SUA [97]. Raportul de calcul al $\log K_{ow}$ teoretic pentru cei șapte compuși model este dat în figurile următoare. De menționat că pentru fenol și acid salicilic, au fost găsite în baza de date a softului și valorile experimentale ale indicelui de hidrofobicitate determinat prin metoda clasică de partiție între apă și octanol.

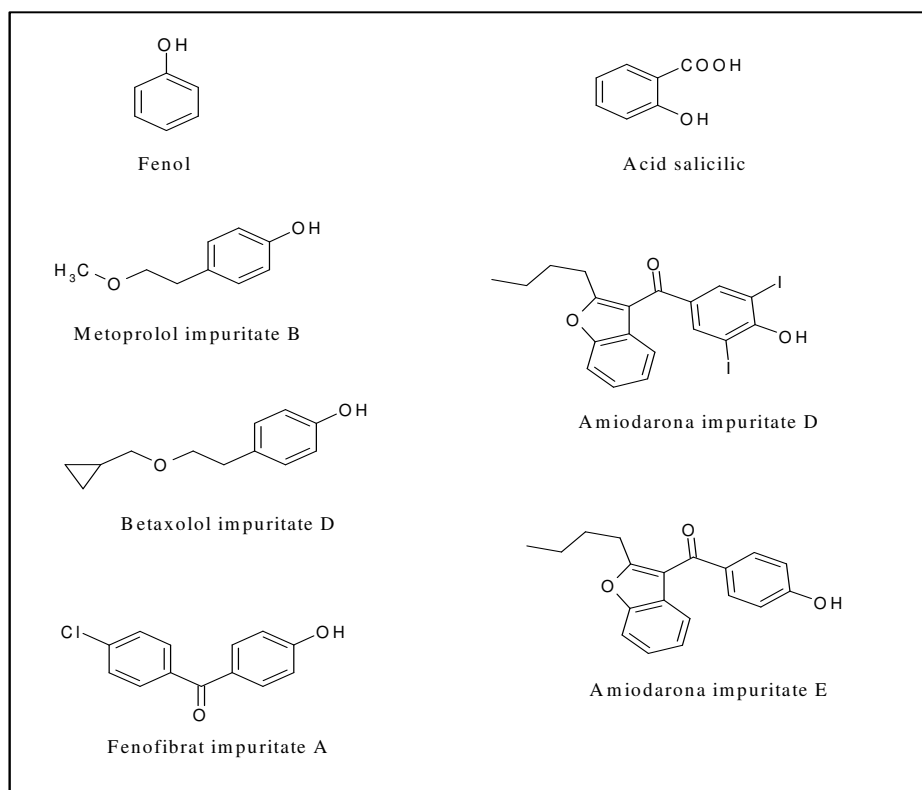


Fig 2.2.1. Structurile chimice corespunzătoare celor șapte compuși model.

Pe baza datelor obținute în **Tabelul 2.2.2**, s-au putut reprezenta grafic valorile $\log K_{ow}$ obținute prin extrapolare din datele de retenție cromatografică în funcție de valorile $\log K_{ow}$ teoretice calculate prin metoda fragmentelor. S-au obținut în acest mod patru dependențe, două pentru fiecare modificator organic și alte două în funcție de ce tip de dependență (liniară sau polinomială de gradul II) a fost folosită pentru extrapolarea la 100% componentă apoasă. Cele patru dependențe sunt reprezentate grafic în **Fig. 2.2.24**, incluzând și parametrii regresii liniare obținute (pantă, ordonată la origine și coeficient de corelație) pentru a putea fi discutate.

De asemenea, se pot face următoarele considerații. Toate corelațiile dintre valorile $\log K_{w,RP-LC}$, obținute prin extrapolare în regresii liniare / polinomiale și cele teoretice (metoda fragmentelor), au condus la obținerea unor coeficienți de corelare foarte buni ($r \geq 0,93$ pentru acetonitril și $r \geq 0,97$ pentru metanol) indiferent de tipul de ecuație folosită, liniară sau polinomială. Ca o tendință generală, se observă că valorile $\log K_{w,RP-LC}$ determinate pentru metanol sunt mai mari decât cele obținute în cazul acetonitrilului. Aceasta deoarece pantele dependențelor $\log k' - C_m$ sunt mai mari pentru metanol decât pentru acetonitril; explicația pentru pantele mai mari poate fi pusă pe seama diferenței de putere elutropică (polaritate) între metanol și acetonitril. Altfel spus, aceeași scădere procentuală a celor doi modificatori în faza mobilă va genera o creștere mai importantă a factorului de capacitate în cazul metanolului și implicit o pantă mai mare a acestei dependențe. De asemenea, se poate observa că valorile coeficienților de corelație pentru metanol sunt semnificativ mai mari decât în cazul acetonitrilului, în timp ce nu există o diferență netă între acești coeficienți pentru același modificator în funcție de tipul de ecuație folosit la trasarea dependenței $\log k' - C_m$. O corelație perfectă între $\log K_{w,RP-LC}$ și $\log K_{ow}$ teoretic, presupune ca parametrii regresii liniare respective, panta și ordonata la origine, să aibă valorile 1, respectiv 0. În cazul celor mai puțin hidrofobi compuși studiați, fenolul și acidul salicilic, se constată o apropiere foarte mare între valorile $\log K_{w,RP-LC}$, cele obținute prin metoda distribuției apă : octanol și cele teoretice obținute prin metoda fragmentelor. Aceasta deoarece intervalul de compoziții ale fazei mobile studiat pentru cei doi compuși a fost foarte apropiat de 0% modificator organic, în condițiile eluției într-un timp rezonabil (în cazul acidului salicilic s-a mers până la 5% modificator organic ceea ce presupune o eroare foarte mică la extrapolarea dependențelor la 0% modificator organic în faza mobilă).

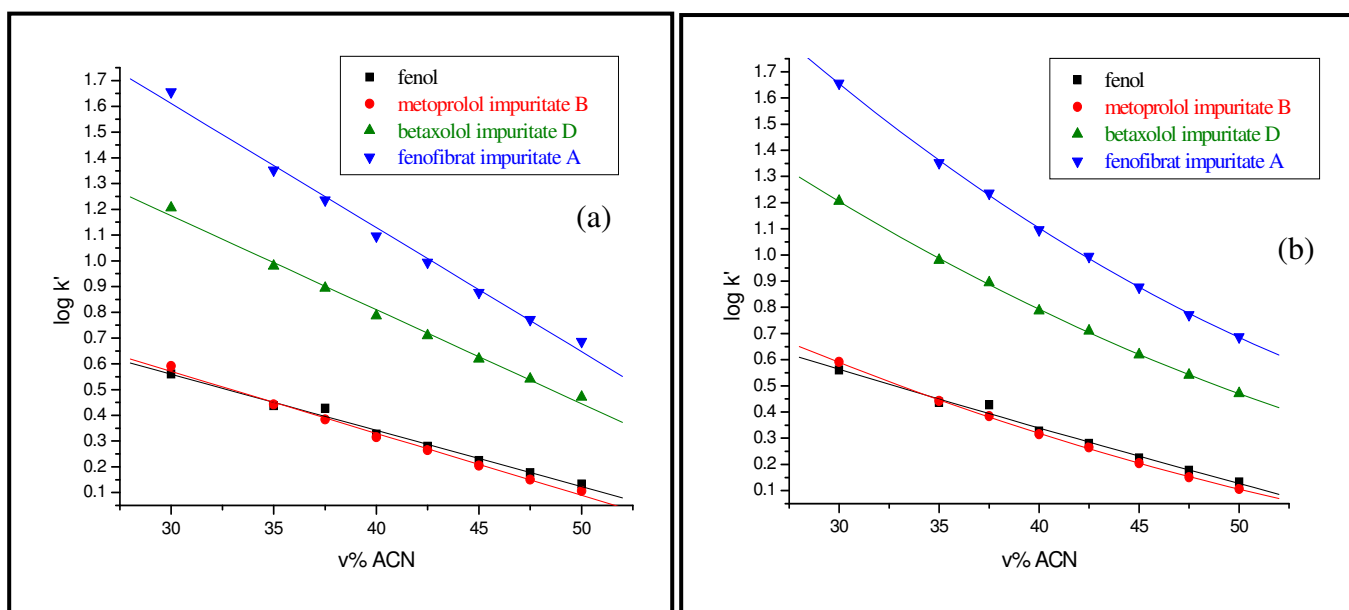


Fig 2.2.2. Dependența liniară (a) respectiv polinomială (b) a retenției ($\log k'$) de procentul de modificator organic (acetonitril) din faza mobilă pentru fenol, metoprolol impuritate B, betaxolol impuritate D și fenofibrat impuritate A.

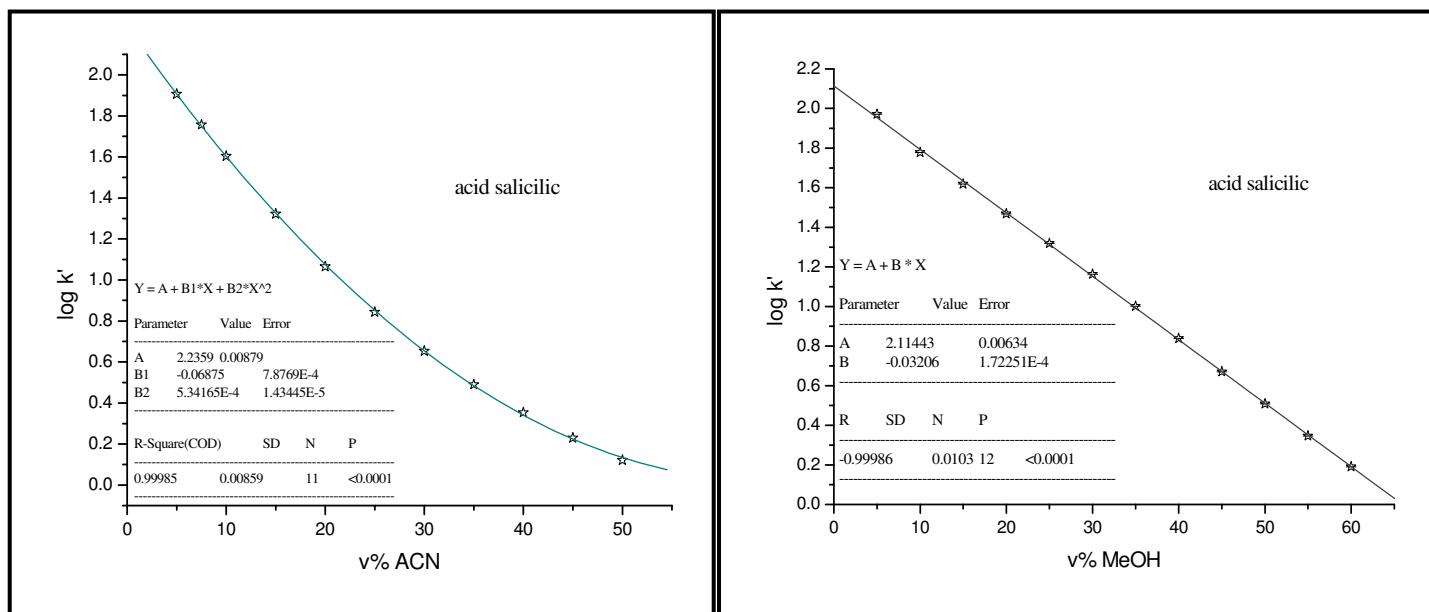


Fig 2.2.4. Dependența liniară respectiv polinomială a retenției ($\log k'$) de procentul de modificator organic (acetonitril sau metanol) din faza mobilă pentru acidul salicilic.

Tabel 2.2.2. Comparație între valorile $\log K_{ow}$ obținute experimental pe baza dependențelor liniare / polinomiale și cele teoretice determinate prin metoda fragmentelor moleculare.

Analit	Comparație $\log K_{ow}$ experimental (RP-LC) versus $\log K_{ow}$ teoretic				
	$\log K_{ow}$ experimental - ACN		$\log K_{ow}$ teoretic (metoda fragmentelor)	$\log K_{ow}$ experimental - MeOH	
	Regresie liniară	Regresie polinomială		Regresie liniară	Regresie polinomială
fenol	1,29	1,38	1,51	1,56	1,52
acid salicilic	2,04	2,31	2,24	2,19	2,18
metoprolol imp. B	1,36	1,82	1,79	1,96	2,24
betaxolol imp. D	2,34	3,05	3,07	3,12	3,47
fenofibrat imp. A	3,13	4,18	3,31	4,06	4,58
amiodaronă imp. E	3,10	4,66	5,23	5,11	6,62
amiodaronă imp. D	4,06	5,33	7,57	6,46	7,83

Analizând valorile individuale ale $\log K_{ow}$ pentru toți compușii model date în **Tabelul 2.2.2**, se pot face următoarele considerații:

- valorile extrapolate respectiv cele teoretice corespunzătoare indicelui de hidrofobicitate sunt apropiate;
- folosind extrapolarea din regresii liniare și metanol ca modificator organic se obțin valori $\log K_{ow}$ mai apropiate de cele teoretice decât pentru acetonitril; în schimb dacă se extrapolează dependențele polinomiale, valorile obținute sunt mai apropiate de cele teoretice în cazul acetonitrilului ca modificator în faza mobilă;
- printre cele mai mari deviații relative (erori ale modelului) se înregistrează în cazul compușilor amiodaronă impuritate D și amiodaronă impuritate E care sunt compușii cei mai hidrofobi din seria investigată. Datorită acestei hidrofobități mărite, retenția lor a fost măsurată în faze mobile cu conținut ridicat de modificator organic (95 – 40%) ducând la erori importante apărute în urma extrapolării la 0% modificator organic. În schimb se observă că, dacă se măsoară

retenția în faze mobile cu un procent mare de solvent apos și dacă acest interval este și unul suficient de extins, deviațiile de la valorile teoretice sunt mult mai mici; este cazul acidului salicilic, a cărui retenție a fost măsurată în intervalul 50 – 5% ACN și respectiv 60 – 5% MeOH), a cărui deviație relativă medie a fost cea mai redusă dintre toți compușii model (4,2% valoare obținută prin medierea deviațiilor relative pentru cele patru situații).

În ciuda unora din abaterile destul de mari înregistrate pentru valorile indicelui de hidrofobicitate determinat prin extrapolare în datele de retenție cromatografică față de valorile teoretice, trebuie ținut minte că valorile teoretice ale indicelui de hidrofobicitate calculate prin metoda fragmentelor sunt la rândul lor afectate de erori generate de aproximările folosite, la fel ca și modelul extrapolării retenției în RP-LC. De aceea, orice deviație de la aceste valori teoretice, fie că este mare sau mică, nu înseamnă că este vorba neapărat de o valoare eronată. Cea mai exactă metodă de determinare a indicelui de hidrofobicitate rămâne metoda partiției apă : octanol (efectuată în experimente de tip ‘shake-flask’). Din nefericire asemenea date experimentale nu au fost disponibile pentru compușii model aleși cu excepția fenolului ($\log K_{ow} = 1,46$) și a acidului salicilic ($\log K_{ow} = 2,26$) [98], valori care, după cum se poate observa, sunt foarte apropiate de cele teoretice, fiind vorba de compuși cu structuri relativ simple, respectiv 1,51 pentru fenol și 2,24 pentru acidul salicilic, dar și de cele determinate prin RP-LC conform **Tabelului 2.2.2**.

Calcularea indicelui de hidrofobicitate prin extrapolare din date de retenție cromatografică obținute cu faze mobile având mai mult de 10% conținut de modificator organic, nu poate reprezenta o estimare foarte corectă a acestui parametru. Aceste valori reprezintă de fapt constanta de distribuție a anliților între faza mobilă și cea staționară dacă structura și conformația fazei staționare în 100% apă ar fi aceeași ca pentru faze mobile binare alcătuite din amestecuri apă – modificator organic. Totuși astfel de date extrapolate sunt interesante și utile din punct de vedere al studiilor QSRR (Quantitative Structure – Retention Relationships), deoarece pot corela foarte bine retenția cromatografică cu proprietățile hidrofobice ale compușilor, fiind în același timp strâns legate de structura acestora [99]. Deviațiile care apar de la valorile teoretice nu fac decât să confirme cele afirmate anterior. Aceste deviații sunt date de simplificările aplicate modelului prin care se determină $\log K_{ow}$ din extrapolarea datelor de retenție cromatografică. Atâta timp cât comportamentul fazei staționare rămâne neschimbat (procent ridicat de modificator organic în faza mobilă care permite solvatarea fazei staționare), modelul generează rezultate consistente în ceea ce privește predicția retenției. Pe de altă parte, însă, folosirea unor faze mobile cu un procent ridicat de apă în compoziție conduce la o schimbare conformațională a fazei staționare (de la bine-cunoscuta structură de tip „bristle” se ajunge la o aglomerare a lanțurilor alchilice, cunoscut ca fenomenul de „colapsare”), ceea ce produce modificarea proprietăților de retenție ale acestora și implicit la erori în estimarea retenției prin extrapolare [100].

2.2.5. Influența naturii fazei staționare asupra determinării $\log K_{ow}$ prin RP-LC

În subcapitolele anterioare s-a arătat că estimarea indicelui de hidrofobicitate prin RP-LC poate duce la obținerea unor rezultate apropiate de cele obținute folosind modele teoretice sau metoda clasică de determinare a indicelui de hidrofobicitate, partiția în sistemul apă : octanol. O altă întrebare care se ridică în acest caz este dacă natura fazei staționare folosită în RP-LC influențează sau nu valorile $\log K_{ow}$ obținute prin această tehnică. Hidrofobicitatea unui compus organic este o proprietate fizico-chimică care depinde de structura acestuia. Pe de altă parte, însă, hidrofobicitatea unui compus chimic nu are sens dacă nu este raportată la un sistem chimic de referință (de exemplu sistemul apă : octanol sau un sistem RP-LC). Studiul de față urmărește să evidențieze diferențele între valorile indicelui de hidrofobicitate ($\log K_{ow}$) obținute în RP-LC folosind faze staționare diferite în ceea ce privește hidrofobicitatea. Pentru aceasta s-au considerat două sisteme RP-LC diferențiate prin tipul de fază staționară folosită: (a) o fază staționară de tip octadecil silicagel (C18)

și (b) o fază staționară de tip octil silicagel (C8). Cele două tipuri de fază staționară diferă, evident, prin hidrofobicitate, faza octadecil fiind mult mai hidrofobă.

