

**UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE
ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN CHIMIE**

TEZĂ DE DOCTORAT

**STUDII COMPARATIVE DE RETENȚIE A COMPUȘILOR
POLARI PRIN EXTRACȚIE ÎN FAZĂ SOLIDĂ ȘI
CROMATOGRAFIE DE LICHIDE**

Doctorand:

Bacalum Elena

Conducător doctorat:

Prof. Dr. Victor David

Comisia de doctorat:

Președinte: Prof. Dr. Camelia Bala, Directorul Școlii Doctorale în Chimie,
Universitatea din București

Conducător doctorat: Prof. Dr. Victor David

Referenți oficiali:

1. Prof. Dr. Andrei Medvedovici, de la Universitatea din București
2. Prof. Dr. Ion Ion, de la Universitatea Politehnica din București
3. Conf. Dr. Costel Sârbu, de la Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca

CUPRINS

CAPITOLUL I. ASPECTE TEORETICE ȘI PRACTICE REFERITOARE LA EXTRACȚIA ÎN FAZĂ SOLIDĂ.....	4
I.1. Istoric și importanța tehnicii.....	4
I.2. Adsorbanți utilizați în SPE.....	7
I.3. Caracteristici ale adsorbanților utilizați în SPE.....	22
I.4. Parametrii curbei de eluție SPE.....	24
I.5. Mecanisme de retenție în SPE.....	32
I.6. Modelarea retenției în cromatografia de lichide în fază inversă.....	36
I.7. Compararea retenției în extracția în fază solidă și cromatografia de lichide.....	43
I.8. Hidrofobicitatea/hidrofilicitatea analiților.....	47
CAPITOL II. PARTEA EXPERIMENTALĂ.....	53
II.1. Studiul retenției SPE a unor compuși polari în varianta off-line manual.....	53
II.1.1. Problematika studiului.....	53
II.1.2. Condiții experimentale.....	54
II.1.3. Rezultate și discuții.....	56
II.1.3.1. Studiul influenței masei adsorbantului asupra retenției în SPE.....	58
II.1.3.2. Modelarea matematică a curbelor de eluție prin funcția Boltzmann.....	65
II.1.3.3. Studiul influenței pH-ului asupra retenției în SPE.....	69
II.1.3.4. Studiul extracției în fază solidă prin mecanism cu formare de perechi ionice.....	70
II.1.3.5. Procedură analitică de concentrare SPE.....	74
II.1.4. Concluzii.....	76
II.2. Studii de retenție pentru compuși polari pe diferiți adsorbanți pe bază de silicagel modificat chimic.....	77
II.2.1. Problematika studiului.....	77
II.2.2. Condiții experimentale	77
II.2.3. Rezultate și discuții	81
II.2.4. Concluzii.....	91

II.3. Studiu comparativ al retenției unor benzodiazepine prin SPE și HPLC.....	92
II.3.1. Problematika studiului.....	92
II.3.2. Condiții experimentale.....	92
II.3.3. Rezultate și discuții	94
II.3.3.1. Studiu SPE.....	95
II.3.3.2. Studiu HPLC.....	103
II.3.3.2.1. Studiul retenției benzodiazepinelor pe o fază staționară de tip cianopropil-silicagel.....	103
II.3.3.2.2. Studiul retenției benzodiazepinelor pe o fază staționară de tip fenil-silicagel.....	109
II.3.3.2.3. Studiul retenției benzodiazepinelor pe o fază staționară de tip octil-silicagel.....	114
II.3.3.2.4. Studiul retenției benzodiazepinelor pe o fază staționară de tip octadecil-silicagel.....	118
II.3.3.3. Compararea rezultatelor SPE și HPLC.....	124
II.3.3.4. Studiu de concentrare a benzodiazepinelor pe doi adsorbanți de tip silicagel modificat chimic.....	125
II.3.4. Concluzii.....	128
II.4. Studii de retenție și separare a unor compuși organici polari utilizând o fază staționară de tip pentafluorofenil-silicagel.....	129
II.4.1. Problematika studiului.....	129
II.4.2. Condiții experimentale	130
II.4.3. Rezultate și discuții	131
II.4.4. Concluzii.....	151
II.5. Studii de retenție la injecția de volume mari de solvenți aromatici pe o fază staționară de tip fenil în cromatografia de lichide în fază inversă.....	152
II.5.1. Problematika studiului.....	152
II.5.2. Condiții experimentale	153
II.5.3. Rezultate și discuții	154
II.5.4. Concluzii.....	160
CONCLUZII FINALE.....	161
BIBLIOGRAFIE.....	163
Lista de articole publicate sau în curs de publicare în cadrul tezei de doctorat.....	174

Rezumat teză

Teza de doctorat este structurată pe două capitole: primul capitol cuprinde aspecte teoretice și practice ale extracției în fază în solidă dar și descrierea principalelor mecanisme de retenție în cromatografia de lichide în fază inversă. Al doilea capitol cuprinde partea experimentală și este structurat pe cinci subcapitole care prezintă studiile de retenție a mai multor compuși organici polari având diferite hidrofobicități pe adsorbanti/faze staționare de tip silicagel modificat chimic prin extracție în fază solidă și cromatografie de lichide. În cadrul acestei teze s-a urmărit studierea parametrilor de retenție caracteristici procesului SPE și a influenței polarității compușilor pe patru adsorbanti de tip silicagel modificat chimic (octadecil-silicagel, octil-silicagel, fenil-silicagel și cianopropil-silicagel) pentru 15 compuși de importanță farmaceutică (atenolol, metoprolol, pentoxifilină, metformin, captopril, ciprofloxacină, norfloxacină, gliquidonă, o-tolil biguanidă, alprazolam, bromazepam, diazepam, flunitrazepam, medazepam și nitrazepam). Studiul HPLC prezentat în capitolul al treilea a avut ca scop compararea retenției benzodiazepinelor cu cea obținută prin studiile de extracție în fază solidă. Studiile prezentate în capitolele al patrulea și al cincilea au investigat din punct de vedere al retenției și separării treisprezece compuși organici polari (indapamid, simvastatin, lovastatin, 2-clorfenol, 2,4-diclorfenol, 2,6-diclorfenol, 1,4-diclorbenzen, 1,2,4,5-tetraclorbenzen și 4 izomeri ai HCH-ului) pe o fază staționară de tip pentafluorofenil-silicagel și injecția de volume mari de solvenți aromatici pe o fază staționară de tip fenilhexil-silicagel.

II.1. Studiul retenției SPE a unor compuși polari în varianta off-line manual

II.1.1. Problematica studiului

În primul capitol al părții experimentale a fost studiată influența cantității de adsorbant asupra formei curbei de eluție dar și a parametrilor de retenție pe un adsorbant de tip octadecil-silicagel; a pH-ului asupra capacității de retenție a compușilor bazici și a agentului formator de perechi ionice asupra retenției unui compus polar bazic (metforminul).

Curba de eluție prezintă o importanță fundamentală în extracția în fază solidă deoarece determină volumul maxim de probă care poate să fie încărcat pe adsorbant cu o recuperare de 100 % a analitului.

II.1.2. Rezultate și discuții

Curbele de eluție au fost modelate cu ajutorul funcției Boltzmann cu scopul obținerii valorilor parametrilor de retenție (volum de străpungere, volum de retenție, volum final și factor de retenție). Modelarea cu ajutorul programului Marvin a permis punerea în evidență a zonelor polare din moleculele studiate. Studiul SPE pentru patru compuși polari (atenolol, metoprolol, pentoxifilină și captopril) s-a efectuat pe adsorbanți de tip Ultra Clean C18 (200 mg) și Bond Elut C18 (2 g), observându-se creșterea capacității de retenție pentru toți cei patru analiți odată cu creșterea masei adsorbantului. Curbele de eluție obținute pentru atenolol și metoprolol pe cartușul Ultra CleanC18 sunt prezentate în *Figura 15*.

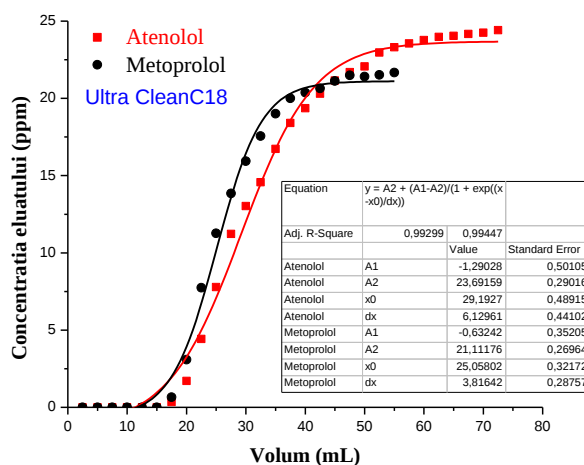


Figura 15. Dependența concentrației de atenolol și metoprolol la încărcarea cartușului SPE cu volume succesive de 2,5 mL și modelarea prin funcția Boltzmann

Curbele de eluție obținute pentru metoprolol pe cei doi adsorbanți de tip octadecil-silicagel au o formă sigmoidală tipică. În cazul pentoxifilinei a fost obținut un volum de străpungere mare deși valoarea hidrofobicității este similară cu a atenololului ceea ce poate să fie explicat prin formarea unor dimeri sau tetrameri de pentoxifilină în fază apoasă care determină creșterea retenției. Curbele de eluție obținute pentru captopril pe cei doi adsorbanți au evidențiat o retenție minimă pe cartușul de tip Ultra Clean C18 și o retenție în două trepte pe cartușul Bond Elut C18 (a se vedea *Figura 25*). Forma dublu sigmoidală obținută pentru captopril pe cartușul de tip Bond Elut C18 poate să fie explicată printr-un fenomen de oxidare a captoprilului la disulfura de captopril în timpul procesului de extracție în fază solidă.

