

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

TEZĂ DE DOCTORAT

**Studii de retenție privind influența
modificatorului organic în
cromatografia de lichide în faza inversă**

Doctorand:
Edvin Caiali

Conducător doctorat:
Prof. Dr. Victor David

Comisia de doctorat:

Președinte: Profesor Dr. Camelia Bala

Conducător de doctorat: Profesor Dr. Victor David

Referenți oficiali:

1. Profesor Dr. Andrei Medvedovici, de la *Universitatea din București*
2. Profesor Dr. Ionel Ciucanu, de la *Universitatea de Vest Timișoara*
3. Profesor Dr. Ion Ion, de la *Universitatea Politehnica din București*

2020

Cuprins

1. Modele teoretice aplicate în cromatografia de lichide prin mecanism de fază inversă	6
1.1. Caracteristici ale fazelor staționare utilizate în RP-HPLC	6
1.1.1. Natura fazei staționare	6
1.1.2. Tipul de sinteză a fazei staționare	7
1.1.3. Gradul de acoperire al suprafeței	8
1.1.4. Inertizarea suprafeței silicagelului modificat (end-capping)	10
1.1.5. Tipul particulelor	11
1.1.6. Mărimea particulelor	11
1.1.7. Suprafața particulelor	12
1.1.8. Dimensiunea porilor	13
1.1.9. Coloane Monolitice	14
1.2. Rolul fazei mobile în eluția cromatografică prin mecanism de faza inversă	16
1.2.1. Modificatorul organic	17
1.2.2. Puterea elutropică	17
1.2.3. Agenți formatori de soluții tampon	19
1.2.4. Aditivi cu caracter hidrofob	21
1.2.5. Aditivi pentru formarea de perechi ionice	21
1.2.6. Influențe favorabile asupra detecției	22
1.2.7. Presiunea de lucru	23
1.3. Modele empirice de descriere a retenției cromatografice prin mecanism de fază inversă	24
1.3.1. Modele empirice cu o singură variabilă	25
1.3.2. Modele empirice cu multiple variabile	26
1.3.2.1. Sisteme ternare	27
1.3.2.2. Sisteme cu variație de pH și compoziția fazei mobile	27
1.3.2.3. Sisteme cu variație de T și compoziție fază mobilă	29
1.3.2.4. Sisteme cu variație de T, pH și compoziție fază mobilă	30
1.3.2.5. Utilizarea descriptorilor factoriali	30
1.4. Influența temperaturii asupra retenției cromatografice în mecanismul de fază inversă	30
1.4.1. Corelație retenție - temperatură	31
1.4.2. Efectul de compensare entalpie-entropie	33
1.5. Teoria compensației entalpie-entropie aplicată la retenția cromatografică ...	34

1.6. Modelul solvofobic de explicare a retenției cromatografice în mecanismul de fază inversă.....	37
1.6.1. Aplicații ale modelului solvofobic pentru echilibrul de partiție între faze lichide imiscibile.....	38
1.7. Modele moleculare de descriere a retenției cromatografice.	46
1.7.1. Modelul partiției.....	47
1.7.2. Modelul adsorbției	49
1.7.3. Partiție vs Adsorbție.....	49
1.7.4. Modelul puterii elutropice liniare	50
1.7.5. Modelul bazat pe parametrii de solubilitate.....	50
1.7.6. Modelul ET-30.....	51
1.7.7. Modele de retenție bazate pe parametri de polaritate	52
2. Parte Originală – Studii teoretice și experimentale.....	54
2.1. Studii de retenție cu aditivi cu caracter hidrofob în compoziția fazei mobile	55
2.1.1. Problematika studiului	55
2.1.2. Condiții experimentale.....	56
2.1.3. Rezultate și discuții	59
2.1.4. Modelarea rezultatelor obținute	64
2.1.4.1. Modelul competițional	64
2.1.4.2. Selectivitate metilenică	67
2.1.4.3. Corelarea parametrilor de lipofilicitate.....	70
2.1.5. Concluzii ale studiului cromatografic	78
2.2. Mărimi termodinamice calculate din studii de retenție cu aditivi hidrofobi..	79
2.2.1. Premizele studiului.....	79
2.2.2. Condiții experimentale.....	80
2.2.3. Rezultate și discuții	80
2.2.4. Mărimi termodinamice calculate din datele de retenție.....	85
2.2.4.1 Compensare entalpie-entropie	86
2.2.5. Concluziile studiului termodinamic	91
2.3. Raportul volumelor de fază mobilă / fază staționară ("phase ratio") în mecanismul de fază inversă.....	92
2.3.1. Premisele studiului cromatografic	92
2.3.2. Condiții experimentale inițiale.....	95
2.3.3. Rezultate și discuții	96
2.3.4. Concluzii intermediare.....	106