Pentru a verifica toate aceste considerații s-a realizat un studiu de retenție pe patru compuși model (ale căror structuri sunt date în **Fig. 2.2.26**) folosind cele două faze staționare amintite, dar păstrând aceeași fază mobilă și aceleași condiții de eluție. Pe baza modelului liniar dat de relația (2.2.6) și expus anterior în subcapitolul **2.2.2**, s-au putut calcula valorile $\log K_{ow}$ corespunzătoare celor patru compuși model pentru cele două tipuri de faze staționare alese. Două coloane cromatografice au fost folosite la acest studiu: o coloană Purospher STAR RP-18e având dimensiunile 125 mm L x 4,0 mm d.i. x 5 μ m d.p. care conține ca fază staționară cu radicali octadecil (C18) grefați pe un suport inert de silicagel (Merck) și o a doua coloană Zorbax Eclipse XDB-C8 de 150 mm L x 4,6 mm d.i. x 5 μ m d.p., având ca fază staționară radicali octil (C8) grefați pe un suport inert de silicagel (Agilent).

Astfel, s-au putut calcula valorile $\log K_{ow}$ pentru cei patru compuși model folosind cromatografia de lichide în fază inversă și două coloane cromatografice având faze staționare diferite din punct de vedere al hidrofobității, conform **Tabelului 2.2.5**.

Tabel 2.2.5. Comparație între valorile $\log K_{ow}$ obținute experimental prin RP-LC, cele teoretice determinate prin metoda fragmentelor moleculare și respectiv valorile din literatură determinate experimental prin metoda partiției în sistemul apă : octanol.

Analit	$\log K_{ow}$ RP-LC (Purospher STAR RP-18e)	$\log K_{ow}$ RP-LC (Zorbax Eclipse XDB-C8)	$\log K_{ow}$ teoretic (met. frag.)	$\log K_{ow}$ experimental
metoprolol impuritate A	2,20	1,94	0,79	-
metoprolol	2,50	2,24	1,69	1,88
betaxolol impuritate A	2,80	2,48	1,97	-
betaxolol	3,13	2,72	2,98	2,81

Analizând datele din **Tabelul 2.2.5** se poate concluziona că valorile $\log K_{ow}$ determinate prin RP-LC diferă semnificativ în funcție de faza staționară. Astfel pentru faza staționară de tip octadecil silicagel (C18) valorile $\log K_{ow}$ obținute sunt sistematic mai mari decât cele corespunzătoare fazei staționare octil silicagel (C8), diferența dintre cele două seturi de valori fiind, în medie, de 0,3 – 0,4 unități. Dintre cele două seturi de valori corespunzătoare fazelor staționare octil și octadecil, primul este mai apropiat de valorile $\log K_{ow}$ teoretice, dar și de cele experimentale obținute prin partiție în sistemul apă : octanol (doar pentru metoprolol și betaxolol), deoarece sistemul de partiție apă : octanol este mai apropiat ca hidrofobicitate de un sistem RP-LC bazat pe o fază staționară cu un lanț alchilic de 8 atomi de carbon, decât de un sistem cu o fază staționară cu 18 atomi de carbon.

Diferența de hidrofobicitate între cele două faze staționare generează practic o retenție mai mare a analiților în coloană. Aceasta înseamnă un factor de capacitate mai mare la aceeași compoziție a fazei mobile, o pantă mai mare a dependenței liniare $\log k' - C_m$, și implicit o valoare mai mare la extrapolarea la 0% C_m ($\log k'_{w}$), valoare din care se estimează $\log K_{ow}$.

După cum se poate observa din **Fig. 2.2.28** valorile $\log K_{ow}$ obținute prin RP-LC pe cele două coloane cromatografice se corelează foarte bine cu valorile teoretice calculate prin metoda fragmentelor; valorile coeficienților de corelație fiind mai mari decât 0,98 în ambele cazuri. O dependență liniară cu un coeficient de corelație de asemenea foarte bun ($> 0,99$) se obține și între valorile $\log K_{ow}$ determinate pe coloana Purospher RP-18e și coloana Zorbax XDB-C8 (**Fig. 2.2.29**), ceea ce indică corectitudinea determinărilor prin RP-LC indiferent de faza staționară folosită. Creșterea valorilor $\log K_{ow}$ (RP-LC) cu creșterea lungimii lanțului alchilic al fazei

staționare arată că retenția în RP-LC depinde de hidrofobicitatea fazei staționare. Corelația bună dintre valorile $\log K_{ow}$ obținute cromatografic, fie pe o coloană de tip C18, fie pe o coloană de tip C8, și cele determinate teoretic arată că există o legătură strânsă între retenția cromatografică și structura analiților, legătură ce se poate defini simplu prin hidrofobicitatea analiților.

2.2.6. Concluzii

Estimarea indicelui de hidrofobicitate din date experimentale obținute prin RP-LC ($\log K_{w,RP-LC}$) s-a făcut folosind modelul dependenței liniare, respectiv polinomiale între retenție ($\log k'$) și procentul de modifier organic în faza mobilă (C_m). Pe baza acestor dependențe funcționale s-a făcut extrapolarea la 0% modifier organic (respectiv 100% solvent apos) ceea ce înseamnă o distribuție a soluțiilor între o fază mobilă exclusiv polară și o fază staționară hidrofobă. Pentru confirmarea validității rezultatelor obținute cu sistemul RP-LC s-au comparat rezultatele obținute cu cele din literatură, fie experimentale (partiție apă : octanol), fie teoretice.

Valorile $\log K_{w,RP-LC}$ obținute pe baza modelului prezentat (RP-LC) au fost comparate cu indicii de hidrofobicitate cunoscuți din date de literatură. Mai mult, s-a trasat și o dependență între cele două seturi de date. Toate corelațiile dintre valorile $\log K_{ow}$, obținute prin extrapolare în regresii liniare sau polinomiale și cele teoretice (metoda fragmentelor), au condus la obținerea unor coeficienți de fitare foarte buni ($r \geq 0,93$ pentru acetonitril și $r \geq 0,97$ pentru metanol), indiferent de tipul de ecuație folosită, liniară sau polinomială. Ca o tendință generală se observă că valorile $\log K_{ow}$ determinate pentru metanol sunt mai mari decât cele obținute în cazul acetonitrilului. O posibilă explicație pentru cele două observații de mai sus este legată de polaritatea celor doi modificatori. Metanolul are o polaritate mai mare și mai apropiată de cea a apei. După cum a fost arătat anterior, asemănarea între sistemul RP-LC și sistemul apă : octanol este cu atât mai mare cu cât faza mobilă din RP-LC se apropie de polaritatea apei. Așadar cu cât sistemele sunt mai asemănătoare, cu atât datele generate de ele sunt mai apropiate.

Natura fazei staționare influențează retenția analiților și implicit și valorile determinate pentru $\log K_{ow}$ prin cromatografia de lichide în fază inversă. Astfel, creșterea hidrofobității fazei staționare (de la octil la octadecil) duce la obținerea unor valori mai mari cu aproximativ 0,3 – 0,4 unități ale indicelui de hidrofobicitate pentru compușii studiați, lucru explicabil prin creșterea retenției acestora o dată cu creșterea lungimii lanțului hidrocarbonat al fazei staționare. Indiferent de modul de calcul al $\log K_{ow}$, se poate trasa o dependență liniară ($r > 0,98$) între seturile de valori corespunzătoare analiților studiați, fie ca sunt obținute prin RP-LC pe diferite faze staționare fie că sunt calculate prin metode teoretice (metoda fragmentelor moleculare).

În concluzie, cele două studii prezentate confirmă posibilitatea corelării retenției și hidrofobității în cromatografia de lichide în fază inversă și, mai mult decât atât, confirmă posibilitatea determinării hidrofobității analiților pe baza acestei tehnici cromatografice. RP-LC a devenit o metodă complementară celei clasice care folosește partiția apă : octanol. Rezultatele calculului hidrofobității prin RP-LC sunt apropiate de cele obținute cu ajutorul sistemului clasic apă : octanol, dar și de cele obținute prin diferite metode de calcul teoretic, cum este metoda fragmentelor.

Datele de hidrofobicitate obținute prin RP-LC își găsesc aplicabilitatea și la dezvoltarea rapidă a unor metode lichid-cromatografice destinate separării unor compuși înrudiți. Cunoașterea acestor date permite predicția retenției și a ordinii de eluție a compușilor investigați, pe un domeniu larg de compoziții ale fazei mobile. Toate aceste informații pot duce la eliminarea efectuării unor experimente practice care nu sunt utile și la scurtarea timpului necesar dezvoltării și optimizării metodelor cromatografice respective.

2.3. Influența pH-ului componentei apoase a fazei mobile și a caracterului acido-bazic al analiților asupra retenției în RP-LC

2.3.1. Problematika studiului

În cromatografia de lichide în fază inversă pH-ul componentei apoase a fazei mobile reprezintă un parametru esențial în controlul retenției analiților și a selectivității separărilor, în măsura în care compușii ce urmează a fi separați au în structura lor grupări polare ionice sau disociabile grefate pe scheletul hidrofob al moleculelor. Ionizarea acestor grupări acide (-COOH, -OH, amidă, sulfonamidă) sau bazice (-NH₂) poate fi influențată de pH-ul prestabilit al componentei apoase a fazei mobile. În cazul compușilor lipsiți de asemenea grupări ionice / disociabile (hidrocarburi, esteri, etc.), pH-ul nu va influența retenția acestora. Pe lângă retenție și selectivitate, pH-ul și respectiv caracterul acido-bazic al analiților, în strânsă legătură cu proprietățile fazei staționare, pot avea o influență semnificativă și asupra altor parametri cromatografici, ca de exemplu simetria și eficiența picurilor generate [103, 104]. Precizarea făcută anterior referitoare la pH-ul componentei apoase a fazei mobile și nu al fazei mobile este importantă, deoarece acesta se măsoară în componenta apoasă înainte de amestecarea cu componenta organică a fazei mobile.

În RP-LC controlul pH-ului se realizează cu ajutorul soluțiilor tampon sau al acizilor. Se folosesc soluții tampon pe bază de fosfat, acetat, borat, sulfat, etc. și respectiv acizi de tipul: fosforic, formic, acetic, trifluoracetic, sulfuric și chiar clorhidric. pH-ul componentei apoase a fazei mobile este așadar un parametru important cu care poate fi modulată retenția și selectivitatea separărilor cromatografice.

În principiu, pentru un compus cu grupări acide (-COOH, -OH, -CONH₂) retenția va crește o dată cu scăderea pH-ului, deoarece disocierea acestor grupări va fi blocată și molecula va interacționa pregnant cu faza staționară pe baza hidrofobicității sale.

Un compus bazic pe de altă parte (de exemplu, având grupări amino în moleculă) se va afla în stare protonată la un pH acid și va tinde să elueze foarte repede din coloana cromatografică. Pentru a da retenție unor asemenea compuși, în special atunci când metoda lichid-cromatografică folosește un procent ridicat de solvent organic în componența fazei mobile, se pot folosi formatori de pereche ionică (aplicând mecanismul RP-LC bazat pe formare de perechi ionice) păstrându-se totodată un pH acid (2 ÷ 4). Formatorii de pereche ionică vor neutraliza practic sarcina electrostatică a grupării amino protonate cu ajutorul unui contraion voluminos. Agregatul molecular format, care este neutru din punct de vedere electric, va fi reținut în faza staționară, ducând la creșterea factorului de capacitate. Cealaltă modalitate de creștere a retenției, este creșterea pH-ului cu câteva unități peste valoarea ($pK_w - pK_b$) a compusului respectiv, ceea ce face ca protonarea să fie redusă sau anulată, iar hidrofobicitatea moleculei va crește ducând evident la creșterea retenției în coloană.

Modificarea pH-ului duce de obicei la variații în retenția analiților acizi sau bazici. Scăderea pH-ului duce la o scădere a retenției compușilor bazici deoarece gradul de protonare crește și se mărește implicit și polaritatea moleculei. În cazul acizilor scăderea pH-ului duce la creșterea retenției. Selectivitatea unei separări poate fi influențată și ea de variația pH-ului componentei apoase a fazei mobile. Într-un amestec de compuși este posibil ca aceștia să fie afectați diferit de pH. De aceea, variația pH-ului poate genera modificări semnificative în retenția unor compuși față de ceilalți ceea ce poate însemna, după caz, o separare mai bună sau mai proastă, o inversare a ordinii de eluție, etc.

Pentru a sublinia toate aceste aspecte, în speță posibilitățile multiple de modulare a retenției și selectivității cu ajutorul pH-ului în RP-LC, prezentul studiu a fost conceput în sensul monitorizării efectelor apărute în urma modificării pH-ului componentei apoase a fazei mobile în privința parametrilor cromatografici enumerați anterior (retenție, selectivitate, simetrie, rezoluție). Vor fi prezentate mai multe cazuri de separări cromatografice de tip RP-LC, având la bază diferite

metode LC, dedicate separării mai multor compuși înrudiți din punct de vedere structural. Pentru fiecare dintre acestea se va prezenta influența pe care o are variația pH-ului componentei apoase efectuată, fie pe un interval mai mare de pH în cazul dezvoltării unei metode RP-LC, fie pe un interval mai restrâns de pH în cazul evaluării robusteții metodei în cauză.

2.3.4. Rezultate și discuții

Amestec de compuși bazici (Drotaverină și impurități)

La dezvoltarea metodei lichid-cromatografice dedicate separării și determinării Drotaverinei și a impurităților înrudite din formulări farmaceutice de tip comprimate s-a studiat influența pH-ului componentei apoase pe un interval relativ larg: 3,0 – 6,0. Parametrii finali ai metodei sunt dați în **Tabelul 2.3.7**.

Deoarece impuritățile Drotaverinei nu au fost disponibile ca standard de referință, pentru a se putea testa robustețea și selectivitatea metodei, s-a folosit o soluție concentrată de Drotaverină, 1500 ppm, nivel la care au putut fi observate, în afară de Drotaverină, cel puțin 9 picuri de impurități printre care și Impuritățile R1 și R2 (ale căror structuri sunt cunoscute). Alte 6 impurități au fost denumite arbitrar Impuritate 1 ÷ 6 în ordinea de eluție, iar ultima impuritate a fost denumită Impuritate X pentru a o distinge de toate celelalte în ceea ce privește variația dramatică a retenției în contextul modificării pH-ului. Datele de retenție (k') sunt date în **Tabelul 2.3.8**.

În ceea ce privește structurile Drotaverinei și a Impurităților R1 și R2 se poate observa că vorbim de compuși cu caracter bazic a căror retenție cu creșterea pH-ului componentei apoase a fazei mobile este de așteptat să crească.

Pe baza datelor experimentale de retenție s-au calculat factorii de capacitate pentru Drotaverină și cele 9 impurități identificate. Cu valorile factorului de capacitate s-au trasat dependențele acestui parametru în funcție de pH-ul componentei apoase a fazei mobile (**Fig. 2.3.14**). După cum se poate observa din datele experimentale și din graficele factor de capacitate funcție de pH, retenția Drotaverinei, Impurității R1, Impurității R2 și a Impurităților 1 ÷ 6 crește ușor cu creșterea pH-ului de la 3,0 la 6,0. În cazul Impurității X pe de altă parte, creșterea retenției pentru același interval este mult mai mare (de aproximativ 66% față de o medie de 15% pentru ceilalți 9 compuși). Din punct de vedere al comportamentului similar cu Drotaverina și Impuritățile R1 și R2, se poate spune că Impuritățile 1 ÷ 6 și Impuritatea X sunt tot compuși bazici cu grupări amino în moleculă asemănători cu Drotaverina. Cea mai mare variație a retenției pentru Drotaverină, Impuritate R1 și Impuritățile 1 ÷ 6 se observă între pH 5 și 6, cel mai probabil acești compuși având o valoare ($pK_w - pK_b$) mai mare de 6, adică o valoare pK_b mai mică de 8. În cazul Impurității X dependența obținută pe intervalul studiat este sigmoidală (**Fig. 2.3.14**), coeficientul de corelație obținut (r^2) fiind mai mare de 0,999. Din parametrul x_0 al ecuației sigmoide determinate (punctul de inflexiune) se poate estima valoarea pK_b a Impurității X; astfel valoarea estimată pentru pK_b este de 9,48 (14 - 4,52).

Concluzionând, se poate spune că aplicația prezentată exemplifică cum comportamentul diferit al retenției în funcție de pH-ul componentei apoase a fazei mobile datorat în principal diferențelor structurale între compuși, poate modifica selectivitatea sau chiar ordinea de eluție într-o separare. O altă concluzie ce se poate extrage din cele prezentate anterior este că dependențele k' - pH obținute pe un interval cât mai larg și cu cât mai multe valori ale pH-ului în acel interval, permit estimarea valorii pK_b pentru compuși organici cu caracter bazic.