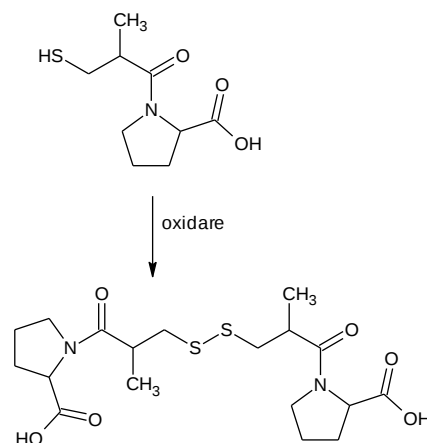
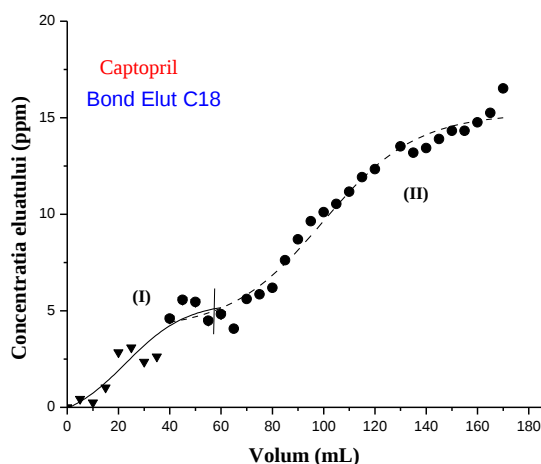


Figura 25. Dependența concentrației de captopril la încărcarea cartușului SPE cu volume succesive de 2,5 mL probă apoasă și modelarea prin funcția Boltzmann. În partea dreaptă este prezentată oxidarea captoprilului cu obținerea disulfurii de captopril

II.1.3.2. Modelarea matematică a curbelor de eluție prin funcția Boltzmann

Curbele de eluție SPE obținute au fost modelate cu ajutorul funcției Boltzmann din programul Origin.

$$Y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{dx}}}, \quad (\text{II.1})$$

unde: Y – concentrația analitului în eluat; x – volumul de încărcare pe adsorbant; A_1 , A_2 – parametrii de regresie și x_0 – punctul de inflexiune, unde Y devine $(A_1 + A_2)/2$.

Cu ajutorul ecuației (II.1) și a definind volumul de străpungere ca fiind volumul pentru care se obține 1 % din valoarea concentrației inițiale a analitului în eluat și volumul final ca reprezentând volumul care corespunde la 99 % din valoarea concentrației inițiale a analitului în eluat se pot determina formulele de calcul corespunzătoare V_b și V_f .

Expresia de calcul pentru volumul de străpungere (V_b) este următoarea:

$$x = x_0 + \ln \left(\frac{100}{99} \left(1 - \frac{A_1}{A_2} \right) - 1 \right) dx \quad (\text{II.9})$$

Expresia de calcul pentru volumul final (V_f) este următoarea:

$$x = x_0 + \ln \left(99 - 100 \frac{A_1}{A_2} \right) dx \quad (\text{II.13})$$

Expresia de calcul pentru volumul de retenție (V_r) este următoarea:

$$x_0 = \frac{A_1 + A_2}{2} \quad (\text{II.14})$$

Cu ajutorul ecuațiilor de mai sus și a curbelor de eluție s-au obținut parametrii de retenție pentru cei patru compuși studiați pe cei doi adsorbanți pe bază de octadecil-silicagel.

Tabel 7. Parametrii de retenție obținuți pentru cei patru compuși studiați

Nr. Crt	Compus	Tip cartuș	V _b (mL)		V _r (mL)	V _f (mL)	N	k
			Calculat	Observat				
1	Atenolol	Ultra Clean C18	12,5	29,2	29,2	57,7	12	0,97
		Bond Elut C18	-*	-	-	-	-	-
2	Metoprolol	Ultra Clean C18	12,8	25,1	25,1	42,7	17	0,70
		Bond Elut C18	210,2	230	539,9	808,1	-	0,49
3	Pentoxifilină	Ultra Clean C18	84,2	103,4	103,4	121,1	116	0,17
		Bond Elut C18	1640,8	1680	1651,8	1656,1	-**	-
4	Captopril	Ultra Clean C18	0,2	0,1	2,9	7,3	5	1,49
		Bond Elut I	1,7	1	22,9	79,5	5	2,47
		Bond Elut II	-	-	99,8	177,6	-	0,78

* pentru atenolol pe cartușul de tip Bond Elut C18 datorită formei curbei de eluție nu au putut să fie calculate valorile parametrilor corespunzători procesului SPE;

**valoarea numărului de talere teoretice obținută din calcul este mare, ceea ce nu a fost raportat până acum în literatură pentru un adsorbant având o lungime a adsorbantului atât de mică (2 cm).

II.1.3.3. Studiul influenței pH-ului asupra retenției în SPE

Un alt studiu efectuat a urmărit cunoașterea influenței pH-ului asupra retenției compușilor ionizabili în SPE. Curbele de eluție obținute pentru metoprolol în mediu neutru și acid sunt prezentate comparativ în Figura 26. Volumul de străpungere pentru metoprolol în mediu acid are o valoare mai mică ceea ce poate să fie explicat prin faptul că protonarea grupării amino secundare determină o afinitate mai mare pentru apă, ceea ce va conduce la o interacție mai slabă cu lanțurile alchil ale adsorbantului.

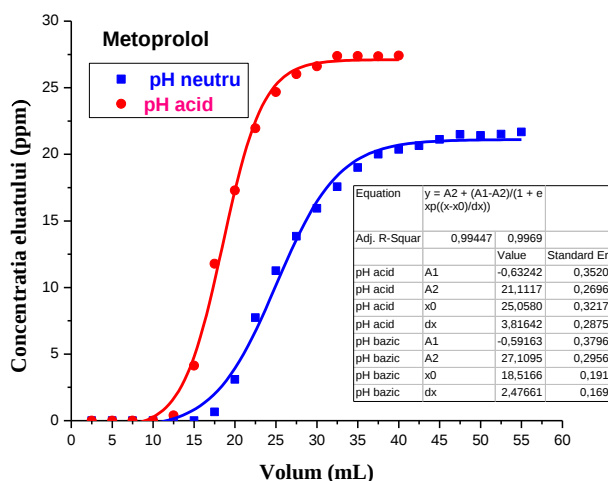


Figura 26. Comparare între curbele de eluție SPE pentru metoprolol obținute în mediu neutru și acid

II.1.3.4. Studiul extracției în fază solidă prin mecanism cu formare de perechi ionice

Creșterea retenției compușilor polari slab retinuți pe adsorbant de tip hidrofob în SPE se poate realiza printr-un mecanism cu formare de perechi ionice. Metforminul este un compus bazic ($pK_a = 13,1 \pm 0,5$) cu polaritate ridicată. Curbele de eluție obținute pentru metformin pentru cei doi agenți formatori de perechi ionice sunt prezentate în Figura 29, observându-se că valoarea volumului de străpungere în cazul celor doi agenți formatori de perechi ionice (hexansulfonat de sodiu și heptansulfonat de sodiu) este similară.

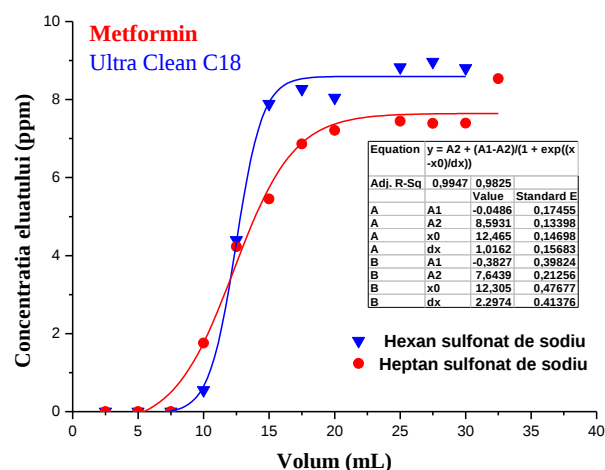


Figura 29. Dependența concentrației de metformin la încărcarea cartușului SPE cu volume succesive de 2,5 mL probă apoasă și modelarea prin funcția Boltzmann

Agentul formator de perechi ionice (hexan sau heptansulfonatul de sodiu) este reținut de lanțurile octadecil ale adsorbantului prin interacții hidrofobe, iar gruparea sulfonat interacționează electrostatic cu gruparea aminică protonată a metforminului.