2.3.5. Raportul fazelor și constantele de echilibru.....	107
2.3.5.1. Premisele studiului.....	107
2.3.5.2. Condiții experimentale.....	110
2.3.5.3. Rezultate experimentale.....	112
2.3.5.4. Raportul fazelor	118
2.3.5.5 Compuși hidrofobi cu grupări polare.....	122
2.3.5.6. Rezoluție cromatografică.....	129
2.3.6 Selectivitate metilenică	131
2.3.6.1 Premisele studiului.....	131
2.3.6.2 Condiții experimentale.....	133
2.3.6.3. Rezultate și discuții.....	135
2.4. Influența interacțiunilor π - π asupra retenției cromatografice	140
2.4.1. Premisele studiului.....	140
2.4.2. Condiții experimentale.....	140
2.4.3. Rezultate și discuții.....	142
2.4.4. Corelații suplimentare.....	148
2.4.5. Concluzii.....	150
3. Concluzii finale.....	151
4. Articole Publicate.....	153
4.1 Lista lucrărilor publicate in cadrul tezei de doctorat:	153
4.2. Comunicări științifice.....	153
5. Referințe.....	154

2. Parte Originală – Studii teoretice și experimentale

Rolul fazei mobile în procesul de separare HPLC este la fel de important cu cel al fazei staționare, tocmai datorită faptului că partiția cromatografică are loc între cele două faze. Din diversitatea de mecanisme de separare cromatografică, aceasta lucrare se îndreaptă către cel mai important mecanism de separare HPLC, cel de fază inversă (RP-HPLC). Deși literatura de specialitate abundă de studii și cercetări privind acest mecanism de separare cromatografică, există încă un interes în cercetarea acestui proces de separare, cu multe direcții cum ar fi: i) mecanismul de bază al retenției cromatografice; ii) determinarea unor parametrii moleculari (indici de hidrofobicitate/lipofilicitate, constante de disociere, solubilități); iii) măsurarea unor mărimi termodinamice (variații de entalpie și entropie din date de retenție); iv) măsurarea volumului de fază staționară reală, implicat în procesul de retenție. Procesul de retenție cromatografică în separările bazate pe mecanism de fază inversă este unul complex, iar cunoașterea completă a acestuia permite, în principiu, determinarea unor mărimi fizico-chimice dificil de determinat prin alte metode de investigare [1]. În descrierea acestui proces, parametrii moleculari ai compușilor studiați reprezintă, de asemenea, o parte esențială în modelarea retenției cromatografice.

Există o multitudine de abordări privind modelarea procesului de retenție în RP-HPLC [2-4]. O primă clasă de modele sunt cele empirice, care descriu variația unor parametri cromatografici măsurăți din experimente în funcție de parametrii experimentali, printre care compoziția fazei mobile este cel mai cunoscut. Aceste modele permit la rândul lor estimarea unor mărimi moleculare ale compușilor studiați, prin interpolare sau mai ales prin extrapolarea funcțiilor stabilite, la anumite valori ale compoziției fazei mobile. Modelarea moleculară a procesului de partiție, fiind una complexă, este mai puțin studiată și practic se limitează la aplicarea teoriei solvofobice la echilibrul de partiție RP-HPLC. Modelele bazate pe corelarea mărimilor moleculare cu date de retenție cromatografică (cunoscute ca studii QSRR) sunt mai intens studiate și în multe situații acestea au capacitatea de predicție a comportării cromatografice la compuși noi. Un model mai util pentru studierea procesului RP-HPLC este cel termodinamic care cunoaște multe aplicații în studierea proceselor de distribuție inter-fazice, permițând, de exemplu, măsurarea mărimilor termodinamice fundamentale ale acestui proces (variația de entalpie liberă standard, variația de entalpie standard sau variația de entropie standard ce corespund transferului moleculelor de compuși (soluți) din faza mobilă în faza staționară).

În cadrul acestei lucrări de doctorat au fost studiate toate aceste trei modele, pe mai multe clase de compuși investigați, pe diferite tipuri de faze staționare utilizate în mod curent în mecanismul de fază inversă, pentru diverse faze mobile în compoziția cărora au intrat solvenți organici foarte uzuali (metanol, acetonitril, etanol) sau mai puțin studiați de literatura de specialitate (solvenți organici cu caracter mediu hidrofob). Rezultatele obținute au permis elaborarea unor modele noi de explicare a procesului de partiție cromatografică, fiind deja publicate în revistele de specialitate.