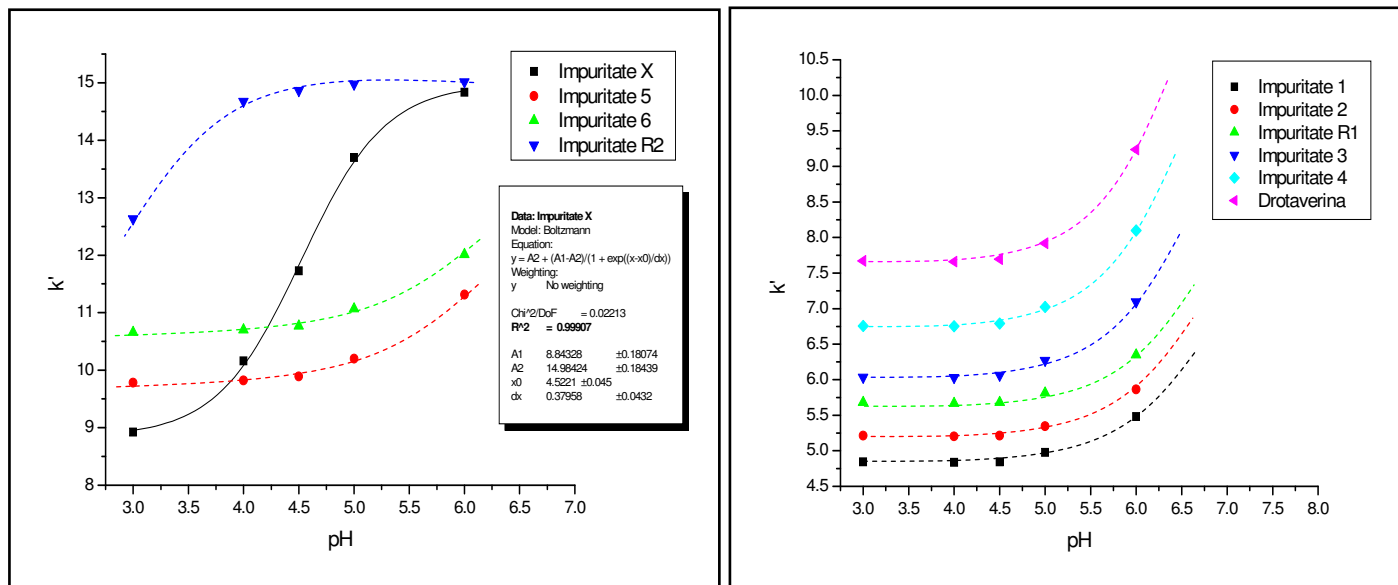


Fig. 2.3.14. Dependența factorului de capacitate de pH-ul componentei apoase a fazei mobile pentru Drotaverină și impuritățile sale. Pentru Impuritatea X este dată și ecuația sigmoidală determinată cu ajutorul programului Origin 7.0 împreună cu parametrii regresiei exponențiale și coeficientul de corelație aferent.

2.3.5. Concluzii

În RP-LC, pH-ul componentei apoase a fazei mobile este un parametru esențial folosit pentru controlul retenției și al selectivității. Pentru aceasta compușii organici de separat trebuie să fie compuși ionici sau disociabili, adică să aibă în structura lor grupări polare ionice sau disociabile, grefate pe scheletul hidrofob. Disocierea sau protonarea unor asemenea grupări acido-bazice este influențată de pH. În schimb, retenția unor compuși organici lipsiți de asemenea grupări ionice sau disociabile (cum este cazul hidrocarburilor sau al esterilor) nu va fi influențată de pH.

Pentru un compus organic cu caracter acid (grupări -OH, -COOH, -CONH₂, etc.) retenția scade odată cu creșterea pH-ului componentei apoase a fazei mobile, în timp ce pentru un compus organic având grupări cu caracter bazic (amino), retenția crește dacă pH-ul crește. Pentru compuși acizi creșterea pH-ului duce la o disociere din ce în ce mai accentuată a grupărilor acide având ca efect creșterea polarității moleculei și implicit scăderea retenției în RP-LC. La compușii de tip bazic situația este inversă, în sensul că creșterea pH-ului face ca protonarea grupărilor bazice existente în molecula acestora să fie tot mai puțin favorizată, ceea ce înseamnă o creștere a hidrofobicității analitului și implicit o retenție din ce în ce mai mare în faza staționară.

Dependența retenției compușilor organici acido-bazici de pH-ul componentei apoase a fazei mobile este descrisă de o curbă sigmoidală care are la bază o relație exponențială de tip Boltzmann. pH-ul corespunzător punctului de inflexiune al acestei dependențe sigmoidale reprezintă valoarea pK_a pentru compușii de tip acid și respectiv pK_w - pK_b pentru compușii bazici. Astfel, pe baza datelor de retenție cromatografică obținute la diferite valori ale pH-ului se poate trasa dependența k' - pH și, din parametrii ecuației sigmoidale Boltzmann, se poate determina punctul de inflexiune al curbei și implicit se pot estima valorile pK_a sau pK_b, după caz. Trebuie menționat însă că valoarea pH-ului componentei apoase nu este totuna cu pH-ul fazei mobile, deoarece modificatorul organic are și el contribuția sa la valoarea pH-ului fazei mobile și de aceea valorile pK_a sau pK_b obținute prin RP-LC reprezintă doar estimări ale acestor parametri. Modelarea retenției în funcție de pH pentru un compus organic cu caracter bazic sau acid poate fi folosită la predicția retenției în RP-LC pentru orice altă valoare a pH-ului din interiorul sau din afara intervalului studiat de pH (interpolare sau extrapolare).

2.4. Influența hidrofobității modificadorului organic asupra retenției în RP-LC. Modelul adsorbției competiționale analit – modificador organic hidrofob

2.4.1. Problematika studiului

După cum a fost arătat în subcapitolul 2.2.2, retenția compușilor în RP-LC este puternic influențată de hidrofobitatea proprie ($\log K_{ow}$) și de cea a fazei staționare. În aproape toate cazurile, mărimea hidrofobității analiților dă și ordinea de eluție a acestora din coloana cromatografică. Din ce în ce mai des se discută în literatură despre relații cantitative structură – retenție (QSRR), adică modele teoretice ce leagă proprietățile structurale de retenția cromatografică [106]. De aceea, exactitatea valorilor indicelui de hidrofobitate determinate experimental sau prin metode de calcul teoretic este foarte importantă pentru a anticipa retenția și selectivitatea separării unui grup de analiți prin RP-LC [93], [101], [107]. Până nu demult, în RP-LC, faza staționară era considerată unicul partener implicat în interacțiile hidrofobe cu analiții și modificatorii organici [108, 109], deși măsurarea cantitativă a indicelui său de hidrofobitate nu este foarte simplă, dar este realizabilă prin unele modele practice acceptate în literatură [110 - 112].

În cromatografia de lichide în fază inversă retenția analiților este rezultatul competiției dintre interacțiile hidrofobe cu lanțurile alchilice hidrocarbonate din faza staționară și forțele de solvatare exercitate de către faza mobilă [22]. Acestea din urmă nu implică interacții hidrofobe, cu excepția cazului în care fazei mobile i se adaugă un modificador cu caracter hidrofob. Mecanismul cu formare de perechi ionice se bazează pe un concept relativ similar, deși procesele care stau la baza retenției prin acest mecanism presupun mai degrabă reținerea formatorului de pereche ionică în faza staționară ce capătă în acest fel un caracter de schimbator de ioni [113]. Caracterul hidrofob al fazei mobile poate fi controlat prin adăugarea în componenta organică a fazei mobile a unor cantități mici de solvenți organici cu un lanț hidrofob de cel puțin trei atomi de carbon (ex. 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-octanol).

Scopul primar al acestui studiu a fost acela de a observa și eventual măsura influența caracterului hidrofob al unor alcooli superiori asupra retenției mai multor compuși organici cu caracter hidrofob în RP-LC. Mai mulți compuși înrudiți din punct de vedere structural, aparținând clasei de antidiabetice orale de tip sulfonamide [114] au fost aleși drept compuși model pentru studiul de față.

Retenția cromatografică a celor opt compuși model descriși anterior a fost studiată pe același tip de fază staționară, dar folosind faze mobile a căror hidrofobitate a fost variată prin adăugarea unor cantități cunoscute de alcooli superiori (etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 1-pentanol și respectiv 1-octanol) în modificadorul organic folosit (metanolul). S-a adăugat 1% alcooli superiori în metanol (raport volumetric), iar acest amestec a constituit modificadorul organic al fazei mobile. Componenta apoasă a fazei mobile a fost de fiecare dată aceeași (0,2% acid acetic în apă). Pentru a trasa dependența factor de capacitate – concentrație de modificador s-a variat raportul procentual solvent apos – modificador organic pe intervale diferite în funcție de hidrofobitatea analiților, pentru a obține timpi de retenție rezonabili.

2.4.3. Rezultate și discuții

2.4.3.2 Influența componentei organice a fazei mobile asupra retenției

În RP-LC retenția analiților este influențată, printre altele, de natura componentelor organici din faza mobilă, dar și de concentrația acestora (C_i). Atunci când se folosește un singur component organic, modelarea retenției se face utilizând ecuații de tip liniar sau polinomiale (gradul II pentru acetonitril) care exprimă dependența retenției funcție de concentrația procentuală a modificadorului

organic. Lucrurile devin mai complicate atunci când faza mobilă conține doi sau mai mulți modificatori organici, deoarece pe lângă contribuția individuală a celor doi mai trebuie considerat și efectul cumulat al acestora asupra retenției, efect care se traduce printr-un termen care consideră produsul dintre concentrațiile individuale ale ambilor solvenți [94, 123].

$$\log k' = \sum_{i=1}^n \sum_{j=0}^2 \alpha_{j,i} \cdot C_i^j + \sum_{i=1}^n \sum_{j=0}^2 \beta_{j,i} \cdot C_i^j \cdot C_{i+1}^j \quad (2.4.1)$$

unde $\log k'$ reprezintă logaritmul zecimal al factorului de capacitate, primul termen din dreapta redă contribuția fiecărui solvent organic individual, iar cel de-al doilea termen se referă la contribuția mixtă a doi sau mai mulți solvenți, așa-numitul efect quadratic; acesta din urmă este de obicei mult mai mic în raport cu primul. Desfășurată, ecuația de mai sus se poate scrie:

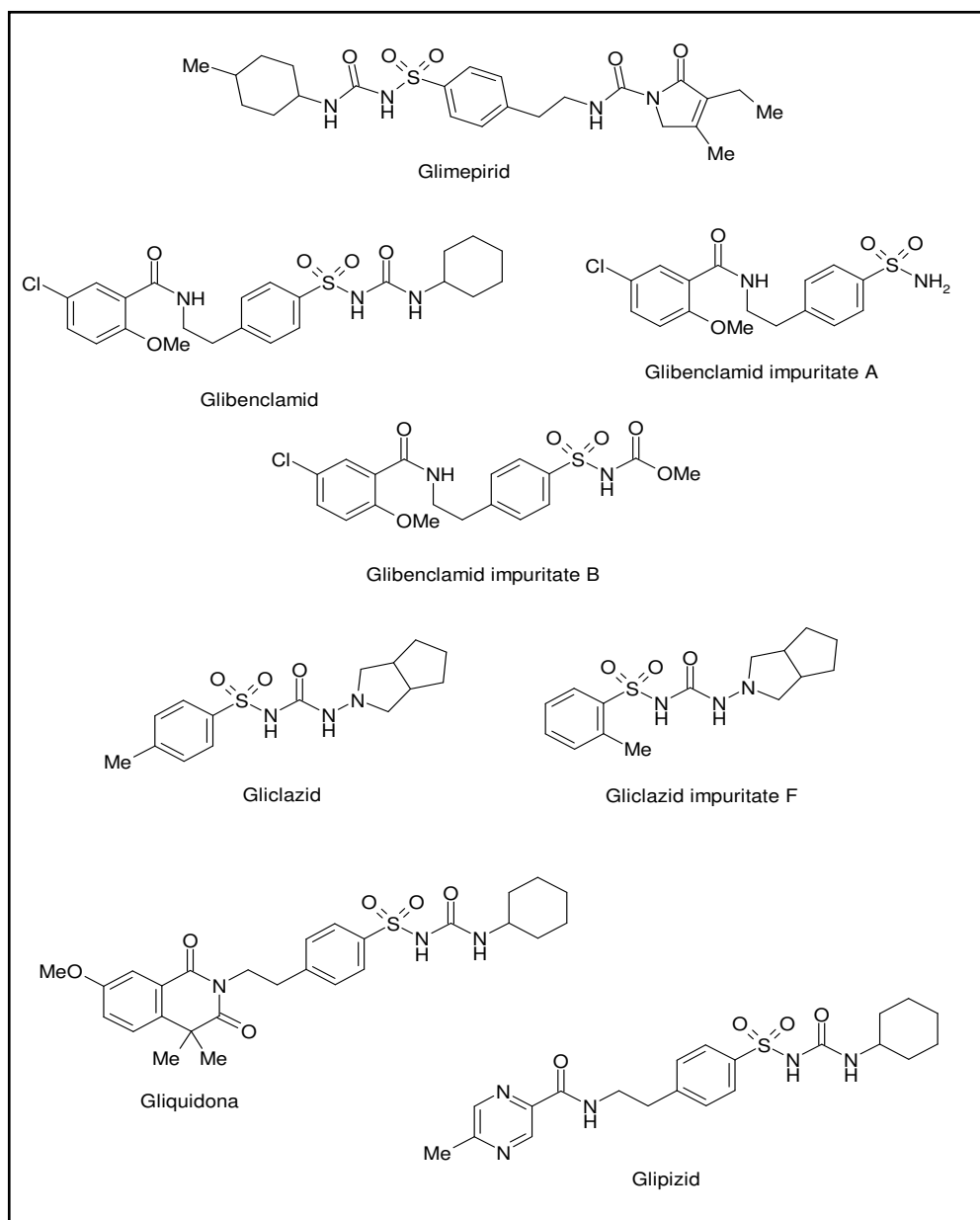


Fig 2.4.1. Structurile chimice și denumirile farmaceutice ale celor opt compuși model.

$$\log k' = \alpha_{0,1} + \alpha_{0,2} + \alpha_{1,1} \cdot C_1 + \alpha_{1,2} \cdot C_2 + \alpha_{2,1} \cdot C_1^2 + \alpha_{2,2} \cdot C_2^2 \quad (2.4.2)$$

Atunci când componenta organică a fazei mobile (cu conținut mare de metanol) își păstrează raportul componentelor constant, dependența factorului de capacitate este dată de relația:

$$\log k' = \alpha_0 + \alpha_1 \cdot C_o \quad (2.4.3)$$

unde C_o este concentrația componentei organice în faza mobilă.

Datele experimentale de retenție obținute pentru setul de opt compuși studiați au validat modelul descris de relația (2.4.3) după cum se poate observa în **Fig. 2.4.3 - 2.4.5** și în **Tabelul 2.4.2** cu parametrii regresii liniare obținute. În toate cazurile coeficientul de corelație (r^2) pentru dependențele liniare obținute a fost mai mare de 0,995, indicând o fitare foarte bună a datelor experimentale în funcție de concentrația totală de modificator din faza mobilă.

Totodată s-a observat că datele experimentale de retenție pot fi corelate cu concentrația de modificator organic din faza mobilă și după un model polinomial de gradul II, doar că retenția este exprimată în acest caz ca factor de capacitate și nu ca logaritmul zecimal al acestuia. Și în acest caz s-au obținut coeficienți de corelație foarte buni ($r^2 > 0,995$).

$$k' = \varphi_0 + \varphi_1 \cdot C_o + \varphi_2 \cdot C_o^2 \quad (2.4.4)$$

Parametrii regresii liniare și respectiv polinomiale calculați pe baza relațiilor (2.4.3) și (2.4.4) ($\alpha_0, \alpha_1, \varphi_0, \varphi_1, \varphi_2, r^2$) pentru cei opt compuși model și pentru toate fazele mobile folosite (cu și fără adaos de 1% (v/v) alcoolii în metanol) sunt sintetizați în **Tabelele 2.4.2** și **2.4.3**.

Dependențele liniare $\log k'$ funcție de C_o sunt în general mai bine corelate decât cele polinomiale ale factorului de capacitate (k') funcție de C_o . Din dependențele liniare $\log k'$ versus C_o prezentate în **Fig. 2.4.3 - 2.4.5**, se poate observa că retenția compușilor model este modificată semnificativ doar pentru solvenții cei mai hidrofobi (1-pentanol și în special 1-octanol), utilizați ca aditivi ai componentei organice a fazei mobile la nivel de 1% (v/v). Această modificare drastică a retenției poate conduce în unele situații la o schimbare în selectivitatea separării cromatografice.

În concluzie, se poate spune că retenția compușilor model folosiți în prezentul studiu a scăzut cu creșterea concentrației de modificator organic în faza mobilă și totodată că introducerea în faza mobilă a unor solvenți din ce în ce mai hidrofobi (chiar la nivele mici de concentrație, 1% (v/v)) a condus, de asemenea, la scăderea retenției în coloana cromatografică.

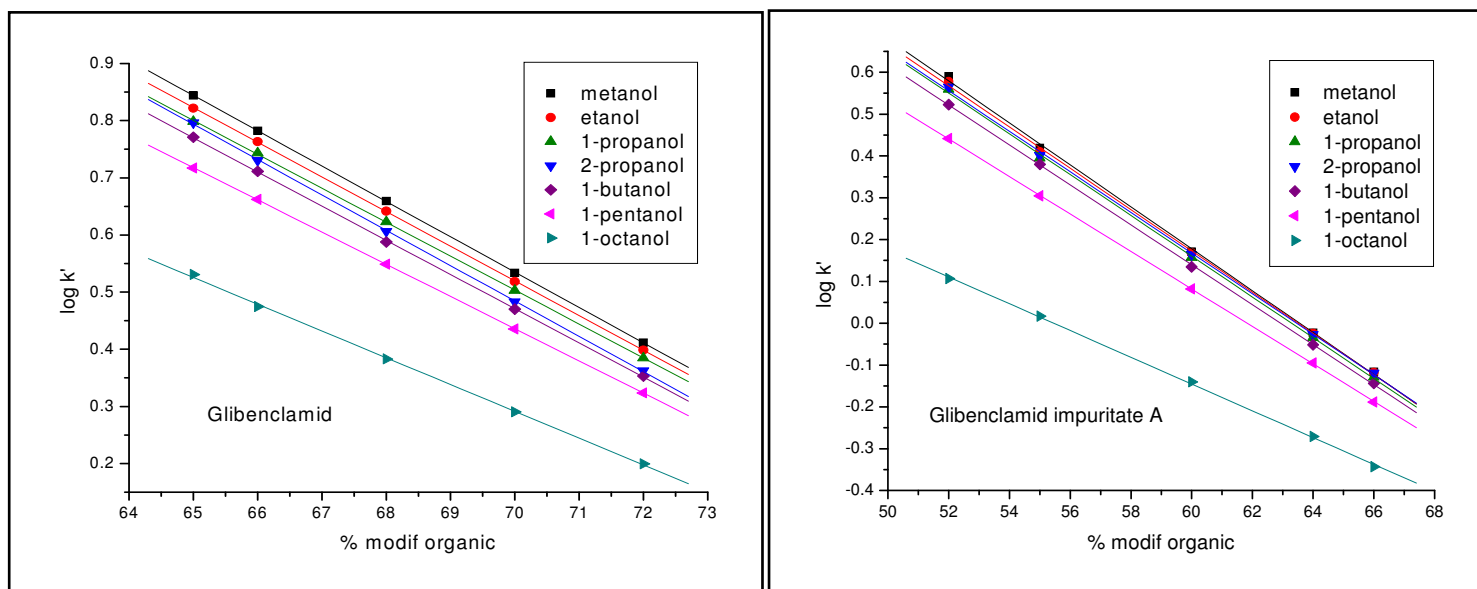


Fig 2.4.3. Dependența liniară a retenției ($\log k'$) de procentul de modificator organic din faza mobilă pentru Glibenclamid, Glibenclamid impuritate A.