II.1.3.5. Procedură analitică de concentrare SPE

Pentru procedura analitică de concentrare SPE a atenololului, metoprololului și pentoxifilinei s-au utilizat adsorbant de tip Ultra Clean C18 (200 mg). Coeficienții de corelație obținuți au fost 0,96 pentru atenolol și 0,99 pentru metoprolol și pentoxifilină. Panta dreptei de calibrare pentru metoprolol este mai mică decât cea pentru atenolol, deși acești compuși au avut un comportament similar în ceea ce privește retenția pe același tip de adsorbant. S-a observat că desorbția metoprololului cu metanol este mai lentă față de cea a atenololului ceea ce influențează gradul de recuperare al acestuia.

II.1.4 Concluzii

Studiul SPE efectuat a evidențiat că mecanismul de retenție pe adsorbantul octadecil-silicagel este influențat de structura compușilor, de prezența grupărilor polare și de geometria

moleculii. În cazul metoprololului un pH acid al soluției determină scăderea retenției și implicit a volumului de străpungere, deoarece interacția dintre analit și adsorbant nu mai este favorabilă datorită protonării grupării aminice a metoprololului. Studiul SPE efectuat confirmă că este posibilă creșterea retenției moleculelor polare (metformin) pe adsorbantii SPE hidrofobi prin utilizarea agenților formatori de perechi ionice.

II.2. Studii de retenție pentru compuși polari pe diferiți adsorbanti pe bază de silicagel modificat chimic

II.2.1. Problematica studiului

Al doilea capitol al părții experimentale a fost avut ca scop modelarea retenției a cinci compuși polari (ciprofloxacină, norfloxacină, metformin, o-tolil biguanidă și gliclidonă) pe patru adsorbanti pe bază de silicagel având hidrofobicități și polarități diferite: octadecil-silicagel și octil-silicagel unde retenția este datorată interacțiilor hidrofobe și doi adsorbanti care conferă un plus de selectivitate (fenil-silicagelul care participă la interacții π - π și cianopropil-silicagelul care participă la interacții dipol-dipol). Studiul a urmărit cunoașterea influenței grupărilor polare asupra comportamentului de extracție în fază solidă a compușilor studiați.

II.2.3. Rezultate și discuții

Curbele de eluție obținute pentru ciprofloxacină și norfloxacină (fluoroquionolone care diferă doar printr-o grupare propil comparativ cu un lanț etil) pe cei patru adsorbanti pe bază de silicagel modificat chimic sunt similare. Pentru ciprofloxacină curbele de eluție obținute sunt prezentate în *Figura 39*. Retenția ciprofloxacinei și norfloxacinei pe adsorbantii de octil-silicagel și fenil-silicagel este puternică fiind datorată în principal interacțiilor hidrofobe și de tip π - π cu nucleele aromatice ale compușilor. Retenția celor doi compuși pe adsorbantul puternic hidrofob C18 nu este favorabilă, deoarece polaritatea crescută a moleculelor (a se vedea *Figura 40*) împiedică o interacție puternică cu lanțul octadecil, volumul de străpungere obținut fiind minim. Pentru adsorbantul de tip cianopropil-silicagel s-a obținut o curbă de eluție asemănătoare cu cea teoretică de formă sigmoidală în care volumul de străpungere pentru ciprofloxacină este de 60 mL, iar pentru norfloxacină de 50 mL. Retenția ciprofloxacinei cât și a norfloxacinei pe adsorbantul cianopropil-silicagel se datorează după cum se observă în *Figura 40* sarcinilor negative ale acestora localizate pe atomul de fluor, pe atomul de oxigen a grupării carboxil și de azot a grupării piperazinice care participă la interacții dipol-dipol cu gruparea CN a adsorbantului.

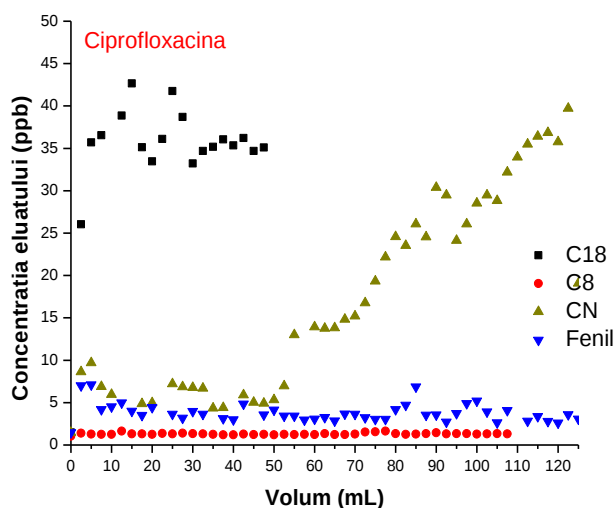


Figura 39. Dependența concentrației de ciprofloxacina la încărcarea cartușului SPE cu volume succesive de 2,5 mL probă apoasă

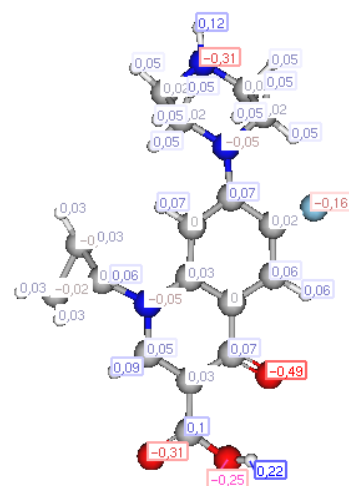


Figura 40. Structura ciprofloxacinei cu sarcinile atomilor obținute prin programul Marvin (carbon - gri, hidrogen - alb, azot - albastru, oxigen - roșu)

Curbele de eluție obținute pentru o-tolil biguanidă și metformin (biguanide care diferă doar printr-o grupare metil-fenil) sunt similare cu cea teoretică de formă sigmoidală, a se vedea Figura 43. Retenția o-tolil biguanidei și metforminului pe adsorbantul octil-silicagel a fost minimă ceea ce poate să fie atribuită unor interacții hidrofobe slabe. Interacțiile polare între gruparea guanidinică a compușilor și grupările silanol de pe suprafața silicagelului sunt practic neglijabile datorită existenței unei interacții mai puternice a grupării aminice cu moleculele de apă (a se vedea Figura 44). Retenția o-tolil biguanidei pe adsorbantul de tip fenil-silicagel este datorată în principal interacțiilor π - π , în schimb se observă o retenție minimă a metforminului pe același tip de adsorbant. În cazul cianopropil-silicagelului, curba de eluție obținută pentru o-tolil biguanidă prezintă două trepte ceea ce poate să fie atribuită adsorbției în multistrat a moleculelor de o-tolil biguanidă pe suprafața adsorbantului.

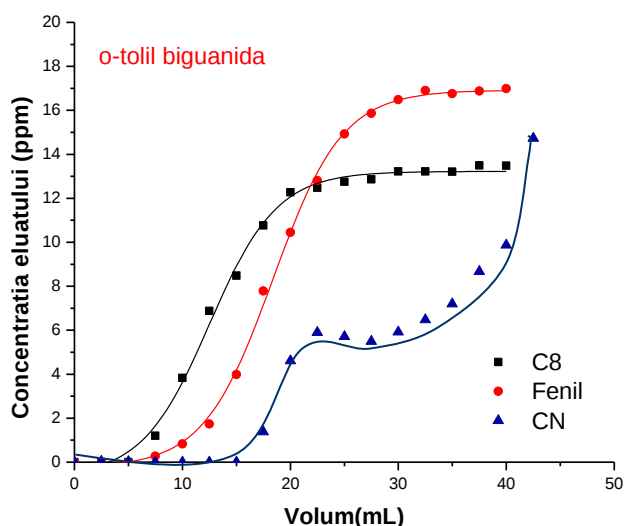


Figura 43. Dependenta concentrației de o-tolil biguanidă la încărcarea cartușului SPE cu volume succesive de 2,5 mL probă apoasă și modelarea prin funcția Boltzmann

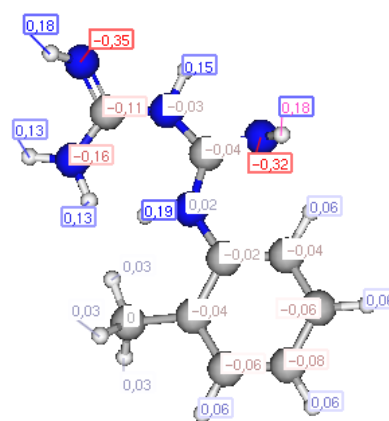


Figura 44. Structura o-tolil biguanidei cu sarcinile atomilor obținute prin programul Marvin (carbon - gri, hidrogen - alb, azot - albastru)

Gliquidona este compusul cu cea mai mare hidrofobicitate dintre cei studiați, având un $\log K_{ow}$ de 4,65. Retenția gliquidonei pe adsorbanții de tip octadecil-silicagel, octil-silicagel și fenil-silicagel este puternică fiind favorizată de interacțiile hidrofobe și de tip $\pi-\pi$. Datorită hidrofobității moleculei de gliquidonă retenția pe adsorbanții polari de tip CN este minimă, deși molecula conține grupări polare (a se vedea Figura 49). Interacția slabă a gliquidonei cu adsorbantul de tip cianopropil-silicagel poate să fie explicată prin prezența a două nuclee benzenice și a grupării ciclohexil care conferă o hidrofobicitate ridicată moleculei și determină o împiedicare sterică.