2.4.3.3 Estimarea hidrofobității compuşilor model prin extrapolarea datelor de retenție

După cum s-a arătat în paragraful anterior relații de tipul (2.4.3) și (2.4.4) descriu dependența retenției în RP-LC în funcție de concentrația de modificador organic în faza mobilă. Se observă că pentru 0% modificador organic ($C_0 = 0$), parametrii α_0 and ϕ_0 reprezintă conform celor două ecuații: $\log k'_w$ și respectiv k'_w .

Astfel, s-au obținut pentru cei opt compuși model și pentru fiecare din fazele mobile folosite (având în componență mai mulți solvenți organici hidrofobi) valorile $\log K_{w,RP-LC}$, folosind următoarea relație:

$$\log K_{ow}^{RP-LC} = \log k'_w - \log \Phi \quad (2.4.5)$$

unde Φ este raportul fazelor din coloana cromatografică (raportul dintre volumul de fază staționară și cel al fazei mobile – V_{fs}/V_{fm}). Valoarea parametrului Φ a fost estimată pe baza caracteristicilor geometrice ale coloanei cromatografice și a timpului mort corespunzător acestora (pentru coloana Zorbax XDB-C18 150 mm lungime și 4,6 mm diametru interior, $\Phi = 0,557$ și $\log \Phi = -0,254$). Valorile $\log K_{ow}^{RP-LC}$ calculate prin cele două ecuații (2.4.3) și (2.4.4) sunt centralizate în **Tabelul 2.4.4**.

Analizând aceste valori se remarcă, în primul rând, o diferență importantă între valorile $\log K_{ow}^{RP-LC}$ obținute prin cele două modele matematice. În speță, valorile extrapolate folosind modelul liniar (2.4.3) sunt mult mai mari decât cele determinate pe baza modelului polinomial (2.4.4) pentru același compus și aceeași fază mobilă folosită. În ceea ce privește comparația dintre valorile $\log K_{ow}^{RP-LC}$ extrapolate prin cele două modele matematice (pentru 100% metanol ca modificador organic al fazei mobile) și valorile $\log K_{ow}$ teoretice sau experimentale, se constată că valorile extrapolate pe baza modelului liniar (2.4.3) sunt mai mari decât valorile teoretice, iar cele extrapolate pe baza modelului polinomial (2.4.4) sunt mult mai mici. După cum s-a arătat în capitolul 2.2.5 al prezentei lucrări, valorile indicelui de hidrofobitate $\log K_{ow}^{RP-LC}$ obținute pentru o fază staționară de tip octadecil ar trebui să fie mai mari decât valorile indicelui de hidrofobitate $\log K_{ow}$ (care indică partiția clasică a unui analit între apă și octanol) tocmai datorită hidrofobității mai mari a ligandului octadecil comparativ cu 1-octanolul. Aceeași discuție de mai sus poate fi făcută și din punct de vedere al corelației datelor extrapolate – cu ajutorul celor două modele – față de valorile cunoscute ale indicelui de hidrofobitate ($\log K_{ow}$), fie că vorbim de valori teoretice (metoda fragmentelor moleculare), fie că ne referim la valori experimentale (de precizat că acestea din urmă au fost disponibile numai pentru 5 din cei 8 compuși folosiți, compuși care reprezintă substanțe active bine cunoscute și caracterizate fizico-chimic). Astfel, față de valorile teoretice, coeficienții de corelație (r) pentru cele două modele au fost de 0,89 pentru modelul liniar, respectiv 0,70 pentru cel polinomial (metanol ca modificador organic). Pentru 1-octanol coeficienții de corelație au fost 0,92 la modelul liniar și de 0,88 pentru cel polinomial (**Fig. 2.4.6, 2.4.7**). Reprezentând valorile extrapolate față de valorile experimentale (pentru 5 din cei 8 compuși), s-au obținut valorile 0,82 (model liniar) și respectiv 0,75 (model polinomial) pentru metanol ca unic modificador organic, în timp ce folosirea 1-octanolului în faza mobilă a generat valori de 0,96 și respectiv 0,92 pentru cele două modele (**Fig. 2.4.8, 2.4.9**). De asemenea, se observă că valorile r obținute în prezența 1-octanolului sunt sistematic mai mari decât cele corespunzătoare metanolului în faza mobilă. În concluzie, pentru acest studiu, modelul liniar generează valori ale $\log K_{w,RP-LC}$ care se corelează mult mai bine cu valorile de literatură ale indicelui de hidrofobitate decât cele obținute cu modelul polinomial.

Un lucru interesant care se poate observa din **Tabelul 2.4.4** este că valorile $\log K_{ow}^{RP-LC}$ calculate prin oricare din cele două modele, scad pentru toți cei opt compuși odată cu creșterea hidrofobității modificadorului organic folosit în faza mobilă (adică de la metanol la 1-octanol). Observația este

Tabel 2.4.4. Comparație între valorile $\log K_{ow}$ obținute experimental prin RP-LC pentru toate fazele mobile utilizate, cele teoretice determinate prin metoda fragmentelor moleculare și respectiv valorile determinate experimental prin metoda partiției în sistemul apă : octanol.

A. valorile $\log K_{w,RP-LC}$ derivate prin extrapolarea retenției la 0% modificador organic în ecuația liniară (2.4.3)

Compus	$\log K_{ow}$ teoretic (met. frag.)	$\log K_{ow}$ experimental	$\log K_{w,RP-LC}$ (metanol)	$\log K_{w,RP-LC}$ (etanol)	$\log K_{w,RP-LC}$ (1-propanol)	$\log K_{w,RP-LC}$ (2-propanol)	$\log K_{w,RP-LC}$ (1-butanol)	$\log K_{w,RP-LC}$ (1-pentanol)	$\log K_{w,RP-LC}$ (1-octanol)
Glibenclamid	4,79	4,70	5,12	5,02	4,91	5,07	4,91	4,64	3,83
Glibenclamid imp A	2,51	-	3,44	3,38	3,34	3,33	3,26	3,02	2,03
Glibenclamid imp B	3,10	-	3,95	3,89	3,83	3,83	3,72	3,46	2,26
Gliclazid	2,12	2,60	3,82	3,79	3,74	3,84	3,70	3,56	2,49
Gliclazid imp F	2,12	-	3,87	3,77	3,77	3,69	3,64	3,39	2,04
Glipizid	3,35	2,50	3,79	3,75	3,60	3,77	3,61	3,36	2,51
Gliquidona	4,65	4,50	5,98	5,87	5,77	5,91	5,72	5,40	4,05
Glimepirid	4,70	3,50	5,65	5,60	5,51	5,57	5,36	5,14	3,52

B. valorile $\log K_{w,RP-LC}$ derivate prin extrapolarea retenției la 0% modificador organic în ecuația polinomială (2.4.4)

Compus	$\log K_{ow}$ teoretic (met. frag.)	$\log K_{ow}$ experimental	$\log K_{w,RP-LC}$ (metanol)	$\log K_{w,RP-LC}$ (etanol)	$\log K_{w,RP-LC}$ (1-propanol)	$\log K_{w,RP-LC}$ (2-propanol)	$\log K_{w,RP-LC}$ (1-butanol)	$\log K_{w,RP-LC}$ (1-pentanol)	$\log K_{w,RP-LC}$ (1-octanol)
Glibenclamid	4,79	4,70	2,66	2,62	2,57	2,63	2,59	2,47	2,24
Glibenclamid imp A	2,51	-	2,06	1,97	2,00	2,00	1,93	1,82	1,27
Glibenclamid imp B	3,10	-	2,37	2,27	2,31	2,32	2,24	2,10	1,47
Gliclazid	2,12	2,60	2,27	2,20	2,18	2,18	2,16	2,10	1,53
Gliclazid imp F	2,12	-	2,53	2,46	2,48	2,44	2,41	2,27	1,43
Glipizid	3,35	2,50	1,95	1,93	1,82	1,94	1,88	1,74	1,36
Gliquidona	4,65	4,50	3,16	3,13	3,09	3,14	3,08	2,95	2,44
Glimepirid	4,70	3,50	3,03	3,00	2,96	2,97	2,90	2,83	2,18

explicabilă având în vedere considerațiile făcute în paragraful următor care arată că modificatorii organici adăugați intră în competiție cu moleculele de analiți pentru adsorbția în faza staționară și că adsorbția acestor modificatori este cu atât mai puternică cu cât catena lor este mai lungă; efectul final fiind o retenție mai mică și implicit o valoare mai mică a constantei de repartiție între faza staționară și faza mobilă pentru analiții de separat ($\log K_{ow}^{RP-LC}$).

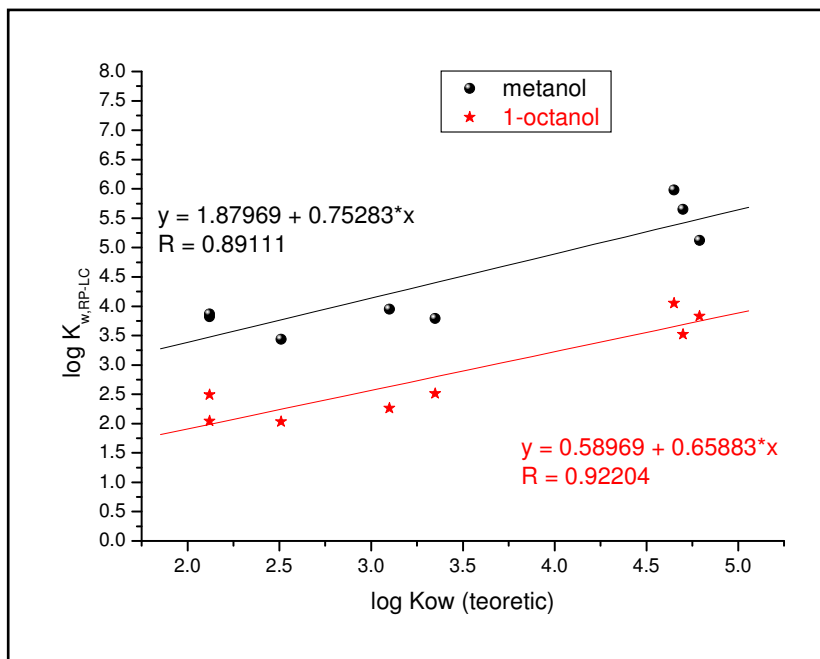


Fig 2.4.6. Corelația dintre valorile $\log K_{w,RP-LC}$ provenite din extrapolări în ecuația liniară (2.4.3) pentru metanol și 1-octanol și valorile $\log K_{ow}$ teoretice (obținute prin metoda fragmentelor) pentru cei 8 compuși model.

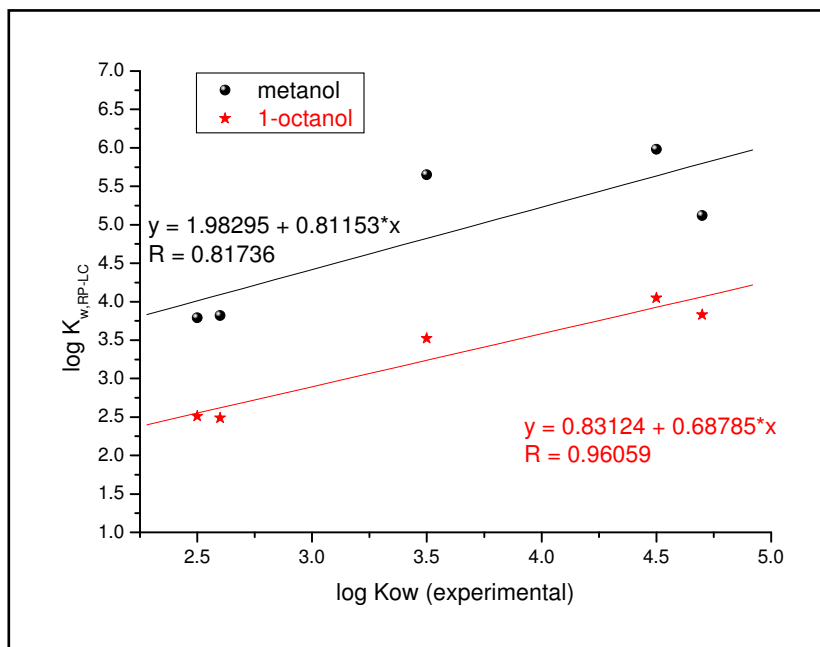


Fig 2.4.8. Corelația dintre valorile $\log K_{w,RP-LC}$ provenite din extrapolări în ecuația liniară (2.4.3) pentru metanol și 1-octanol și valorile $\log K_{ow}$ experimentale (obținute prin experimente 'shake-flask') pentru 5 din cei 8 compuși model (Glibenclamid, Glipizid, Gliclazid, Glimepirid și Gliquidonă).

Conform modelului partiției, adăugarea unor modificatori hidrofobi în faza mobilă ar trebui să genereze o creștere a retenției analiților în coloana cromatografică, deoarece acești aditivi s-ar reține în faza staționară ducând la creșterea volumului său și implicit a hidrofobității acesteia. Având în vedere că datele experimentale au arătat contrariul, pentru interpretarea mecanismului de retenție, a fost considerat modelul adsorbției – bazat pe ocuparea centrilor activi de adsorbție de către moleculele de modificatori hidrofobi. O discuție mai amplă asupra mecanismului de retenție a celor opt compuși model în contextul folosirii unor modificatori organici hidrofobi va fi făcută în paragrafele următoare.

2.4.3.4 Dependența dintre retenția analiților și hidrofobitatea modificatorilor organici hidrofobi

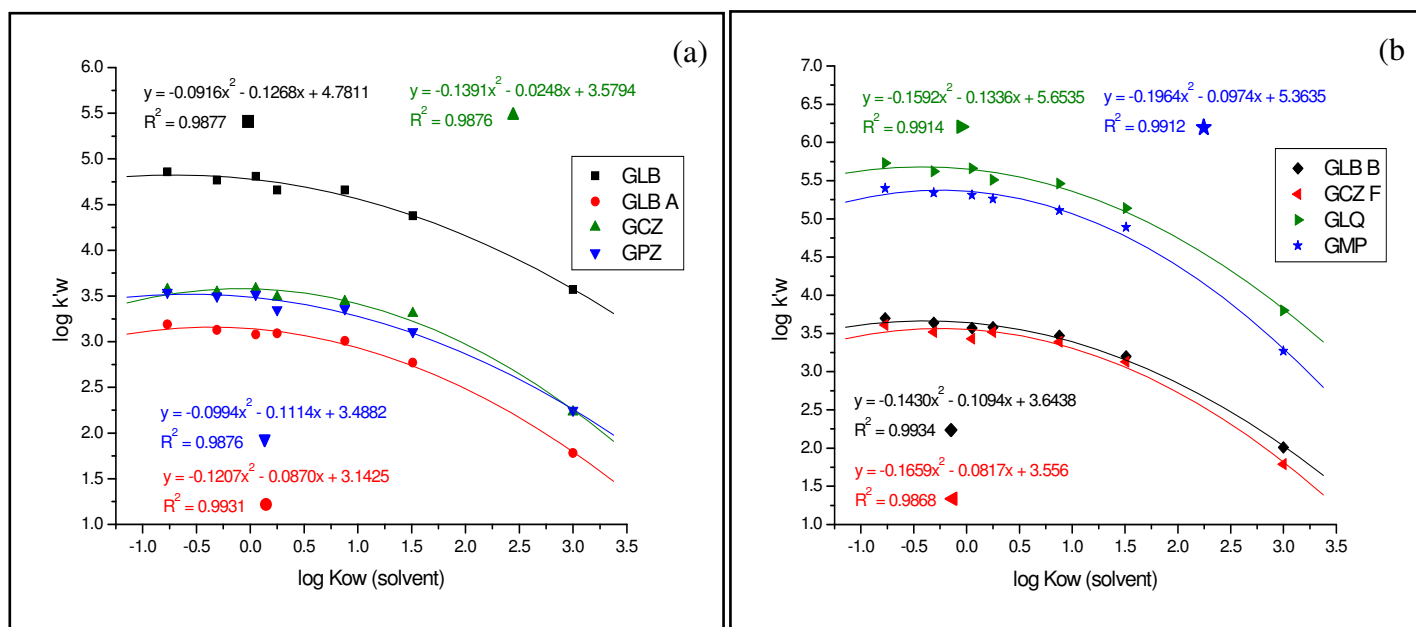


Fig 2.4.12. Corelația dintre valorile $\log k'_w$ obținute prin extrapolare în ecuația $\log k' = \alpha_0 + \alpha_1 \cdot C_o$ și valorile $\log K_{ow}$ experimentale pentru modificatorii organici hidrofobi folosiți ca aditivi ai fazei mobile. (a) compușii model Glibenclamid, Glibenclamid impuritate A, Gliclazid și Glipizid. (b) compușii model Glibenclamid impuritate B, Gliclazid impuritate F, Gliquidonă și Glimepirid.

Datele experimentale obținute prin extrapolare ($\log k'_w$) arată că retenția analiților scade cu creșterea indicelui de hidrofobitate al modificatorului organic folosit în faza mobilă ($\log K_{ow}^S$). Mai mult, se observă că cele două seturi de date se corelează după o dependență de tip polinomial pentru toți cei opt compuși model investigați. Aceste dependențe sunt prezentate în **Fig. 2.4.12 - 2.4.13**; valorile coeficienților de corelație obținuți (r^2) au fost, în medie, de 0,99 pentru datele derivate din ecuația liniară (2.4.3) și respectiv 0,98 pentru valorile $\log k'_w$ derivate prin extrapolare în ecuația de gradul II (2.4.4).

2.4.3.5 Modelul adsorbției competiționale analit – modificator organic hidrofob

Interpretarea comportamentului retenției celor opt compuși model în prezența unor alcooli superiori adăugați în cantități reduse în componenta organică a fazei mobile (metanol) se poate face dacă se consideră echilibrele competiționale care descriu adsorbția analitului (A) sau a solventului organic adăugat (S) pe suprafața fazei staționare reprezentată de lanțurile hidrofobe octadecil (L),

Aceste echilibrے sunt ilustrate în Fig. 2.4.14A. După cum a fost arătat în mai multe studii care tratau injecția unor volume mari de solvenți hidrofobi în RP-LC [124-126], modelul adsorbției explică mai bine, în acest caz, mecanismul retenției cromatografice decât modelul partiției.

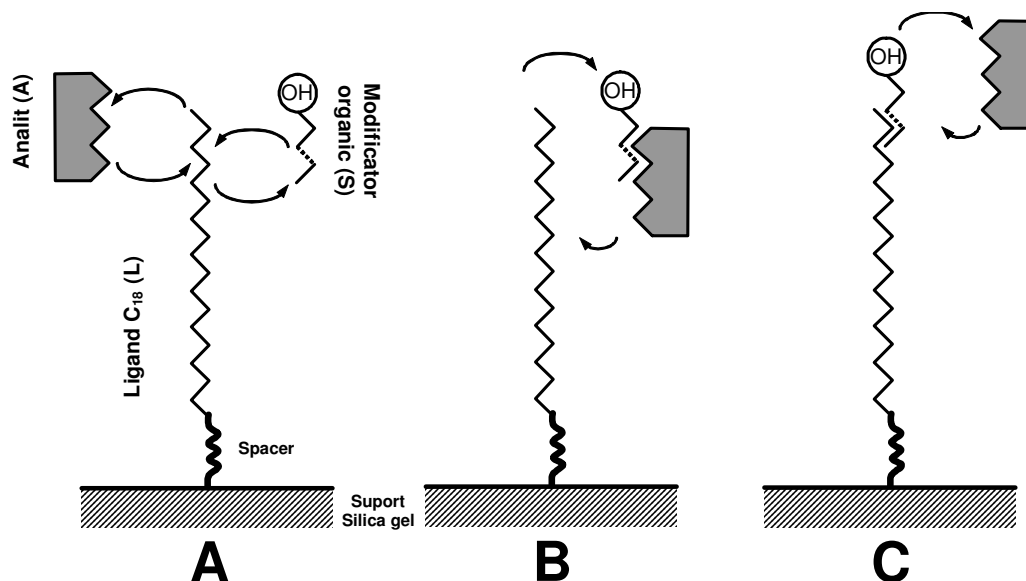


Fig 2.4.14. Interacții posibile între moleculele de analit și solvent pe de o parte și faza staționară pe de altă parte în procesul de retenție în RP-LC; A. Competiție între molecula de analit și solvent pentru adsorbția în faza staționară; B. Interacție predominantă a analitului cu molecula de solvent în faza mobilă ceea ce duce la reducerea retenției primului; C. ‘Saturarea’ fazei staționare cu molecule de solvent ceea ce duce la formarea unei faze staționare cu o polaritate mai mare (datorită orientării grupării hidroxil) și implicit la o reducere a retenției.

Un astfel de model competițional între adsorbția analiților și a modificatorilor organici hidrofobi adăugați la un nivel relativ redus de concentrație în faza mobilă va considera următoarele echilibrے, descrise cantitativ de constantele de echilibru aferente:

- pentru analit (A):



$$K_{LA} = \frac{[LA]_s}{[L]_s \cdot [A]_m} = \frac{[A]_s}{[L]_s \cdot [A]_m} = \frac{1}{[L]_s} \cdot \gamma_1 \cdot K_{ow}^A \quad (2.4.7)$$

- pentru aditivul hidrofob:



$$K_{LS} = \frac{[LS]_s}{[L]_s \cdot [S]_m} = \frac{[S]_s}{[L]_s \cdot [S]_m} = \frac{1}{[L]_s} \cdot \gamma_2 \cdot K_{ow}^S \quad (2.4.9)$$

unde raportul $[A]_s/[A]_m$ reprezintă distribuția analitului A între faza staționară și faza mobilă și care este proporțională cu constanta de distribuție apă : octanol, notată K_{ow}^A . Similar, se poate considera că raportul $[S]_s/[S]_m$ este proporțional cu K_{ow}^S și astfel constanta de echilibru K_{LS} este proporțională cu constanta de distribuție apă : octanol a solventului hidrofob (K_{ow}^S).

Prin înlocuirea $[L]_s$ din relația (2.4.9) în (2.4.7) se obține o expresie care corelează cele două constante de echilibru:

$$K_{LA} = \frac{K_{LA}}{\gamma_2 \cdot K_{ow}^S} \cdot \gamma_1 \cdot K_{ow}^A = \gamma \cdot \frac{K_{ow}^A}{K_{ow}^S} \quad (2.4.10)$$

unde γ este o constantă rezultată din raportul $K_{LA} \cdot \gamma_1 / \gamma_2$. Luând în considerare relația generală dintre factorul de capacitate și constanta de distribuție ($K_{LA} = k'_A \cdot V_{fm} / V_{fs}$), se obține o ecuație care descrie influența K_{ow}^A și K_{ow}^S asupra competiției adsorbției analitului și solventului în faza staționară:

$$k'_A = \gamma \cdot [L]_s \cdot \frac{V_{fs}}{V_{fm}} \cdot \frac{K_{ow}^A}{K_{ow}^S} \quad (2.4.11)$$

Deoarece concentrația liganzilor (L) este mult mai mare decât concentrația analitului și raportul V_{fs} / V_{fm} (Φ) este constant pentru o anumită coloană, rezultă în urma logaritmirii expresiei (2.4.11) o altă relație care descrie dependența procesului de retenție de indicii de hidrofobicitate ai analitului și solventului hidrofob (ψ reprezintă o constantă care depinde de γ , $[L]_s$ și de raportul V_{fs}/V_{fm}).

$$\log k'_A = \psi + \log K_{ow}^A - \log K_{ow}^S \quad (2.4.12)$$

Relația (2.4.12) arată că factorul de capacitate pentru fiecare compus model scade liniar cu creșterea hidrofobității solventului adăugat în faza mobilă ($\log K_{ow}^S$). Așa se poate explica și trendul observat în **Fig. 2.4.3. – 2.4.5** de scădere a pantei dependenței $\log k' - C_0$ atunci când se trece de la o componentă organică cu 100% metanol la una care conține 1-octanol. Din acest punct de vedere, saltul semnificativ de la 1-pentanol la 1-octanol se datorează diferenței mari între valorile indicilor de hidrofobicitate ($\log K_{ow}^S$) pentru cei doi solvenți (**Tabel 2.4.1**).

Reprezentarea grafică a valorilor factorului de capacitate în funcție de $\log K_{ow}$ (conform 2.4.12) duce la obținerea unor dependențe care se abat ușor de la liniaritate (**Fig. 2.4.12, 2.4.13**); datele respective pot fi corelate mult mai bine dacă se aplică o dependență polinomială de gradul II. Această abatere de la liniaritate poate fi explicată prin interferența altor procese de adsorbție (ilustrate în **Fig. 2.4.14B și C**).

De exemplu, dacă considerăm echilibrul (2.4.8) pentru mai multe molecule de solvent ($n > 1$) adsorbite pe suprafața unui singur lanț alchilic al fazei staționare (L), relațiile deduse anterior se vor schimba:



$$K_{LS_n} = \frac{[LS_n]_s}{[L]_s \cdot [S]_m^n} = \frac{[S]_s^n}{[L]_s \cdot [S]_m^n} = \frac{1}{[L]_s} \cdot \gamma_2 \cdot (K_{ow}^S)^n \quad (2.4.14)$$

din acest motiv în relația (2.4.12) termenul $\log K_{ow}^S$ nu va mai fi la puterea 1.

Un alt echilibru ce poate avea loc în timpul procesului de retenție ar putea fi dat de înlocuirea a $m < n$ molecule de solvent (S) adsorbite cu o moleculă de analit (A):



$$K_{LS_{n-m}A} = \frac{[LS_{n-m}A]_s \cdot [S]_m^m}{[LS_n]_s \cdot [A]_m} \quad (2.4.16)$$

După cum se poate observa în **Fig. 2.4.12 și 2.4.13** (în care graficele prezintă o abatere foarte mică de la liniaritate), ponderea echilibrelor (2.4.13) și (2.4.15) care dau dependențe polinomiale este mult mai mică decât cea a echilibrului (2.4.8) care dă o dependență liniară.

Prin urmare, în cele din urmă, este de așteptat să se obțină o relație generală care să conțină și un termen pătratic care să depindă de hidrofobicitatea solventului - $(\log K_{ow}^S)^2$.

$$\log k'_A = \psi + \log K_{ow}^A - \log K_{ow}^S - (\log K_{ow}^S)^2 \quad (2.4.17)$$

O altă explicație posibilă pentru scăderea drastică a retenției tuturor celor opt compuși model survenită în urma creșterii hidrofobității fazei mobile (prin aditivarea componentei organice

a fazei mobile, metanolul, cu o serie de alcooli cu catenă din ce în ce mai hidrofobă) ar putea fi dată și de alte tipuri de interacții decât cele descrise în **Fig 2.4.14A**. Astfel, dacă admitem că o parte din moleculele de solvent hidrofob nu se adsorb în faza staționară, ci rămân solubilizate în faza mobilă, este posibil ca preferința analiților pentru faza mobilă să fie mai mare tocmai datorită unor interacții de tip hidrofob apărute între moleculele analiților și ale solventilor hidrofobi în faza mobilă (**Fig. 2.4.14B**). De asemenea, dacă solventul folosit are un caracter hidrofob pronunțat (ca în cazul octanolului, de exemplu), și dacă concentrația în faza mobilă este suficient de mare, este posibil să se producă o ‘saturare’ a fazei staționare (**Fig. 2.4.14C**) ceea ce înseamnă formarea unei ‘noi’ faze staționare având un caracter polar dat de gruparea hidroxil. Probabil că, în practică, toate aceste fenomene apar, concomitent, într-o măsură mai mare sau mai mică în procesul de retenție, iar rezultatul final ce poate fi observat experimental (retenția cromatografică) este influențat de fiecare dintre ele.

2.4.4. Concluzii

În cromatografia de lichide în fază inversă există numeroase posibilități de a modifica retenția analiților și selectivitatea separării prin variația câtorva parametri cromatografici ca: natura fazei staționare, dimensiunea particulelor de fază staționară, lungimea coloanei, raportul componentă apoasă – componentă organică a fazei mobile, pH-ul și natura componentei apoase a fazei mobile, natura componentei organice a fazei mobile, temperatura la care se desfășoară separarea cromatografică, dar și adăugarea unor aditivi hidrofobi în componenta organică a fazei mobile. Asemenea aditivi pot fi de exemplu alcooli superiori cu catenă liniară (1-butanol, 1-pentanol, 1-octanol); adăugați în concentrație mică componentei organice a fazei mobile (de obicei metanolul) acești aditivi intervin într-un mod complex în mecanismul de retenție ducând la scăderea retenției și modificarea selectivității separării.

Extrapolarea retenției compușilor model pentru o fază mobilă ipotetică fără modificator organic ($C_0 = 0$) prin fiecare din cele două modele propuse ($\log k'_w$ sau k'_w) a condus la estimarea valorii indicelui de hidrofobicitate din date de retenție cromatografice. Valorile obținute în urma aplicării modelului liniar au fost mai mari decât valorile experimentale și teoretice atribuite compușilor studiați. Această diferență este normală, deoarece faza staționară octadecil este mai hidrofobă decât n-octanolul (folosit la determinarea experimentală a indicelui de hidrofobicitate) și, implicit, constanta de distribuție este mai mare în RP-LC pentru o asemenea fază staționară. Valorile $\log K_{ow}^{RP-LC}$ scad o dată cu adăugarea în faza mobilă a modificatorilor organici hidrofobi cu catenă din ce în ce mai lungă (în seria metanol, etanol, 2-propanol, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol și 1-octanol). Astfel, valorile $\log K_{w,RP-LC}$ extrapolate pentru 1-octanol sunt foarte apropiate de cele teoretice.

Adăugarea unor modificatori hidrofobi în componenta organică a fazei mobile conduce la scăderea retenției analiților în RP-LC. În acest caz apare o competiție pentru adsorbția în faza staționară a moleculelor de analit și a moleculelor de modificator organic. Adsorbția moleculelor de analit este cu atât mai defavorizată cu cât concentrația sau hidrofobicitatea modificatorului respectiv este mai mare. Admițând că nu toate moleculele de modificator se vor adsorbi în faza staționară, un proces complementar care poate apărea pe lângă adsorbția competitivă, este legat de posibilitatea interacției hidrofobe în faza mobilă dintre moleculele de analit și cele de modificator. Introducerea în faza mobilă, la o concentrație suficient de mare, a unui modificator organic cu un caracter hidrofob pronunțat (1-octanol, de exemplu) care se adsoarbe puternic în faza staționară, poate produce o ‘saturare’ a fazei staționare ceea ce presupune blocarea centrilor activi de adsorbție pentru moleculele de analit și implicit eluția rapidă din coloana cromatografică.

2.6. Termodinamica partiției în cromatografia de lichide în fază inversă

2.6.1. Problematika studiului

Studiul de față încearcă să stabilească o corelație în RP-LC între retenția cromatografică și temperatura la care se desfășoară separarea cromatografică, pentru soluții care prezintă grupări polare preponderent acide. Pe baza acestei corelații se va încerca estimarea parametrilor termodinamici implicați în procesul cromatografic (variația standard a entalpiei, variația standard a entropiei și respectiv variația standard a energiei libere Gibbs asociate distribuției soluțiilor între faza mobilă și faza staționară – ΔH^0 , ΔS^0 și ΔG^0). De asemenea, studiul își propune să arate dacă acești parametri termodinamici ai separării cromatografice sunt dependenți sau nu de debitul fazei mobile.

Practic, studiul termodinamic a constat în injecția unei soluții amestec din cei nouă compuși în condițiile modificării temperaturii la care a fost termostată coloana cromatografică pe intervalul 20 – 50°C, cu un increment de 5°C. Ulterior, pentru fiecare temperatură din domeniul studiat a fost variat și debitul fazei mobile prin coloana cromatografică în intervalul 0,6 – 2,0 mL/min. Astfel s-a obținut dependența retenției de temperatură pentru fiecare debit investigat și fiecare solut injectat.

2.6.2. Modelul teoretic aplicat

Variația temperaturii coloanei cromatografice a permis trasarea dependenței retenție – temperatură, exprimată ca logaritmul natural al factorului de capacitate ($\ln k'$) funcție de inversul temperaturii absolute ($1/T$). Pe baza dependenței funcționale între acești parametri au fost estimate entalpia și respectiv entropia liberă standard de distribuție a celor nouă soluții între faza mobilă și faza staționară folosind ecuația van't Hoff [67, 136]:

$$\ln k' = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} - \ln \Phi \quad (2.6.1)$$

$$\ln k' = B \frac{1}{T} + A \quad (2.6.2)$$

unde Φ este constanta constructivă a coloanei cromatografice (raportul dintre volumul de fază staționară și cel de fază mobilă din coloana cromatografică). După cum se poate observa din relația (2.6.2), ecuația van't Hoff reprezintă în fapt o dependență liniară a retenției, exprimată ca logaritmul natural al factorului de capacitate de inversul temperaturii absolute la care are loc separarea cromatografică. Pentru coloana Agilent Zorbax XDB-C18 s-a calculat constanta $\Phi = 0,856$; această valoare a fost determinată luând în considerare volumul interior al coloanei cu dimensiunile date (150 mm lungime și 4,6 mm diametru interior), în timp ce volumul fazei mobile a fost calculat prin medierea valorilor volumului mort al coloanei, obținute pentru fiecare debit în parte ($V_0 = F \times t_0$, unde t_0 este timpul mort al coloanei).

Conform celor două relații de mai sus, se observă că, folosind parametrii regresiei liniare corespunzătoare dependenței retenție – temperatură, se pot estima parametrii termodinamici ΔH^0 și ΔS^0 (entalpia și respectiv entropia liberă de distribuție a analiților între faza mobilă și cea staționară). Ulterior, pe baza acestora s-a putut calcula și energia liberă Gibbs de distribuție a analiților între cele două faze ($\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$).