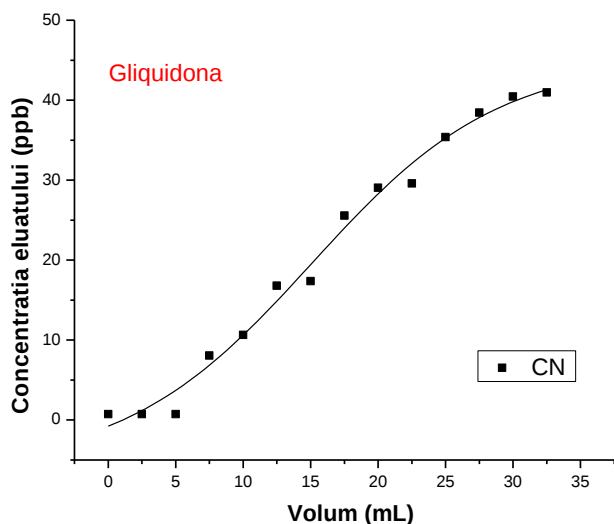


Figura 48. Dependența concentrației de gliquidonă la încărcarea cartușului SPE cu volume succesive de 2,5 mL probă apoasă și modelarea prin funcția Boltzmann

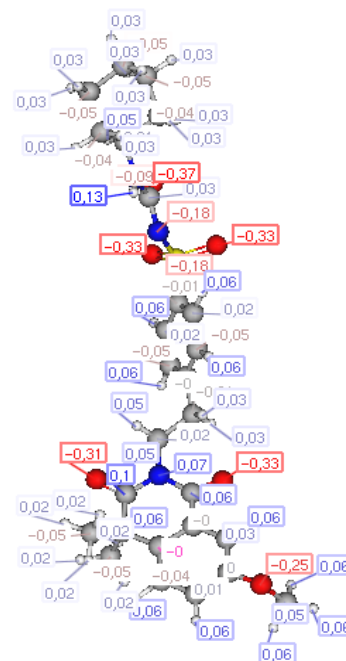


Figura 49. Structura gliquidonei cu sarcinile atomilor obținute prin programul Marvin (carbon gri, hidrogen-alb, azot-albastru, oxigen - roșu)

II.2.4. Concluzii

Studiul de retenție a cinci compuși organici polari având hidrofobicități diferite pe patru adsorbanti de tip silicagel modificat chimic a scos în evidență complexitatea procesului de adsorbție în extracția în fază solidă. Doar în câteva cazuri, atunci când retenția a fost guvernată de o singură forță cum ar fi interacția hidrofoabă (metformin și o-tolil biguanidă), interacția dipol-dipol (metformin, o-tolil biguanidă și gliquidonă) și interacția π - π (o-tolil biguanidă) a fost obținută o curbă de eluție de formă sigmoidală caracteristică SPE. În cazul cianopropil-silicagelului s-a obținut pentru o-tolil-biguanidă o curbă de eluție cu alură dublu sigmoidală care poate să fie explicată prin adsorbția unuia sau mai multor molecule de compus pe centrii de adsorbție ai adsorbantului.

II. 3. Studiu comparativ al retenției unor benzodiazepine prin SPE și HPLC

II.3.1. Problematika studiului

Al treilea studiu efectuat a avut ca scop găsirea unei corelații între procesul de retenție în extracția în fază solidă și cel din cromatografia de lichide pe patru tipuri de adsorbanti/faze

staționare de tip silicagel modificat chimic cu diferite hidrofobicități (cu octadecil, octil, cianopropil și fenil) pentru șase compuși din clasa benzodiazepinelor.

II.3.3. Rezultate și discuții

Benzodiazepinele sunt o clasă de medicamente cu o acțiune terapeutică largă, fiind utilizate ca sedativ-hipnotice, anxiolitice și anticonvulsive.

II.3.3.1. Studiu SPE

Curbele de eluție SPE obținute pentru cele șase benzodiazepine studiate (alprazolam, bromazepam, diazepam, flunitrazepam, medazepam și nitrazepam) sunt similare observându-se o retenție puternică pe adsorbantii de tip octadecil-silicagel, octil-silicagel și fenil-silicagel și o retenție minimă pe adsorbantul de tip cianopropil-silicagel. Modelarea cu ajutorul programului Marvin a permis punerea în evidență a zonelor polare din moleculele de benzodiazepine.

Curbele de eluție obținute pentru alprazolam pe cei patru adsorbantii sunt prezentate în *Figura 52*. Alprazolamul este o moleculă voluminoasă, cu o geometrie neplană, care prezintă zone polare datorate atomilor de azot din gruparea triazolică și a clorului după cum se observă în *Figura 53*. Retenția cea mai puternică a alprazolamului a fost observată pe adsorbantii de tip C18, C8, și fenil-silicagel datorită interacțiilor π - π între grupările aromatice ale alprazolamului și gruparea fenil a adsorbantului.

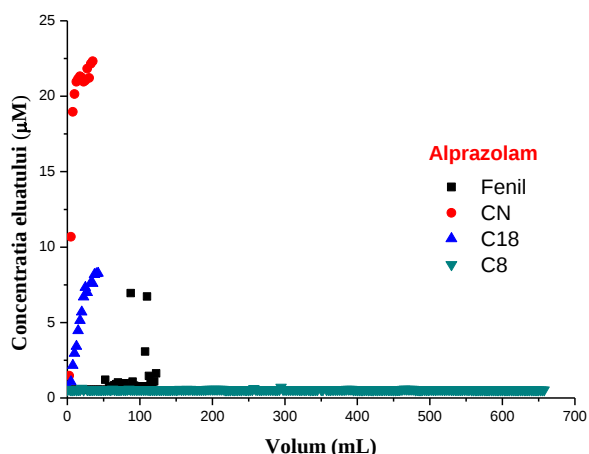


Figura 52. Dependența concentrației de alprazolam la încărcarea cartușului SPE cu volume succesive de 2,5 mL probă apoasă

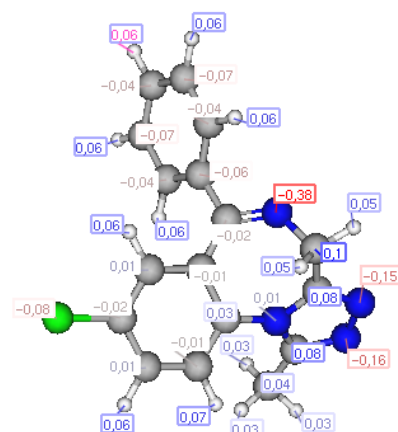


Figura 53. Structura alprazolamului cu sarcinile atomilor obținute prin programul Marvin (carbon - gri, hidrogen - alb, azot - albastru, clor - verde)

Curbele de eluție obținute pentru bromazepam pe cei patru adsorbantți de tip silicagel modificat chimic sunt prezentate în *Figura 54*. Molecula de bromazepam prezintă o grupare fenil perpendiculară pe nucleul diazepinic și sarcini negative pe atomii de oxigen, azot și brom (a se vedea *Figura 55*). Retenția bromazepamului este puternică pe adsorbantul de tip octil-silicagel, în timp ce pentru fenil-silicagel a fost obținută o curbă de eluție tipică, de formă sigmoidală. Interacția bromazepamului cu adsorbantul de tip cianopropil-silicagel este slabă astfel încât retenția este minimă, deși molecula posedă zone polare. Deși mecanismul de retenție pe adsorbantii C18 și C8 este similar (interacție hidrofobă) se observă că retenția bromazepamului este mai mare pe adsorbantul C8, ceea ce poate să fie explicat prin caracterul mai puțin hidrofob al acestuia.