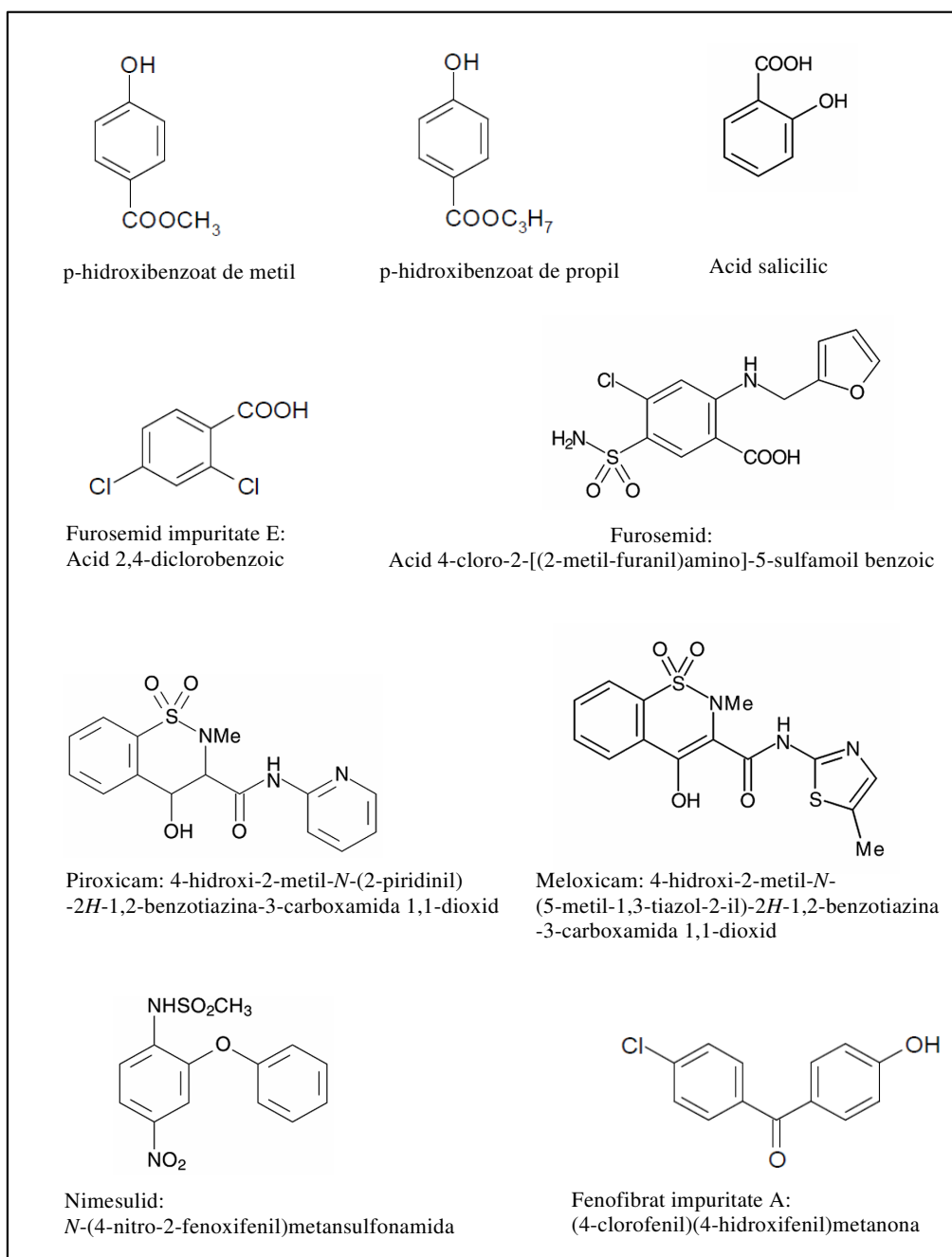


Fig. 2.6.1. Structurile moleculare și denumirile chimice și uzuale ale compușilor studiați.

2.6.5. Rezultate și discuții

Reprezentarea retenției funcție de temperatură (graficele van't Hoff) a condus la obținerea unor dependențe liniare cu coeficienți de corelație foarte buni ($r > 0,99$, vezi **Tabelul 2.6.9**). Această situație se regăsește pentru toți compușii model și pentru toate debitele, cu excepția Piroxicamului care prezintă valori ale coeficientului de corelație între 0,90 și 0,96. După cum era de așteptat, se poate observa analizând datele experimentale de retenție (k') din aceleași tabele cu date experimentale că factorul de capacitate nu variază cu debitul fazei mobile. Dependențe liniare ale graficelor van't Hoff arată că mecanismul de retenție nu se schimbă cu variația temperaturii în domeniul respectiv. Deoarece compușii model sunt compuși organici cu caracter atât hidrofob

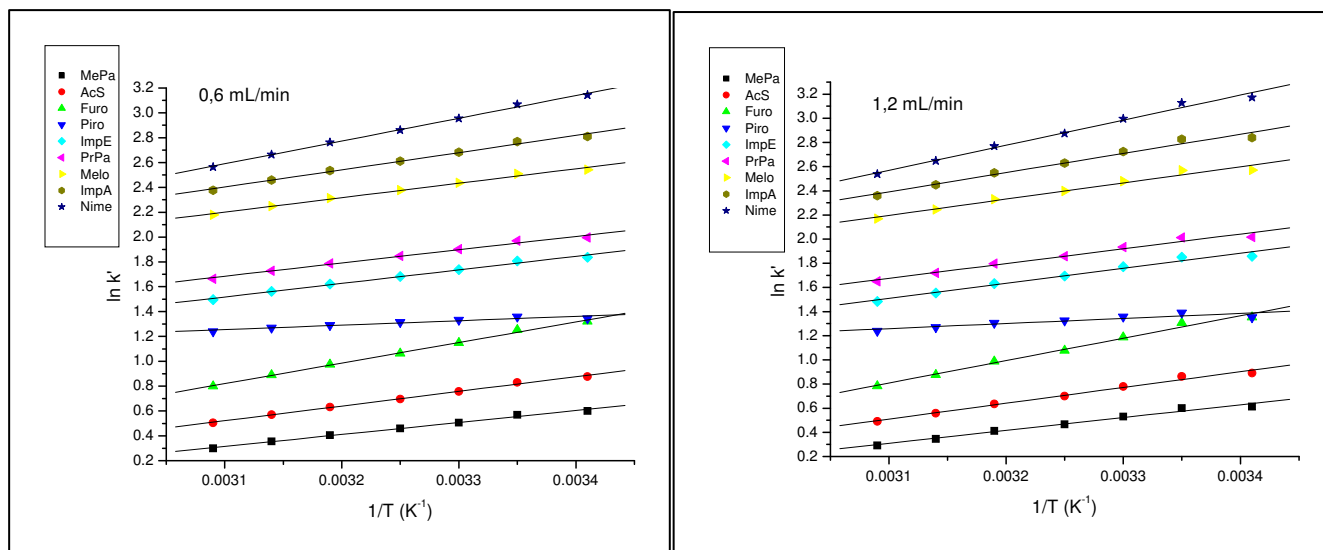


Fig. 2.6.11. Dependențele retenție – temperatură (van't Hoff) pentru cei nouă compuși model la debitele de 0,6 și 1,2 mL/min.

(dat de scheletul hidrocarbonat), cât și polar (dat de grupările hidroxil, carboxil, amidă sau sulfonamidă) și considerand afirmația anterioară, se poate spune că balanța dintre interacțiile de tip hidrofob și cele de tip polar ce au loc între solut, fază staționară și fază mobilă este constantă pentru domeniul studiat de temperatură.

În cazul Piroxicamului, se poate observa o abatere semnificativă de la liniaritate pentru toate debitele studiate, în special la temperatura de 20 și 25°C. Într-adevăr, excluderea punctelor de la 20 și 25°C pentru Piroxicam generează o dependență retenție – temperatură fără abateri de la liniaritate ($r > 0,99$). Aceste deviații de la liniaritate sunt mai bine observate în **Fig. 2.6.13** care prezintă comparativ dependențele van't Hoff ale Piroxicamului, Meloxicamului și Furosemidului la debitul de 1,8 mL/min. Analizând structura Piroxicamului se poate observa posibilitatea acestui compus de a se prezenta în mai multe forme tautomere. Aceasta ar putea fi o explicație a deviației de la liniaritate a Piroxicamului, deoarece echilibrele tautomere sunt adesea influențate de variația temperaturii. Formele tautomere propuse (**Fig. 2.6.14**) diferă între ele din punct de vedere al hidrofobicității, ceea ce conduce la o interacție diferită cu faza staționară respectiv cu faza mobilă. Acest lucru se poate traduce într-o retenție diferențiată a celor patru forme tautomere (fie ea și ne semnificativă). Astfel, la temperaturi diferite, Piroxicamul se prezintă sub forme tautomere diferite care pot avea, în esență, interacții mai puternice sau mai slabe cu faza staționară (funcție de polaritate). Acestea pot explica abaterile de la liniaritate observate experimental.

În cazul Piroxicamului, panta regresiei liniare este cea mai mică dintre toți compușii model având în medie o valoare de aproximativ 400, în timp ce ceilalți compuși au valori cuprinse între 1000 și 2000. Asta arată că pentru Piroxicam, o scădere a temperaturii de la 50 la 20°C, implică o creștere mult mai mică a retenției acestui compus în comparație cu ceilalți. O explicație pentru acest fapt ar putea fi o deplasare semnificativă a echilibrului tautomerice către formele mai polare (II și III) care ar trebui să fie mai puțin reținute de coloana cromatografică. Pe de altă parte, Meloxicamul, un compus cu o structură asemănătoare cu cea a Piroxicamului prezintă o dependență van't Hoff liniară cu coeficienți de corelație mult mai buni ($r > 0,99$), în ciuda faptului că prezintă același tautomerism ca și Piroxicamul.

Parametri regresiiilor liniare ai dependențelor retenție – temperatură (**Tabel 2.6.9**) au fost folosiți pentru estimarea entalpiei și a entropiei standard de distribuție a soluțiilor între faza mobilă și faza staționară pentru cei nouă compuși model și pentru toate debitele investigate (**Tabel 2.6.11 – 2.6.13**). Valorile obținute pentru acești parametri termodinamici au fost negative. O valoare negativă pentru variația entalpiei standard (ΔH^0) înseamnă că retenția solutului în cauză este

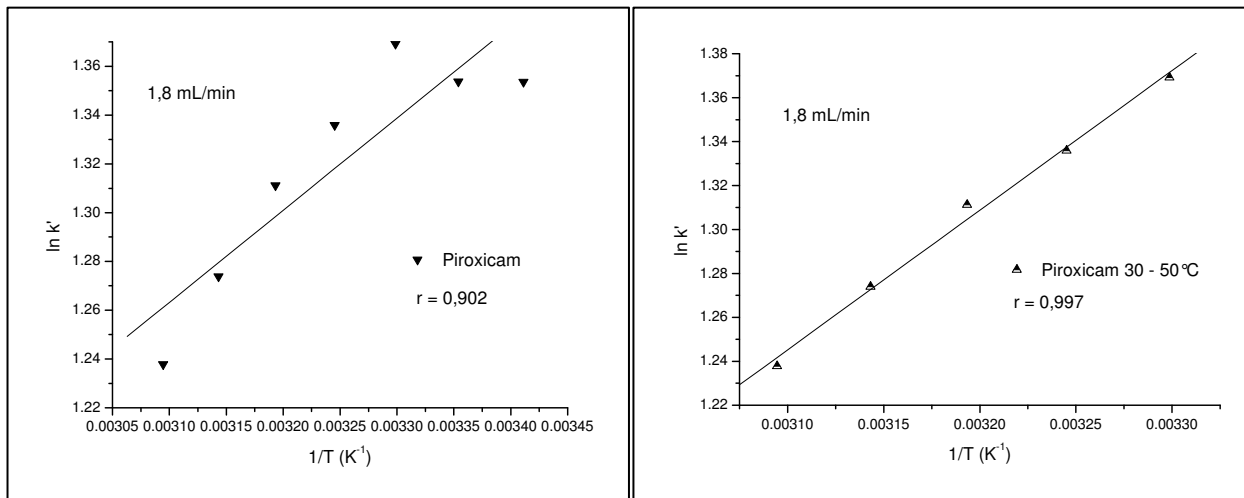


Fig. 2.6.13. Dependențele van't Hoff individuale pentru Piroxicam la 1,8 mL/min pe intervale diferite de temperatură.

favorizată energetic, în timp ce o valoare negativă a variației de entropie standard (ΔS^0) arată că retenția solutului în faza staționară generează o ordonare a sistemului ceea ce înseamnă că din punct de vedere entropic procesul de retenție este defavorizat. Ceea ce contează în final este balanța dintre entalpie și entropie, adică energia liberă Gibbs (ΔG^0). Dacă ΔG^0 este negativă, atunci solutul respectiv va fi distribuit preferențial în faza staționară, iar o valoare pozitivă sau foarte apropiată de 0 înseamnă că solutul respectiv nu are retenție pe coloana cromatografică. Valorile obținute pentru energia liberă Gibbs au fost, după cum era de așteptat, negative pentru toți compușii model, adică interacția cu faza staționară este mai puternică decât interacția cu faza mobilă. Se poate de asemenea observa că energia liberă Gibbs crește în valoare absolută de la p-hidroxi benzoat de metil la nimesulid adică crește în ordinea de eluție observată (conform binecunoscutei formule $\Delta G^0 = -RT \ln K$). Așadar, valori mai negative ale ΔG^0 înseamnă interacții mai puternice cu faza staționară. Cele mai apropiate valori ale energiei libere Gibbs s-au obținut pentru perechea critică Furosemid – Piroxicam (care prezintă cea mai mică rezoluție din cromatogramă, $R_s = 2 - 3$ la 25°C). Valorile mediate ale ΔG^0 pentru toate debitele studiate au fost de $-2,76 \times 10^3$ și respectiv $-3,29 \times 10^3$ J/mol, indicând diferențele mici de hidrofobicitate între acești compuși ($\log K_{ow} = 2,32$ pentru Furosemid și 2,58 pentru Piroxicam, metoda fragmentelor [97]).

Analizând datele experimentale obținute și reprezentările grafice ale parametrilor termodinamici în funcție de debitul fazei mobile, se poate observa că există o tendință de scădere a entalpiei și a entropiei de la 0,6 la 1,4 mL/min (la acest debit se atinge un minim pentru valorile acestor parametri), după care are loc o creștere moderată la 1,6 mL/min, și ulterior valorile entalpiei și entropiei rămân constante. Minimul atins la debitul de 1,4 mL/min de cei trei parametri termodinamici poate fi asociat cu debitul la care interacția soluțiilor cu faza staționară este maximă. Pentru majoritatea compusilor investigați, RSD-ul pentru variația entalpiei și entropiei cu debitul fazei mobile este situat între 3 și 5%, iar în cazul entropiei 4 – 10%, ceea ce arată o variație moderată. O excepție o reprezintă Piroxicamul, care are un RSD de 25% pentru entalpie și de 73% pentru entropie tocmai datorită motivelor expuse anterior.

Cât privește energia liberă Gibbs, se poate observa din **Tabelul 2.6.13** că valorile acestui parametru sunt negative pentru toți compușii model, ceea ce înseamnă că interacția cu faza staționară este mai puternică decât interacția cu faza mobilă. Se poate observa, totodată, că energia liberă Gibbs crește de la metil paraben la nimesulid, adică în ordinea de eluție cromatografică. Așadar, cu cât energia liberă Gibbs este mai negativă, cu atât este mai puternică interacția cu faza

staționară. Debitul fazei mobile nu influențează energia liberă Gibbs deoarece valorile RSD-ului calculat pentru variația în domeniul investigat (0,6 – 2,0 mL/min) se situează sub 2%, exceptând Piroxicamul care are un comportament aparte datorat tautomerismului ceto-enolic (27%).

Analizând dependența celor trei parametri termodinamici (ΔH^0 , ΔS^0 și ΔG^0) cu variația debitului fazei mobile (vezi graficele din **Fig. 2.6.15**) se poate concluziona că aceștia nu prezintă o dependență funcțională cu debitul și că variațiile respective pot fi considerate ne semnificative pentru toți soluții investigați, cu excepția Piroxicamului. Considerând modelul termodinamic aplicat (relațiile 2.6.1-2.6.2) se poate arăta că valoarea maximă negativă a entalpiei se obține atunci când panta graficului van't Hoff este maximă ($\Delta H^0 = -b/R$). La rândul său o pantă mare a dependenței van't Hoff este asociată cu un solut care prezintă o variație maximă a retenției pentru o anumită variație a temperaturii. Panta cea mai mare pentru toți compușii model a fost obținută la debitul de 1,4 mL/min. De cealaltă parte, valoarea maximă negativă a entropiei se obține pentru o ordonată la origine a graficului van't Hoff cât mai negativă ($\Delta S^0 = (a + \ln \Phi) \cdot R$). Conform datelor experimentale obținute trebuie menționat că pantele cele mai mari sunt asociate cu valori negative mari ale ordonatei la origine (**Tabel 2.6.9**) pentru compușii model. Acesta este motivul pentru asemănarea variației celor doi parametri termodinamici cu variația debitului.

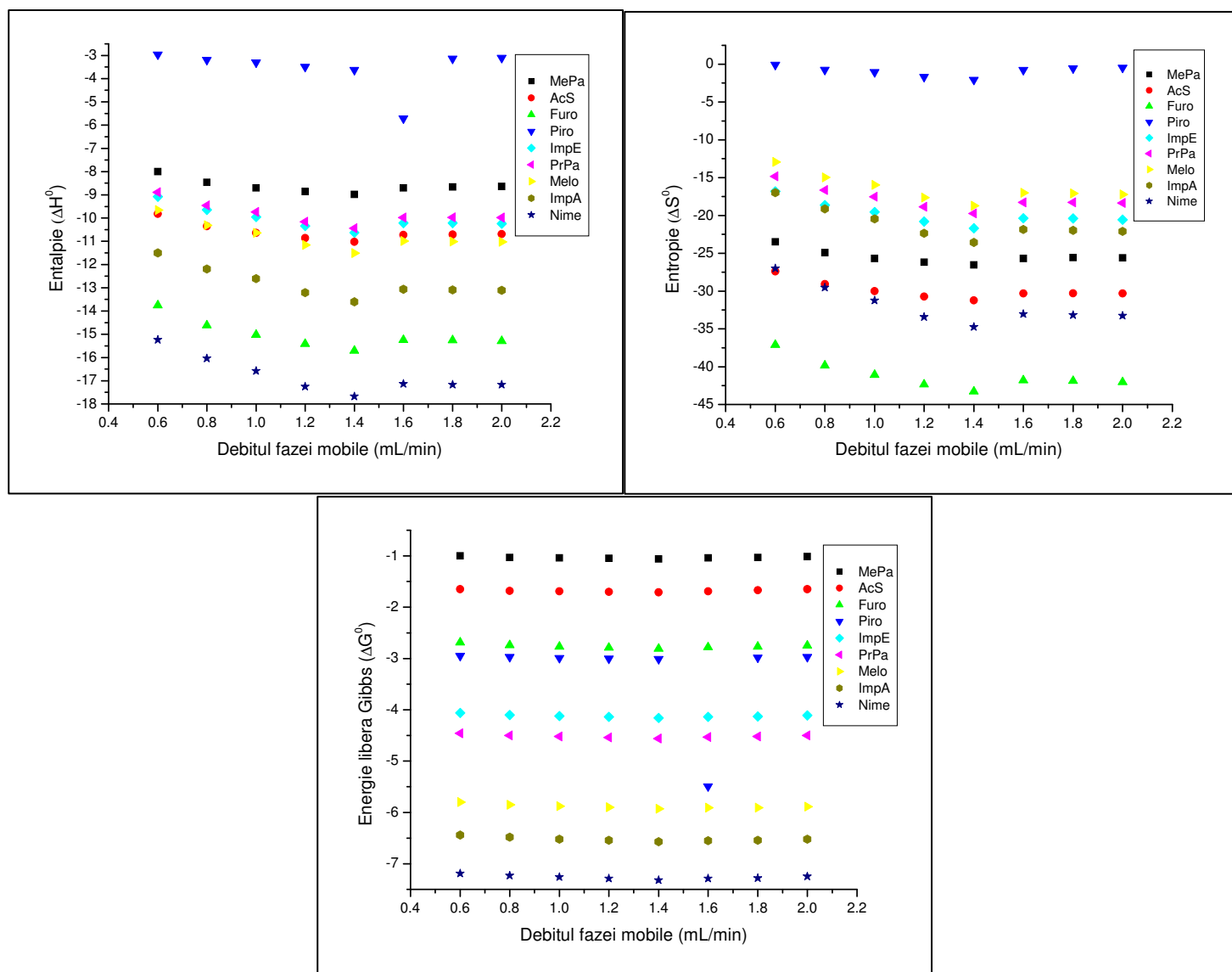


Fig. 2.6.15. Variația parametrilor termodinamici cu debitul fazei mobile în intervalul 0,6 -2,0 mL/min.