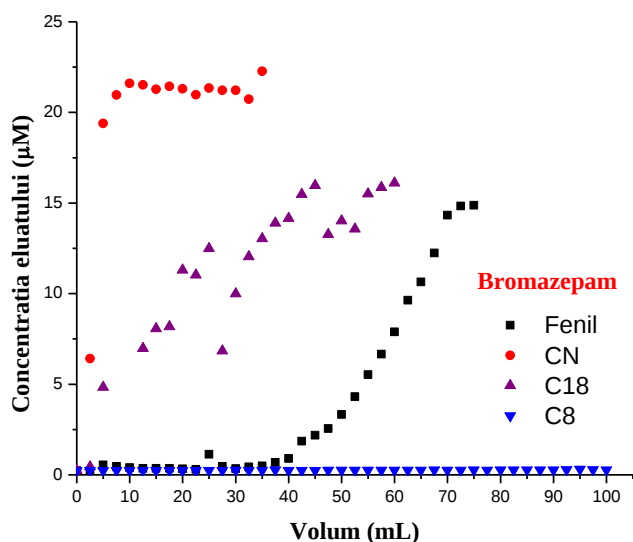


Figura 54. Dependența concentrației de bromazepam la încărcarea cartușului SPE cu volume succesive de 2,5 mL probă apoasă

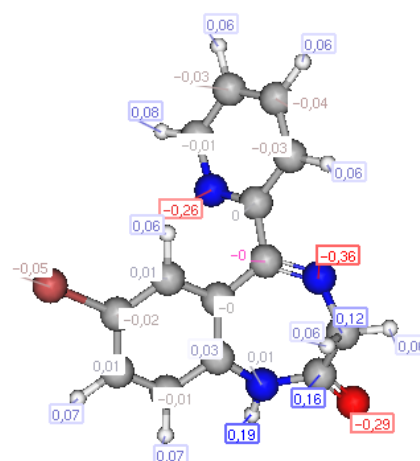


Figura 55. Structura bromazepamului cu sarcinile atomilor obținute prin programul Marvin (carbon - gri, hidrogen - alb, azot - albastru, oxigen - roșu, brom - roșu închis)

Curbele de eluție obținute pentru flunitrazepam pe cei patru adsorbantți de tip silicagel modificat chimic sunt prezentate în *Figura 58*. Molecula de flunitrazepam prezintă grupări polare de tip nitro și un atom de fluor electronegativ după cum se observă în *Figura 59*. Deși flunitrazepamul este compusul cel mai puțin hidrofob dintre toate benzodiazepinele studiate se observă că retenția flunitrazepamului este mare pe adsorbantii C18, C8 și fenil-silicagel deși hidrofobicitatea și polaritatea acestora este diferită. Interacția flunitrazepamului cu adsorbantul de tip cianopropil-silicagel nu este favorabilă astfel încât retenția este minimă.

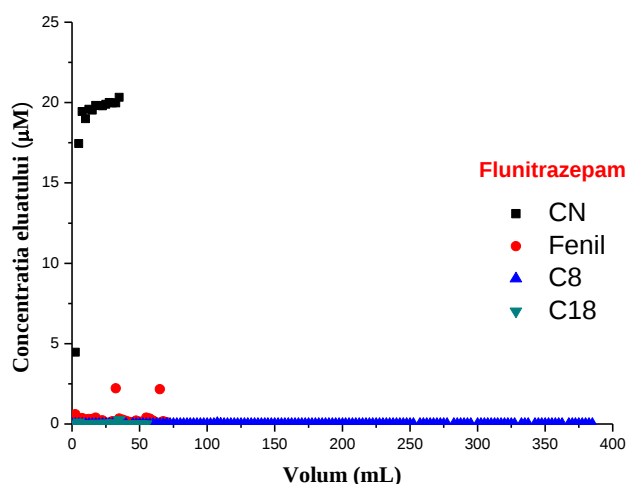


Figura 58. Dependența concentrației de flunitrazepam la încărcarea cartușului SPE cu volume succesive de 2,5 mL probă apoasă

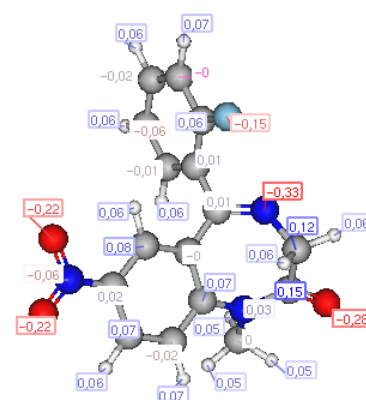


Figura 59. Structura flunitrazepamului cu sarcinile atomilor obținute prin programul Marvin (carbon - gri, hidrogen - alb, azot - albastru, oxigen - roșu, fluor - albastru deschis)

Studiul SPE al benzodiazepinelor pe adsorbanții de tip silicagel modificat chimic a evidențiat un comportament similar al acestora pe toți adsorbanții studiați deși nu a putut să fie calculat volumul de retenție (V_r) și volumul final (V_f), deoarece nu s-a putut modela retenția compușilor cu ajutorul funcției Boltzmann.

II.3.3.2. Studiu HPLC

Scopul studiului a fost cunoașterea retenției benzodiazepinelor pe faze staționare conținând același tip de adsorbanți ca cei utilizați în studiul SPE anterior (octadecil-silicagel, octil-silicagel, fenil-silicagel și cianopropil-silicagel). Studiul a urmărit găsirea unor corelații între cele două procese cromatografice (HPLC și SPE). Studiile de retenție efectuate pe cele patru faze staționare de tip silicagel modificat chimic pentru cele șase benzodiazepine pentru doi modificatori organici ai fazei mobile (acetonitril și metanol) au permis estimarea factorului de retenție pentru o compoziție a fazei mobile 100 % apoasă ($\log k_w$). Acest parametru este important deoarece permite compararea cu retenția obținută din experimentele de extracție în fază solidă unde solventul probei este apa.

II.3.3.2.1. Studiul retenției benzodiazepinelor pe o fază staționară de tip cianopropil-silicagel

Studiul de retenție al celor șase benzodiazepine pe coloana de tip cianopropil-silicagel s-a realizat pentru doi modificatori organici ai fazei mobile (acetonitril și metanol).

Studiul efectuat a evidențiat scăderea retenției cu creșterea procentului de modificador organic din faza mobilă. Dependența factorului de retenție ($\log k$) pentru patru benzodiazepine pe un interval de compoziții al fazei mobile cuprins între 40–70 % acetonitril este prezentată în *Figura 64*. Pentru studierea retenției cromatografice a medazepamului și bromazepamului a fost necesară acidifierea componentei apoase a fazei mobile cu 0,1 % H_3PO_4 85 %, pentru a controla retenția deoarece acești compuși erau puternic reținuți în coloana cromatografică.

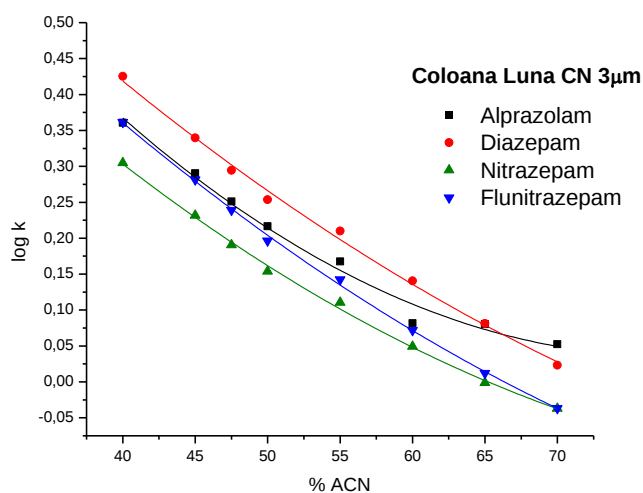


Figura 64. Dependența retenției ($\log k$) benzodiazepinelor în funcție de procentul de ACN pe coloana Luna CN 3 μm , volum injecție 1 μL , debit 1 mL/min, 254 nm, 25 $^{\circ}\text{C}$

Dacă se extrapolează valoarea factorului de retenție la o compoziție 100 % apoasă a fazei mobile se obțin valorile corespunzătoare $\log k_w$ cuprinse între 0,5879 și 1,4516 pentru acetonitril ca modificador organic al fazei mobile și între 0,7006 și 2,5444 pentru metanol ca modificador organic al fazei mobile.

II.3.3.2.2. Studiul retenției benzodiazepinelor pe o fază staționară de tip fenil-silicagel

Fazele staționare de tip fenil-silicagel asigură o selectivitate ridicată pentru compușii aromatici în principal datorită interacțiilor de tip π – π . Similar cu studiile de retenție efectuate pe faza staționară de tip cianopropil-silicagel și în acest caz s-a utilizat ca modificador organic al fazei mobile atât acetonitrilul cât și metanolul, obținându-se în ambele cazuri o dependență de tip polinomial.

Dependența retenției pentru cele șase benzodiazepine studiate atunci când modificadorul organic al fazei mobile a fost acetonitrilul este reprezentată grafic în *Figura 68*. Se observă că ordinea de eluție nu este corespunzătoare creșterii hidrofobității compușilor, ceea ce indică că nu interacția hidrofobică este dominantă în procesul de retenție.