După cum era de așteptat, cele mai negative valori ale ordonatei la origine și implicit ale entropiei s-au obținut tot la debitul de 1,4 mL/min; același lucru poate fi observat și în cazul energiei libere Gibbs, valorile cele mai negative se obțin pentru debitul de 1,4 mL/min pentru toți compușii model.

În concluzie, interacția soluțiilor cu faza staționară este maximă la 1,4 mL/min; această observație este confirmată și de faptul că factorii de capacitate calculați la acest debit au valorile cele mai mari (conform expresiei, $\Delta G^0 = -RT \ln K$).

2.6.6. Concluzii

Dependențele retenție – temperatură pentru cei nouă compuși model sunt liniare având coeficienți de corelație mai mari de 0,99 la toate debitele investigate, cu excepția Piroxicamului ale cărui echilibre tautomere pot fi influențate de variația temperaturii (pentru acest compus, $r > 0,90$).

Pe baza modelului liniar van't Hoff, este posibilă predicția retenției la diferite temperaturi aflate înăuntrul sau înafara intervalului studiat de temperatură. Predicția retenției permite analistului să anticipeze eventualele schimbări ale ordinii de eluție sau coeluții ale analiților într-o separare RP-LC dată. O asemenea situație a fost observată în prezentul studiu pentru perechea critică Furosemid – Piroxicam a cărei rezoluție scade de la 50 la 20°C. La 25°C picurile sunt încă bine separate (rezoluție între 2 și 3 în funcție de debit); scăzând temperatura la 20°C are loc coeluția celor doi compuși. Mai mult, pe baza modelului van't Hoff s-a determinat temperatura la care se va produce inversarea ordinii de eluție (Piroxicam – Furosemid) cu o separare cel puțin la linia de bază între cele două picuri (15°C).

Nu în ultimul rând, modelul van't Hoff permite estimarea parametrilor terodinamici corespunzători transferului soluțiilor din faza mobilă în faza staționară și anume: variația standard (25°C) de entalpie, entropie și energie liberă Gibbs (ΔH^0 , ΔS^0 și ΔG^0). Variația standard a energiei libere Gibbs nu depinde de debitul fazei mobile, deoarece depinde de constanta de distribuție și implicit de factorul de capacitate, parametru cromatografic independent de debit. Experimental a fost confirmată această afirmație, valoarea RSD-ului calculat pentru ΔG^0 determinat pe baza dependențelor van't Hoff fiind maxim 2,1% pentru opt dintre compușii model.

Variația standard a entalpiei și entropiei pe de altă parte sunt ușor afectate de modificarea debitului fazei mobile. Valorile RSD% obținute pentru cei doi parametri se situează între 5 și 15%. Variația înregistrată este asemănătoare pentru cei doi parametri: se observă o scădere de la 0,6 la 1,4 mL/min (atingându-se valorile minime), apoi o creștere ușoară până la 1,6 mL/min, după care atât entalpia cât și entropia rămân aproape constante. Datorită faptului că variația descrisă este practic aceeași pentru cei doi parametri și datorită faptului că au contribuții de semn opus la energia liberă Gibbs ($\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$), se poate concluziona ușor de ce aceasta din urmă rămâne practic constantă indiferent de debitul fazei mobile.

2.7. Variația atipică a retenției cu temperatura în RP-LC. Modificarea structurii Drotaverinei cu temperatura coloanei cromatografice și pH-ul fazei mobile

2.7.1. Problematika studiului

Studiul de față analizează comportamentul atipic a câtorva compuși organici – Drotaverina și unele din impuritățile sale – în ceea ce privește retenția în cromatografia de lichide în fază inversă o dată cu modificarea temperaturii coloanei cromatografice în intervalul 15 – 40°C. În mod uzual, în RP-LC, creșterea temperaturii la care se desfășoară eluția cromatografică generează o scădere a retenției cromatografice pentru majoritatea analiților conform ecuației van't Hoff; această scădere poate fi explicată prin creșterea entropiei în faza mobilă față de faza staționară, ceea ce înseamnă o tendință din ce în ce mai pronunțată a moleculelor de solut de a se distribui preferențial în faza mobilă, dar și o creștere a solubilității analiților în faza mobilă [142].

Inițial, studiul experimental a constatat în injecția unei soluții concentrate de Drotaverină (1500 μg/mL) la diferite temperaturi ale coloanei cromatografice (15, 18, 20, 22, 25, 30 și 40°C) în condițiile metodei LC descrise în subcapitolul 2.7.2. La acest nivel de concentrație se observă și impuritățile Drotaverinei care nu au fost disponibile ca substanțe de referință. Din toate impuritățile observate în cromatograme s-au considerat pentru studiul de față doar cele care au prezentat interes din punct de vedere termodinamic (Impuritățile 1, 2, R1, 3, 4 și X). Dintre toți acești compuși se știu doar structurile Drotaverinei și ale impurităților 1, 2 și R1. Impuritățile 3, 4 și X care au un comportament similar cu cel al Drotaverinei sunt necunoscute ca structură, ele fiind denumite arbitrar. În schimb, impuritățile 1, 2 și R1 au un comportament normal al retenției în funcție de temperatură (respectă legea van't Hoff) și au fost considerate în acest studiu tocmai pentru a stabili relația dintre structură - retenție - temperatură. Structurile cunoscute ale compușilor menționați anterior sunt date în Fig. 2.7.1. Din acest motiv, studiul termodinamic cu eluție izocratică la pH 4,5 s-a efectuat și la pH 9, valoare la care Drotaverina ($pK_a = 7,4$) ar trebui să fie în majoritate neprotonată (studiul la pH bazic a fost efectuat pe o altă coloană cromatografică care rezistă la acest pH, dar având același tip de fază staționară – octadecil silicagel). Într-adevăr, datele experimentale au arătat că la pH 9,0 creșterea temperaturii nu a mai generat creșterea retenției cromatografice, ci dimpotrivă scăderea acesteia conform legii van't Hoff.

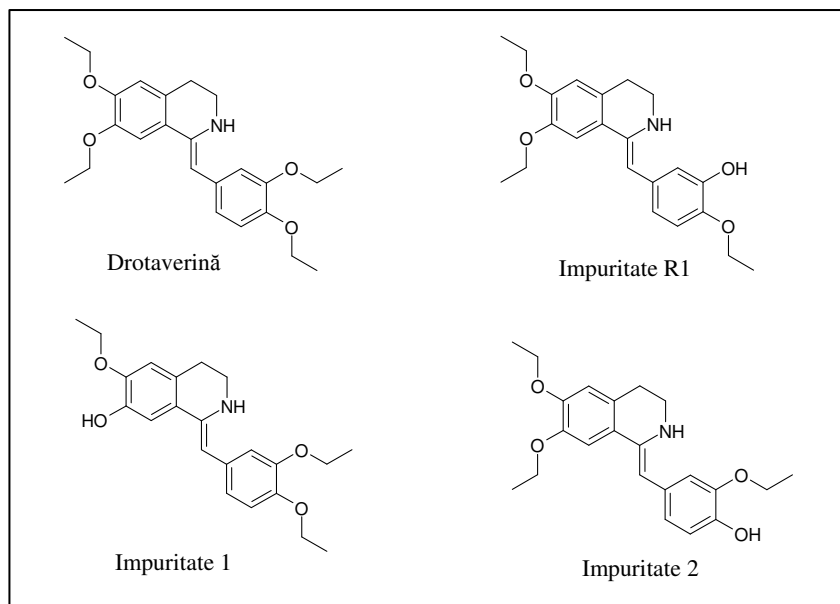


Fig. 2.7.1. Structurile moleculare ale compușilor Drotaverină, Drotaverină Impuritate 1, Drotaverină Impuritate 2 și Drotaverină Impuritate R1.

2.7.3. Rezultate și discuții

În timpul dezvoltării și optimizării unei metode RP-LC pentru determinarea Drotaverinei și a impurităților înrudite, din formulări farmaceutice de tip comprimate neacoperite cu eliberare imediată, a fost observat un comportament atipic al retenției Drotaverinei și a câtorva din impuritățile sale cu variația temperaturii la care se desfășoară separarea cromatografică; astfel, creșterea temperaturii la care a fost termostată coloana cromatografică în intervalul 15 – 40°C a generat creșterea ușoară a retenției, contrar cu legea van't Hoff. Același comportament a fost înregistrat și pentru alte trei impurități necunoscute ale Drotaverinei (denumite arbitrar Impuritate 3, Impuritate 4 și respectiv Impuritate X), în timp ce pentru alte trei impurități ale căror structuri sunt cunoscute (Impuritate 1, Impuritate 2 și Impuritate R1) retenția a scăzut liniar cu creșterea temperaturii pe același interval și în aceleași condiții de eluție (**Fig. 2.7.3**). Pentru a clarifica acest comportament termodinamic atipic pentru cromatografia de lichide s-a efectuat un studiu de retenție al Drotaverinei pe un interval extins de temperatură (10 – 60°C), în regim izocratic, atât la pH-ul slab acid al metodei inițiale (4,5), cât și la un pH bazic (9,0) peste valoarea pK_b a Drotaverinei, pentru a putea stabili influența gradului de protonare al moleculei asupra comportamentului termodinamic descris anterior.

Studiul izocratic efectuat la pH 4,5 pe intervalul de temperatură 10 – 60°C a arătat un comportament similar al retenției Drotaverinei cu temperatura cu studiul efectuat în gradient. S-a observat creșterea ușoară a retenției cu creșterea temperaturii între 10 și 40°C, după care în intervalul 40 – 60°C s-a înregistrat o scădere a retenției (**Fig. 2.7.5**).

Contrar cu primele două, cel de-al treilea studiu termodinamic efectuat la pH 9,0 a arătat o variație normală a retenției Drotaverinei cu temperatura (o scădere liniară cu creșterea temperaturii) care respectă ecuația van't Hoff (**Fig. 2.7.5**).

Datele de retenție cromatografică obținute în cadrul celor trei studii au fost reprezentate în funcție de temperatura coloanei cromatografice sub forma dependențelor van't Hoff ($\ln k'$ versus $1/T$) și sunt prezentate în **Fig. 2.7.3 - 2.7.5**.

Datorită caracterului bazic dat de gruparea amino secundară din molecula Drotaverinei ($pK_a = 7,4$), în condițiile acide ale fazei mobile din cadrul studiului 2 (tampon format de amoniu pH 4,5), acest compus se află în stare protonată în proporție de aproximativ 99,9% și de 0,1% în stare neprotonată. La pH 9 (studiu 3) situația se inversează: Drotaverina este protonată în proporție de 2,4%, iar restul de 97,6% se află în stare neprotonată, după cum se poate observa în **Fig. 2.7.2** care arată distribuția celor două specii ale Drotaverinei la diferite pH-uri în intervalul 4 – 10. Așadar se poate concluziona că comportamentul atipic al retenției Drotaverinei cu temperatura, înregistrat la pH 4,5 poate fi corelat cu protonarea cvasitotală a acestui compus, spre deosebire de pH-ul 9 la care comportamentul retenției cu temperatura respectă teoria. Însă doar protonarea unui compus bazic nu poate justifica un asemenea comportament atipic. O explicație mai plauzibilă ar putea fi o schimbare structurală în molecula Drotaverinei cauzată de echilibre între mai multe forme tautomere care să aibă hidrofobicități net diferite. Variația temperaturii poate deplasa echilibrul tautomer înspre una din formele tautomere. Dacă creșterea temperaturii ar favoriza deplasarea echilibrului către forma tautomeră cu hidrofobicitate mai mare, atunci, în loc să se observe o scădere a retenției cromatografice cu creșterea temperaturii s-ar observa o scădere a acesteia.

În **Fig. 2.7.8** sunt reprezentate formele tautomere ale Drotaverinei protonate. Pentru cele trei forme tautomere a fost calculat coeficientul de distribuție apă : octanol ($\log D$) ca indicator al hidrofobicității. După cum se poate observa, forma tautomeră (b) de tip imină este cea mai hidrofobă având $\log D = 2,71$ aproape dublu față de forma tautomeră (a) cu legătura dublă pe carbon (enamină). Astfel deplasarea echilibrului tautomer către formarea iminei (b) o dată cu creșterea temperaturii pe intervalul 10 – 40°C poate explica creșterea retenției în acest interval de temperatură. Scăderea retenției în intervalul de temperatură 40 – 60°C ar putea fi explicată de

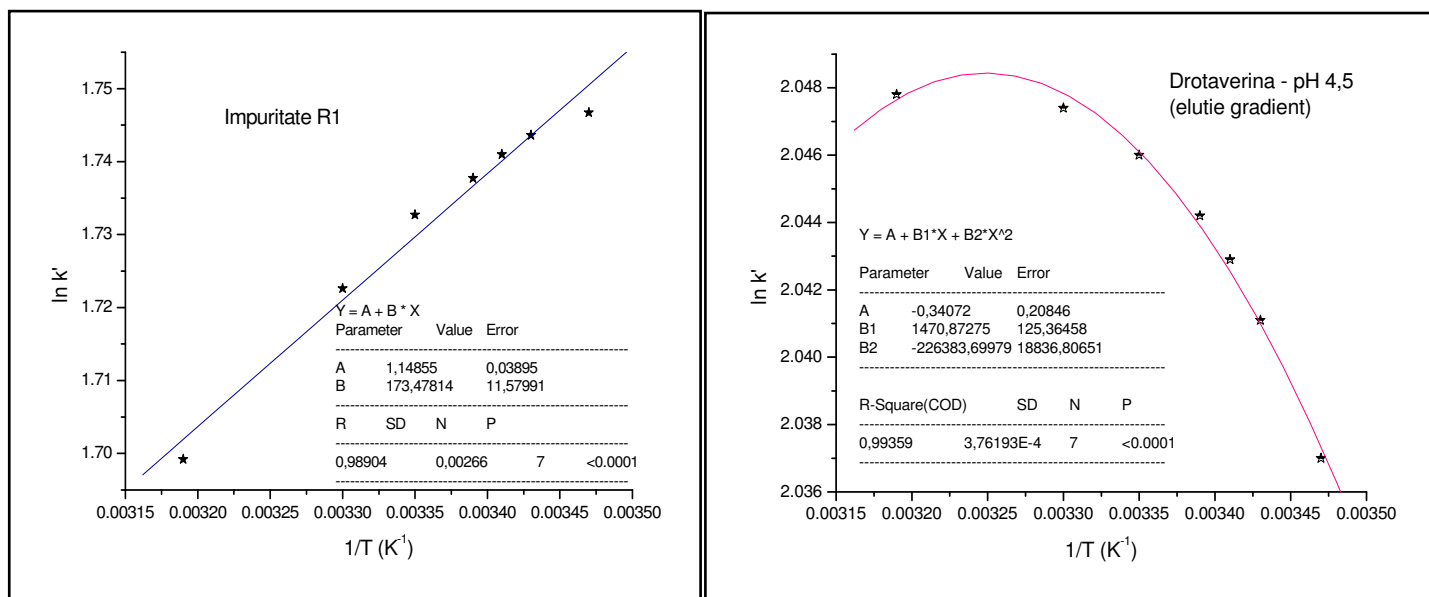


Fig. 2.7.3. Dependențele retenție – temperatură ($\ln k' - 1/T$) pentru compușii Impuritate R1 și Drotaverina (studiu 1 – gradient, pH 4,5).

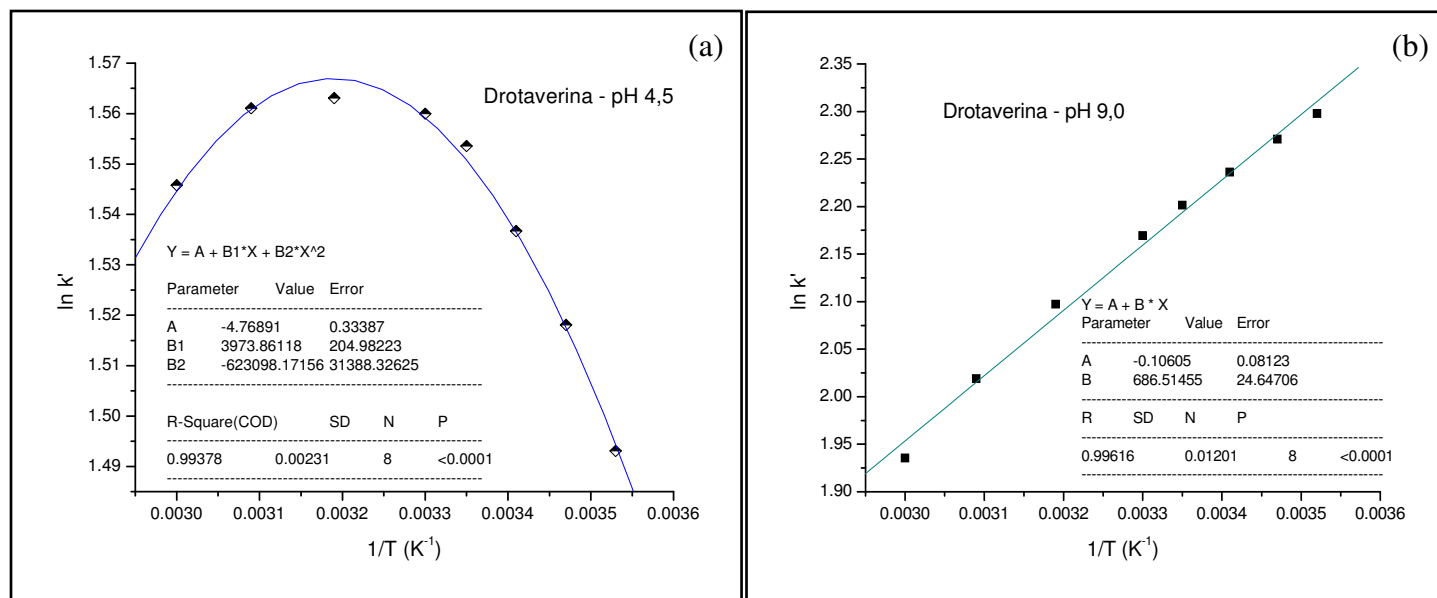


Fig. 2.7.5. Dependența retenție – temperatură ($\ln k' - 1/T$) pentru Drotaverină în condiții izocratice pe intervalul 10 – 60°C. (a) pH fază mobilă 4,5 – Drotaverina parțial protonată (studiu 2). Se observă creșterea retenției Drotaverinei de la 10 la 40°C urmată de o scădere a retenției de la 40 la 60°C (b) pH fază mobilă 9,0 – Drotaverina majoritar neprotonată (studiu 3). Se observă scăderea retenției Drotaverinei cu creșterea temperaturii pe tot intervalul studiat conform ecuației van't Hoff.

deplasarea echilibrului tautomer către formarea majoritară a tautomerilor (a) sau (c) cu hidrofobicitate mai mică ($\log D = 1,46$ și respectiv 0,60).

Pe de altă parte, însă, tautomerismul discutat anterior poate avea loc și în condițiile în care Drotaverina nu este protonată, cum este cazul studiului termodinamic 3 efectuat la pH 9 (Fig. 2.7.5

b), cu posibilitatea existenței aceluiași trei forme tautomere, dar neprotonate. Dar, în acest caz, retenția Drotaverinei a scăzut linear cu creșterea temperaturii pe întreg intervalul investigat de temperatură (10 – 60°C). Două explicații pot fi emise: fie faptul că în condiții bazice echilibrul tautomic nu mai este deplasat către formarea iminei o dată cu creșterea temperaturii, fie diferența de hidrofobicitate dintre cele două forme nu este la fel de mare ca la pH 4,5. **Fig. 2.7.9** prezintă calculul valorilor log D (Marvin, ChemAxon) pentru cele două forme tautomere ale Drotaverinei la ambele pH-uri discutate, dar și dependența acestui parametru de hidrofobicitate de pH. Într-adevăr, se observă că la pH 9 forma tautomeră imină (b) are o valoare log D doar cu 6% mai mare decât forma enamină (a), în timp ce la pH 4,5, forma tautomeră imină are o valoare log D semnificativ mai mare decât cea a formei tautomere enamină (86%).

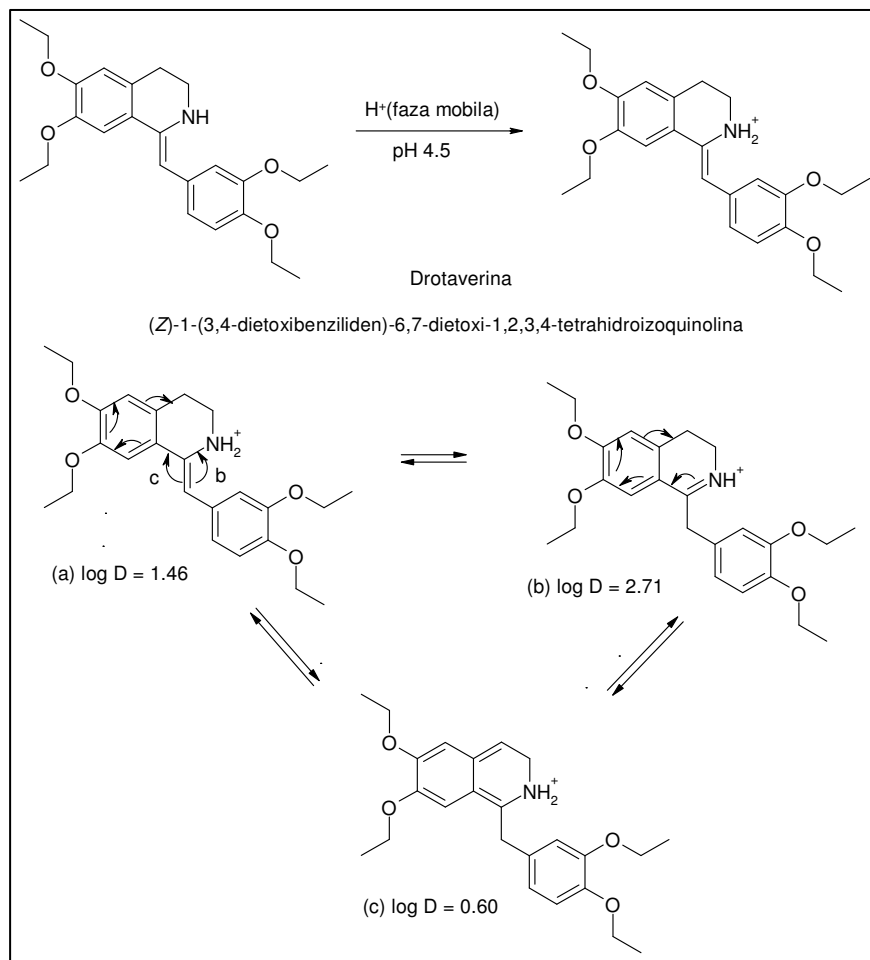


Fig. 2.7.8. Formele tautomere ale Drotaverinei în condițiile unei faze mobile acide (pH 4,5). Cele trei forme tautomere au hidrofobități radical diferite, forma tautomeră (b) fiind cea mai hidrofobă (log D reprezintă coeficientul de distribuție apă : octanol și indică hidrofobicitatea compușilor organici ținând seama de pH-ul mediului și de aciditatea / bazicitatea moleculelor respective) [83]. Valorile log D (pH 4,5) au fost calculate cu ajutorul software-ului Marvin versiunea 5.2 (ChemAxon, Ungaria [143]).

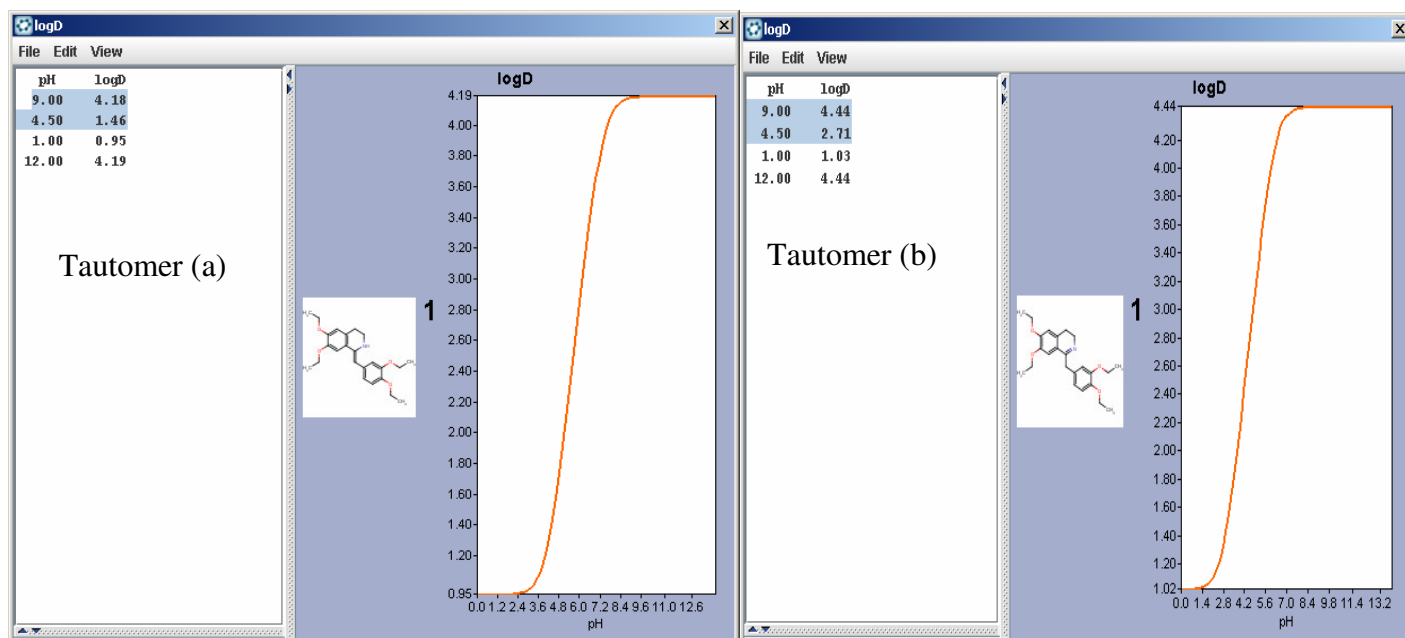


Fig. 2.7.9. Calculul log D pentru formele tautomere (a) și (b) ale Drotaverinei la pH 9,0 și la pH 4,5 și dependența log D pe tot domeniul de pH (Marvin, ChemAxon [143]).

2.7.4. Concluzii

Comportamentul atipic al retenției Drotaverinei înregistrat cu creșterea temperaturii coloanei cromatografice pe intervalul 10 – 40°C și la pH 4,5 poate fi explicat prin deplasarea echilibrului tautomic către formarea unei specii de tip imină având o hidrofobicitate ($\log D_{\text{pH } 4,5}$) mult mai mare; valoarea log D a formei tautomere imină este aproape dublă față de cea a formei tautomere enamină. La temperaturi mai mari de 40°C însă, retenția Drotaverinei începe să scadă ușor cu creșterea temperaturii (40 – 60°C) după cum prevede teoria cromatografică ($\Delta G^0 = -RT \ln K$), lucru care presupune deplasarea echilibrului tautomic către forma tautomeră enamină.

Refacerea studiului termodinamic pe același interval de temperatură, dar la pH 9, nu a mai produs aceeași dependență a retenției Drotaverinei de temperatură. Astfel, s-a observat o scădere liniară a retenției pe tot intervalul de temperatură (10 – 60°C) care respectă ecuația van't Hoff. Calculul hidrofobității celor două forme tautomere la pH 9 a arătat că diferența de hidrofobicitate între ele este mult mai mică decât la pH 4,5. De aceea, eventuala deplasare a echilibrului tautomic înspre forma imină, mai hidrofobă, nu va genera creșterea retenției cu creșterea temperaturii.

Diferențele structurale dintre Drotaverină și impuritățile sale stau la baza diferenței între comportamentul retenției acestor compuși. Astfel, spre deosebire de Drotaverină, Impuritățile 1, 2 și R1 prezintă o scădere a retenției cu creșterea temperaturii la pH 4,5. Formele tautomere ce apar în urma conjugării p – π dintre gruparea hidroxil și ciclul aromatic din molecula acestor impurități au valori log D apropiate sau chiar mai mici decât valoarea log D corespunzătoare structurii de bază a acestor compuși.

Concluzii finale

În cadrul prezentei teze de doctorat s-a încercat stabilirea influenței hidrofobității, pH-ului și temperaturii asupra mecanismului de retenție în cromatografia de lichide în fază inversă. De asemenea, pe baza modelelor partiției și adsorbției folosite în mod uzual pentru explicarea retenției în RP-LC, au fost estimați o serie de parametri extra-analitici din studii de retenție cromatografică, ca de exemplu: indicii de hidrofobitate ($\log K_{ow}$), constanta de aciditate (pK_a), parametrii termodinamici ai separării (ΔH^0 , ΔS^0 , ΔG^0) pentru diverși compuși organici de importanță farmaceutică.

Astfel, principalele contribuții ale tezei se pot sumariza în următoarele paragrafe:

- Estimarea indicelui de hidrofobitate ($\log K_{ow}$) cu ajutorul RP-LC pentru o serie de compuși organici de tip fenolic, prin aplicarea modelului partiției pentru explicarea mecanismului de retenție. Valorile indicelui de hidrofobitate obținute din RP-LC sunt apropiate de valorile teoretice (metoda fragmentelor moleculare) sau experimentale (sistemul de partiție apă : octanol) ale acestui parametru în special pentru molecule simple. Stabilirea dependenței retenție – concentrație de modificador organic în faza mobilă ($k' - C_m$), folosită la estimarea indicelui de hidrofobitate, permite totodată predicția retenției analiților și a selectivității separării cromatografice pe întreg domeniul de compoziții al fazei mobile.
- Stabilirea influenței hidrofobității fazei staționare asupra indicelui de hidrofobitate determinat din date de retenție cromatografică: cu cât hidrofobitatea fazei staționare este mai mare, cu atât valorile obținute pentru acest parametru sunt mai mari.
- Explicarea influenței pH-ului fazei mobile și a caracterului acido-bazic al analiților asupra retenției și selectivității în RP-LC pe baza considerării modelului partiției, pentru diferite tipuri de analiți cu caracter acid sau bazic în cadrul unor studii de retenție cu pH-ul independente sau în cadrul evaluării robusteții unor metode LC.
- Introducerea conceptului de adsorbție competițională între analit și modificadorul hidrofoab din faza mobilă, în faza staționară. Aplicarea modelului adsorbției explică influența hidrofobității modificadorului organic asupra retenției în RP-LC. Estimarea indicelui de hidrofobitate prin RP-LC folosind faze mobile cu adaos de modificali hidrofoabi cu catenă lungă duce la obținerea unei concordanțe mult mai bune cu valorile teoretice (metoda fragmentelor moleculare) sau cu cele experimentale (metoda shake-flask).
- Influența temperaturii asupra mecanismului de retenție în RP-LC exemplificată pentru o serie de compuși organici cu funcțiuni polare având caracter acid. Estimarea parametrilor termodinamici ai separării cromatografice (ΔH^0 , ΔS^0 și ΔG^0) pe baza dependențelor retenție – temperatură (van't Hoff) pentru acești compuși. Evaluarea influenței debitului fazei mobile asupra variației standard de entropie, entalpie și respectiv energie liberă Gibbs de transfer a analiților între faza mobilă și faza staționară.
- Explicarea variației atipice a retenției cu temperatura în RP-LC pentru Drotaverină. Deplasarea echilibrului tautomic către o formă tautomeră mult mai hidrofoabă - o dată cu creșterea temperaturii - generează creșterea retenției cromatografice contrar cu ecuația van't Hoff.

Bibliografie selectivă

1. T.Galaon, S.Udrescu, I.Sora, V.David, A.Medvedovici, High-throughput liquid-chromatography method with fluorescence detection for reciprocal determination of furosemide or norfloxacin in human plasma, *Biomed. Chrom.*, **2007**, 21(1), 40.
2. V.David, A.Medvedovici, Partition model applied to the retention process of basic analytes in reversed-phase and ion-pairing liquid chromatography, *Rev. Roum. Chim.*, **2005**, 50(9-10), 837.
3. T.Galaon, A.Medvedovici, V.David, Hydrophobicity parameter (log Kow) estimation for some phenolic compounds of pharmaceutical interest from retention studies with mobile phase composition in RP-LC, *Sep. Sci. Tech.*, **2008**, 43(1), 147.
4. A.Medvedovici, F.Albu, C.Georgita, D.I.Sora, T.Galaon, S.Udrescu, V.David, Achiral – chiral LC/LC – FLD coupling for determination of carvedilol in plasma samples for bioequivalence purposes, *J. Chromatogr. B*, **2007**, 850(1-2), 327.
5. V.David, T.Galaon, E.Caiali, A.Medvedovici, Competitional hydrophobicity driven separations under RP-LC mechanism: application to sulphonylurea congeners, *J. Sep. Sci.*, **2009**, 32(18), 3099.
6. M.Ionescu, T.Galaon, V.David, A.Medvedovici, Determination of glybenclamide in human plasma by high-performance liquid chromatography and diode-array detector, *Rev. Roum. Chim.*, **2004**, 49(3-4), 351.
7. A.Medvedovici, V.David, V.David, C.Georgita, Retention phenomena induced by large volume injection of organic solvents non-miscible with mobile phase in reversed-phase liquid chromatography, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, **2007**, 30, 199.
8. S.Udrescu, A.Medvedovici, V.David, Effect of large volume injection of hydrophobic solvents on the retention of less hydrophobic pharmaceutical solutes in RP-LC, *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31(16-17), 2939.
9. V.David, F.Albu, A.Medvedovici, Retention behavior of metformin and related impurities in ion-pairing liquid chromatography, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, **2005**, 28(1), 83.
10. C.Georgiță, F.Albu, V.David, A.Medvedovici, Simultaneous assay of metformin and glibenclamide in human plasma based on extraction-less sample preparation procedure and LC/(APCI)MS, *J. Chromatogr. B (Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences)*, **2007**, 854, 211.
11. T.Galaon, F.Tache, V.David, Retention behaviour of two biguanidines in liquid chromatography based on cyano stationary phase, *Rev. Roum. Chim.*, **2009**, 54(5), 359.
12. I.Sora, T.Galaon, V.David, A.Medvedovici, Determination of nimesulide and its active metabolite in plasma samples based on solvent deproteinization and HPLC - DAD analysis, *Rev. Roum. de Chim*, **2007**, 52(5), 501.
13. V.David, F.Albu, A.Medvedovici, Retention-structure correlation of some oxicam drugs in reversed-phase liquid chromatography, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, **2004**, 27(6), 965.
14. I.Sora, T.Galaon, S.Udrescu, J.Negru, V.David, A.Medvedovici, Fast RPLC-UV method on short sub-two microns particles packed column for the assay of tenoxicam in plasma samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2007**, 43(4), 1437.