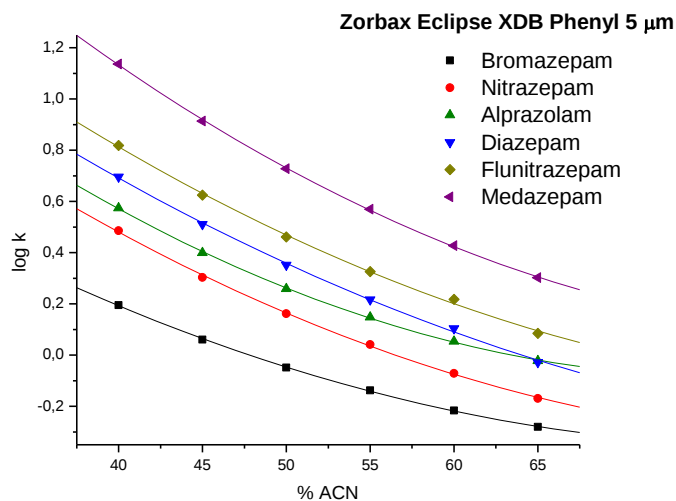


Figura 68. Dependența retenției ($\log k$) în funcție de procentul de ACN pe coloana Zorbax Eclipse XDB Phenyl 5 μm , volum injecție 1 μL , debit 1 mL/min, 254 nm, 25 $^{\circ}\text{C}$

Valorile $\log k_w$ corespunzătoare retenției celor șase benzodiazepine la o fază mobilă 100 % apoasă sunt cuprinse între 1,83 și 3,68 pentru acetonitril ca modifier organic al fazei mobile și între 1,96 și 5,44 pentru metanol ca modifier organic al fazei mobile.

II.3.3.2.3. Studiul retenției benzodiazepinelor pe o fază staționară de tip octil-silicagel

Similar cu studiile prezentate anterior, studiile de retenție pentru benzodiazepine pe faza staționară de tip octil-silicagel s-au realizat atât cu metanol cât și cu acetonitril ca modifier organic al fazei mobile obținându-se o dependență de tip polinomial. Dependența retenției benzodiazepinelor studiate în funcție de procentul de acetonitril din faza mobilă pe coloana Zorbax Eclipse XDB C8 este prezentată în Figura 71.

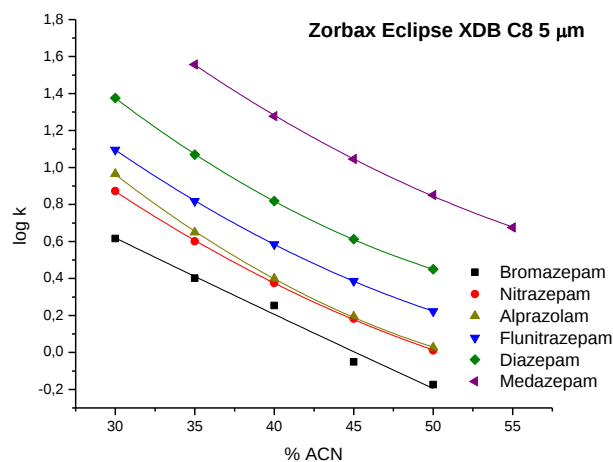


Figura 71. Dependența retenției ($\log k$) în funcție de procentul de ACN pe coloana Zorbax Eclipse XDB C8 5 μm , volum injecție 1 μL , debit 1 mL/min, 254 nm, 25 $^{\circ}\text{C}$

Retenția corespunzătoare unei faze mobile 100 % apoasă pentru cele șase benzodiazepine obținută prin extrapolare are valori cuprinse între 1,93 și 4,44 pentru acetonitril ca modifier organic al fazei mobile și între 3,40 și 5,62 pentru metanol ca modifier organic al fazei mobile.

II.3.3.2.4. Studiul retenției benzodiazepinelor pe o fază staționară de tip octadecil-silicagel

Studiile de retenție ale benzodiazepinelor pe faza staționară de tip octadecil-silicagel au fost efectuate pe un interval de compoziții al modifierului organic în faza mobilă cuprins între 30-50 % pentru acetonitril și între 45-65 % pentru metanol. Dependența retenției în funcție de procentul de acetonitril din faza mobilă pentru cele șase benzodiazepine studiate este prezentată în *Figura 75*.

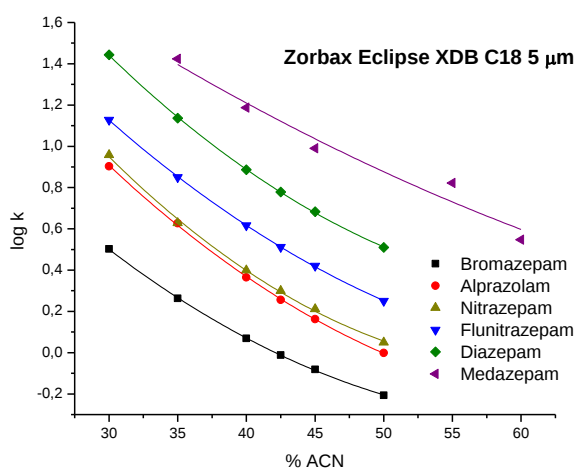


Figura 75. Dependența retenției (log k) în funcție de procentul de ACN pe coloana Zorbax Eclipse XDB C18 5 μm, volum injecție 1 μL, debit 1 mL/min, 254 nm, 25 °C

Retenția benzodiazepinelor corespunzătoare unei faze mobile 100 % apoasă a fost obținută prin extrapolare având valorile cuprinse între 2,71 și 3,07 pentru acetonitril ca modifier organic al fazei mobile și între 3,55 și 5,51 pentru metanol ca modifier organic al fazei mobile

Studiile cromatografice au evidențiat complexitatea mecanismului de retenție a benzodiazepinelor pe cele patru faze staționare de tip silicagel chimic în care nu numai un singur tip de interacție este responsabil pentru retenție.

I.3.3.3. Compararea rezultatelor SPE și HPLC

Valorile retenției benzodiazepinelor studiate atât prin studii de retenție HPLC cât și SPE sunt prezentate comparativ în *Tabelul 37*. Din punct de vedere calitativ se poate observa că retenția în cele două procese este corelabilă arătând similitudinea acestor procese

Tabelul 37. Compararea retenției celor șase benzodiazepine obținute prin cele două tehnici HPLC și SPE

Compus	Retenție HPLC (log k_w)				Retenție SPE (V_B - mL)			
	C18	C8	C ₆ H ₅	CN	C18	C8	C ₆ H ₅	CN
Alprazolam	4,31	4,27	3,38	2,51	5	> 670	> 120	1
Bromazepam	3,55	3,40	1,96	0,70	5	> 100	28	1
Diazepam	4,81	4,77	3,76	2,54	> 35	> 35	> 60	1
Flunitrazepam	3,99	3,99	4,53	2,28	> 60	> 375	> 75	1
Medazepam	5,51	5,62	5,44	1,39	> 35	> 35	> 35	5
Nitrazepam	3,72	3,59	2,40	2,13	> 80	> 55	> 55	1

II.3.3.4. Studiul de concentrare a benzodiazepinelor pe doi adsorbanți de tip silicagel modificat chimic

Studiul de concentrare a benzodiazepinelor pe doi adsorbanți de tip octil-silicagel și fenil-silicagel s-a realizat la nivele de concentrații de μM , deoarece nu este de așteptat o supraîncărcare a adsorbantului, singurul factor care influențează retenția fiind factorul de retenție. Conformația moleculelor joacă un rol important în interacția analiților cu particulele de adsorbant. Rezultatele obținute indică că acetonitrilul este un solvent potrivit pentru desorbție. Desorbția medazepamului de pe suprafața octil-silicagelului nu este totală datorită unei interacții puternice cu adsorbantul. Gradul de recuperare obținut pentru cele șase benzodiazepine este cuprins între 24 și 82 %.

II.3.4. Concluzii

Studiile în paralel efectuate prin SPE și HPLC pe patru faze staționare similare (C8, C18, fenil-silicagel și cianopropil-silicagel) au arătat următoarele:

- benzodiazepinele interacționează puternic cu fazele staționare hidrofobe de tip C8 și C18. Aceasta arată că părțile având caracter hidrofob din moleculele compușilor studiați interacționează preponderent cu lanțurile alchil de pe suprafața adsorbanților utilizați;
- faptul că retenția acestor compuși pe faza staționară de tip cianopropil-silicagel atât în SPE cât și în HPLC este mică arată că interacțiile polare din molecula de analit și gruparea polară CN au loc într-o măsură mai mică datorită entităților cu caracter hidrofob voluminoase din molecula de analit;
- în cazul fazei staționare de tip fenil-silicagel în HPLC, interacția analiților este situată aproximativ între CN și C8, fapt explicabil prin hidrofobicitatea mai mică a fenilului în comparație cu lanțul octil;

II.4. Studii de retenție și separare a unor compuși organici polari utilizând o fază staționară de tip pentafluorofenil-silicagel

II.4.1. Problematica studiului

Fazele staționare de tip perfluoro-silicagel au fost introduse în anul 1980, conferind o selectivitate crescută pentru compușii aromatici halogenați, dar și pentru biomolecule. Scopul studiului a fost investigarea proprietăților de retenție pentru diferiți compuși aromatici cu sau fără atomi de halogen în moleculă pe o fază staționară de tip pentafluorofenil-silicagel pentru a evidenția rolul interacțiilor de tip polar și π - π în procesul de retenție.

II.4.3. Rezultate și discuții

Studiul de retenție al adeninei pe coloana PFP s-a realizat pentru acetonitril ca modifier organic al fazei mobile observându-se o dependență de tip sigmoidal destul de rar întâlnită. Interacția adeninei cu faza staționară este puțin favorabilă după cum se observă din valoarea factorului de retenție ($\log k$) din *Figura 86*. Forma atipică poate să fie explicată prin echilibrele tautomere amino-imino ale moleculei de adenină care au diferite hidrofobicități și interacționează diferit cu faza staționară.

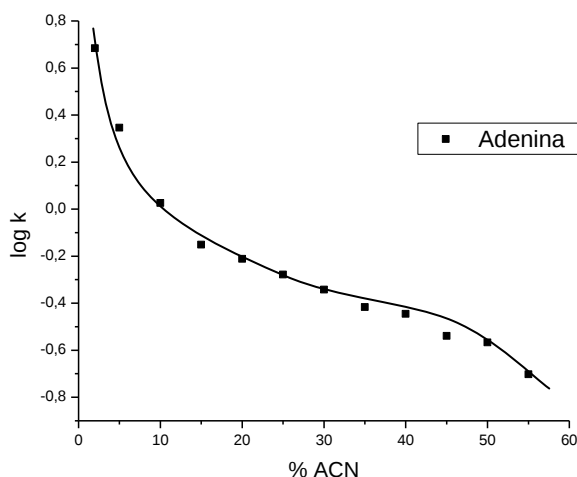


Figura 86. Dependența factorului de retenție în funcție de procentul de acetonitril din faza mobilă pentru adenină, coloană Luna PFP, debit 0,3 mL/min, 254 nm, 25 °C

II.4.3.1. Studiul retenției compușilor organici de importanță farmaceutică pentru diferiți modificatori organici ai fazei mobile pe o fază staționară de tip pentafluorofenil-silicagel

Studiile de retenție și separare efectuate pentru indapamid, simvastatin, lovastatin pe coloana de tip pentafluorofenil-silicagel au fost realizate pentru trei modificatori organici ai fazei mobile: metanol, acetonitril și metanol:acetonitril obținându-se în toate cazurile o separare cu o rezoluție bună, deși simvastatinul și lovastatinul diferă doar printr-o grupare metil. În urma studiilor

de retenție efectuate cu acetonitril ca modificator organic al fazei mobile au fost obținute dependențe de tip polinomial (a se vedea *Figura 88*). Dependențe de tip polinomial au fost obținute și pentru metanol și amestec metanol:acetonitril ca modificator organic al fazei mobile.

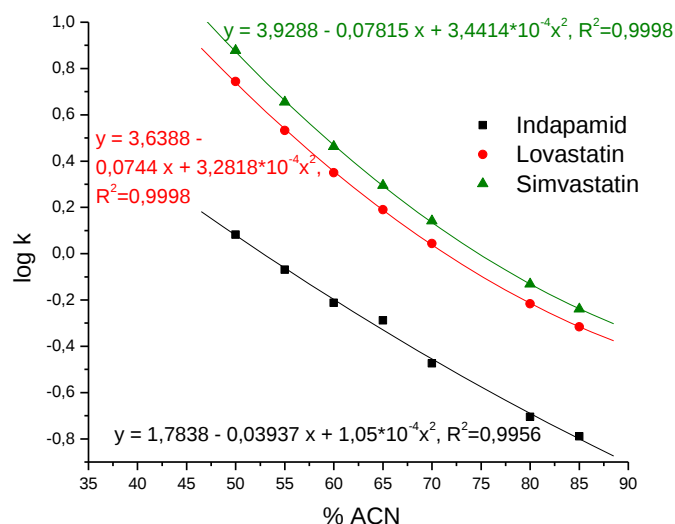


Figura 88. Dependența retenției ($\log k$) în funcție de procentul de acetonitril din faza mobilă pentru indapamid, lovastatin și simvastatin

II.4.3.2. Studiul retenției unor compuși aromatici halogenați pe o fază staționară de tip PFP

În acest studiu s-a urmărit investigarea retenției a cinci compuși aromatici clorurați cu hidrofobicități medii (2-clorfenol; 2,4-diclorfenol; 2,6-diclorfenol; 1,4-diclorbenzen și 1,2,4,5-tetraclorbenzen) pe coloana PFP. Dependența retenției acestor compuși în funcție de procentul de modificator organic din faza mobilă (metanol sau acetonitril) pe faze staționare de tip pentafluorofenil-silicagel este de tip polinomial.

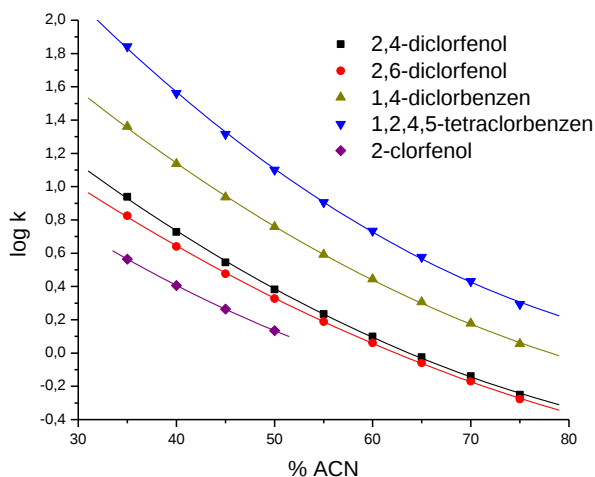


Figura 92. Dependența factorului de retenție ($\log k$) în funcție de procentul de acetonitril din faza mobilă pentru compușii aromatici clorurați studiați

II.4.3.3. Studiul termodinamic al retenției pentru compuși aromatici halogenați pe coloana PFP

Studiul termodinamic al retenției compușilor aromatici halogenați pe coloana PFP a permis calcularea parametrilor termodinamici de transfer din faza mobilă în faza staționară (entalpie liberă standard (ΔH) și entropie liberă standard (ΔS)), a se vedea *Tabel 43*. A fost observată scăderea timpului de retenție odată cu creșterea temperaturii în coloana cromatografică pentru toți cei cinci compuși studiați (2-clorfenol, 2,4-diclorfenol, 2,6-diclorfenol, 1,4-diclorbenzen și 1,2,4,5-tetraclorbenzen). Dependențele liniare obținute indică că mecanismul de retenție nu se schimbă odată cu variația temperaturii.

Tabel 43. Valorile calculate pentru variația standard a entalpiei și entropiei de distribuție a analiților între faza mobilă și faza staționară

Compus	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔS^0 (J/mol K)
2-clorfenol	-8,55	-33,05
2,6-diclorfenol	-8,87	-28,81
2,4-diclorfenol	-9,38	-31,75
1,4-diclorbenzen	-9,39	-23,07
1,2,4,5-tetraclorbenzen	-9,45	-16,05

II.4.3.4. Studiul de retenție și separare a patru izomeri ai hexaclorciclohexanului pe o fază staționară de tip pentafluorofenil-silicagel

Separarea izomerilor hexaclorciclohexanului (α , β , δ și γ) pe faza staționară de tip pentafluorofenil-silicagel s-a realizat la diferite compoziții ale modificatorului organic în faza mobilă obținându-se o rezoluție mai bună în cazul acetonitrilului decât pentru metanol. Cea mai bună separare a celor patru izomeri s-a obținut la 35 % ACN în faza mobilă, dar într-un timp de aproximativ 70 de minute ceea ce conduce la lărgirea picurilor cromatografice.

II.4.3.5. Comparatie între retenția și separarea pentru izomerii hexaclorciclohexanului pe faze staționare de tip C8, C18 și PFP

Studiile comparative pentru izomerii hexaclorciclohexanului efectuate pe trei faze staționare de tip octadecil-silicagel, octil-silicagel și pentafluorofenil-silicagel au evidențiat faptul că C18 și C8 oferă o rezoluție și selectivitate mai bună decât coloana de tip PFP după cum se poate observa din *Figurile 103 și 104*, deși timpul de separare este mai mic în cazul coloanei PFP.

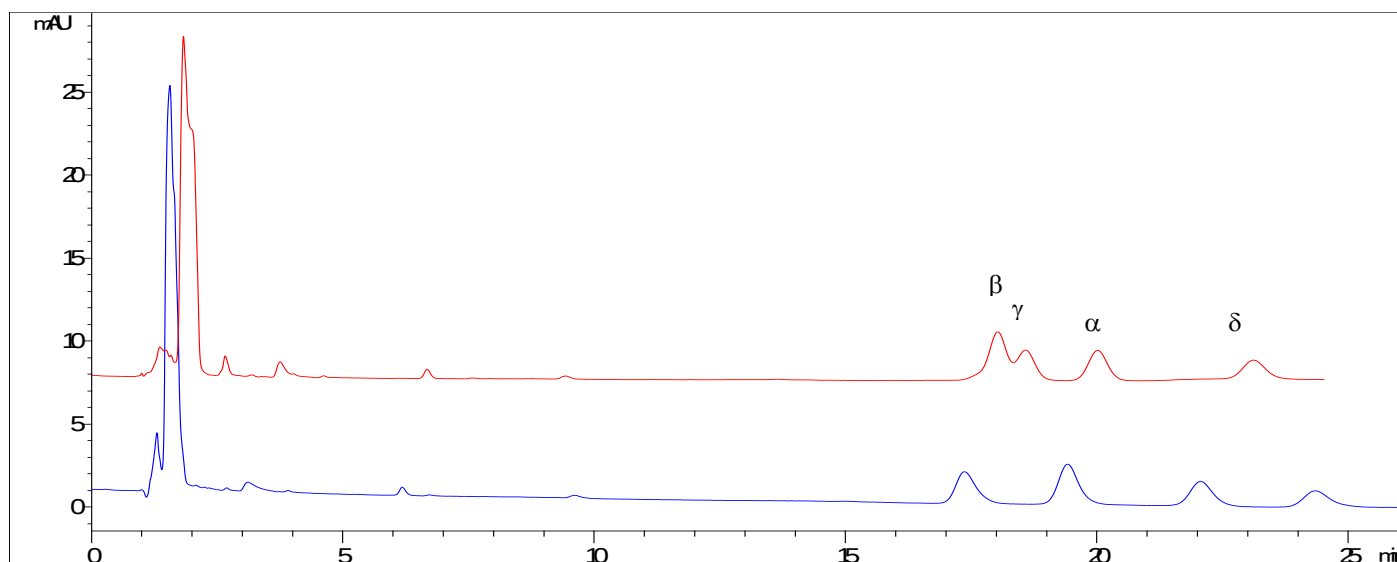


Figura 103. Cromatograme suprapuse obținute în urma injectiei unui amestec de HCH pe coloanele Zorbax Eclipse XDB C18 și C8, F.M. 50 % ACN:50 % H₂O, debit 1 mL/min, 200 nm, 25 °C

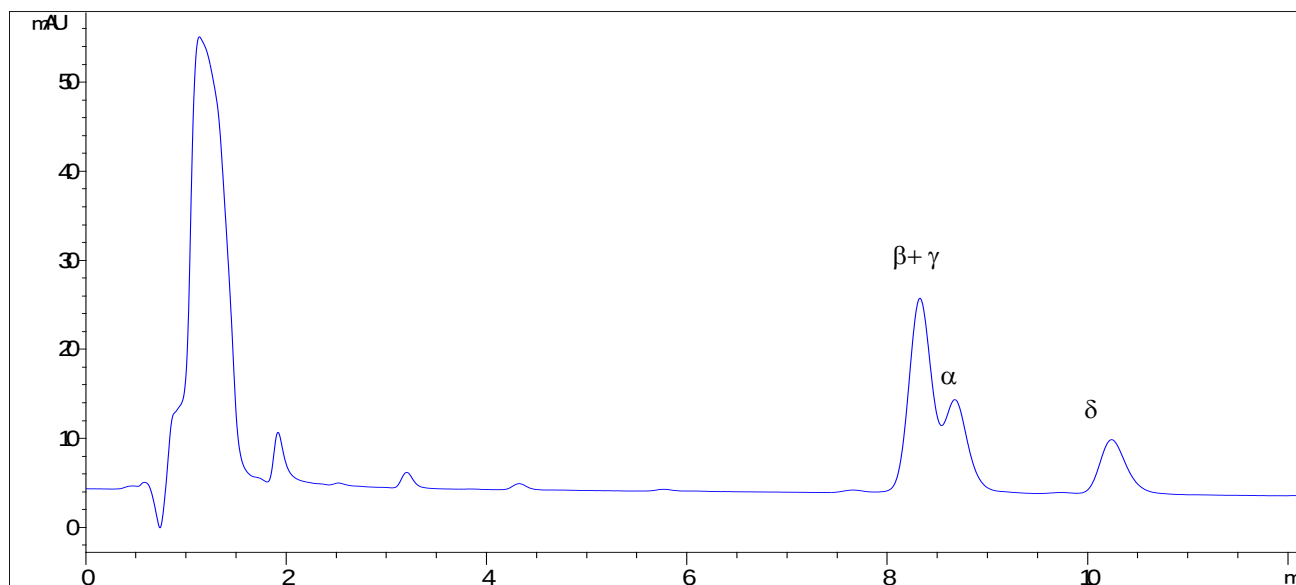


Figura 104. Cromatograma obținută în urma separării izomerilor HCH pe coloana Luna PFP, F.M 50 % ACN:50 % H₂O, debit 0,3 mL/min, 200 nm, 25 °C

II.5. Studii de retenție la injecția de volume mari de solvenți aromatici pe o fază staționară de tip fenil în cromatografia de lichide în fază inversă

II.5.1. Problematica studiului

În acest studiu s-a urmărit investigarea retenției a șapte compuși organici aromatici (fenol, acid acetilsalicilic, acid benzoic, alcool benzilic, codeină, trimetazidină, 4,4'-dipiridină) pe o fază staționară de tip fenilhexil-silicagel atunci când se utilizează pentru solubilizare și injectare solvenți aromatici dintr-o serie omoloagă (benzen, toluen, etilbenzen și propilbenzen).

II.5.3. Rezultate și discuții

S-a urmărit studierea influenței volumului de injecție (1-100 μL) și a tipului de solvent asupra retenției cromatografice a șapte compuși aromatici pe o fază staționară de tip fenilhexil-silicagel. În urma studiilor efectuate au fost obținute dependențe liniare ale factorului de retenție în funcție de volumul de injecție pentru toți cei șapte compuși studiați pentru toți cei patru solvenți folosiți.

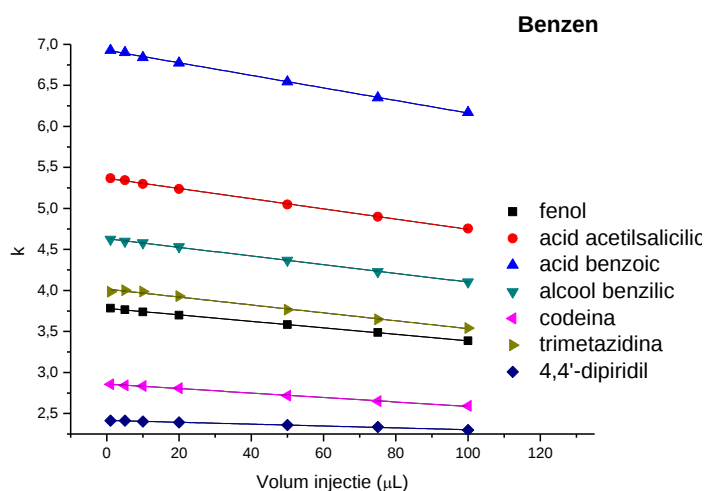


Figura 107. Dependența factorului de retenție de volumul de injecție pentru cei șapte compuși studiați utilizând benzenul ca solvent

Retenția compușilor scade linear cu creșterea cantității de solvent injectată în coloana cromatografică. Creșterea hidrofobicității solventului de la benzen la propilbenzen a avut o influență minimă asupra retenției compușilor, ceea ce arată că este posibil ca centrii de adsorbție ai fazei staționare să fie în mod egal ocupați.

Lista de articole publicate sau acceptate în cadrul tezei de doctorat

1. E.Bacalum, M.Rădulescu, E-E.Iorgulescu, V.David, Breakthrough parameters of SPE procedure on C18 cartridges for some polar compounds, *Revue Roumaine de Chimie*, **2011**, 56, 137-143. (Factor de Impact: 0,418).
2. E.Bacalum, M.Cheregi, V.David, Retention studies of polar compounds in solid-phase extraction on different bonded silica-based adsorbents, *Revue Roumaine de Chimie*, acceptat spre publicare în numărul 57 (4-5), **2012**. (Factor de Impact: 0,418).
3. E.Bacalum, E-E.Iorgulescu, V.David, Enrichment of several benzodiazepines by solid phase extraction with octyl and phenyl silica based adsorbents, *Revue Roumaine de Chimie*, acceptat spre publicare în numărul 57 (7-8), **2012**. (Factor de Impact: 0,418).
4. T.Galaon, E.Bacalum, M.Cheregi, V.David, Retention studies for large volume injection of aromatic solvents on phenyl-silica based stationary phase in RP-LC, *Journal of Chromatographic Science*, acceptat spre publicare, **2012**. (Doi: 10.1093/chromsci/BMS122). (Factor de Impact: 0,884).
5. E.Bacalum, A.Tănase, V.David, Retention mechanism applied in solid phase extraction for some polar compounds, *Analele Universității din București, Seria Chimie*, **2010**, 19, 61-68.

Comunicări științifice

1. Elena Bacalum, Victor David, Comparative retention of some polar compounds on various modified silica based sorbents, Sesiunea de Comunicări Științifice Studentești, ediția a VII-a, 20 mai 2011.
2. Elena Bacalum, Victor David, Retention modelling in solid-phase extraction on different types of silica based sorbents, Summer School on Mathematics and Natural Sciences, 11-15 iulie 2011, București.
3. Elena Bacalum, Toma Galaon, Victor David, Retention studies of some organic compounds on pentafluorophenyl silica based stationary phase, Sesiunea de Comunicări Științifice Studentești, ediția a VIII-a, 18 mai 2012.