2.1. Studii de retenție cu aditivi cu caracter hidrofob în compoziția fazei mobile

2.1.1. Problematika studiului

Lipofilicitatea este unul din cei mai importanți parametrii fizico-chimici ce joacă un rol crucial în studiile farmacologice de activitate a medicamentelor, în particular asupra transportului prin membranele biologice [5,6]. În RP-LC retenția analiților este considerată a fi rezultatul competiției dintre interacțiunile hidrofobe cu lanțurile alchil hidrocarbonate din

faza staționară și interacțiunile solvilitice cu faza mobilă [7]. Conform modelului teoriei solvofobice adaptat pentru RP-LC de către Horvath et al [8], interacțiunea dintre solut și faza staționară este slabă și neselectivă. Mai mult, forța motoare ce determină fenomenul de separare cromatografică este interacțiunea nefavorabilă dintre solut și moleculele de apă înconjurătoare din faza mobilă. La ora actuală se acceptă că faza mobilă joacă un rol dominant în procesul retenției [9]. Pentru îmbunătățirea înțelegerii relației dintre $\log K_{ow}$ (sau diferiți parametri de lipofilitate calculați - $\log P$) și $\log k_w$ a fost studiată influența diferiților aditivi în faza mobilă [10-12].

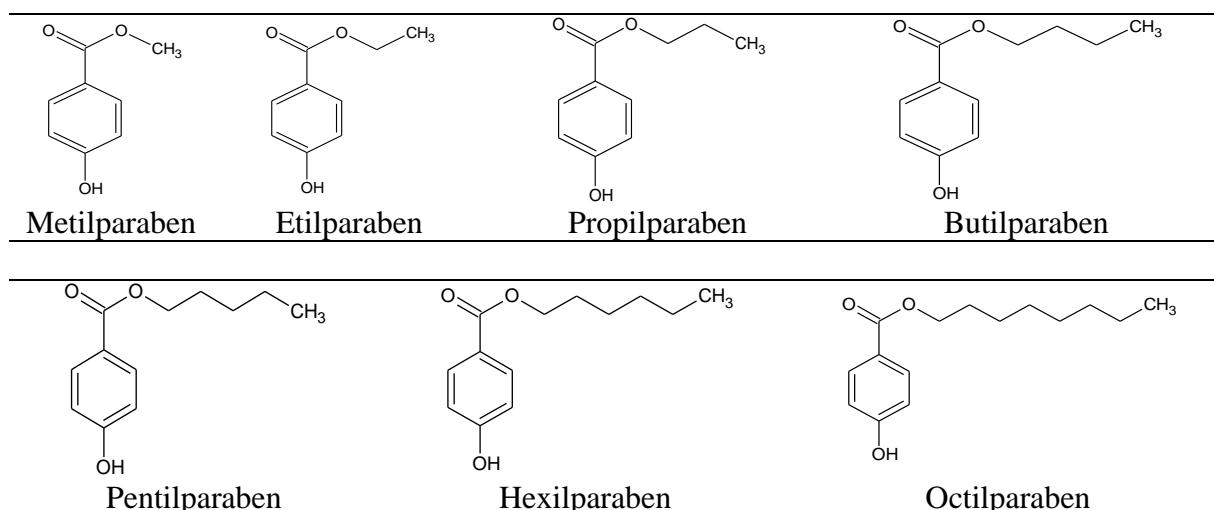


Figura 2.1.1. Structura analiților studiați

Scopul studiului a fost investigarea influenței alcoolilor de hidrofobicitate mică și medie ca aditivi în faza mobilă asupra evaluării cromatografice a lipofilității unei clase reprezentative de conservanți (parabeni). Substanțele alese sunt o serie omologă de alchil 4-hidroxibenzoați. Parabeni au un lanț alchil diferind prin numărul de grupări metilenice. Aceștia au importante efecte anti-microbiene și sunt folosiți în produse cosmetice, farmaceutice și alimente [13]. Pentru o parte din acești compuși s-au raportat valorile $\log K_{ow}$ în literatură [14].

2.1.3. Rezultate și discuții

Toate cromatogramele obținute au prezentat o delimitare clară a fiecărui peak și de asemenea, simetrii apropiate de 1. Simetria este măsurată ca raportul semi-lățimilor măsurate la linia de bază.

Retenția în RP-HPLC este influențată de natura solvenților folosiți ca modificatori organici în faza mobilă și de concentrațiile acestora. Această influență este descrisă de o relație generală de forma :

$$\log k = \alpha_0 + \sum_{i=1}^2 \alpha_i C_o^i, \quad (2.1.1)$$

unde α_0 și α_i sunt parametrii de regresie. În cazul de față a fost folosită o dependență mai simplă de ordin 1 : $\log k = \alpha_0 + \alpha_1 * C_o$.

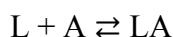
Toți coeficienții de corelație au avut valori foarte apropiate de 1 indicând o bună corelație și faptul că dependența într-adevăr poate fi modelată ca fiind liniară.

2.1.4. Modelarea rezultatelor obținute

2.1.4.1. Modelul competițional

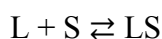
Pentru modelarea rezultatelor experimentale observate, se consideră un model competițional unde L reprezintă lanțurile hidrocarbonate al fazei staționare, S reprezintă aditivul organic hidrofob și A reprezintă analitul. Astfel se pot considera următoarele echilibre :

Pentru analit (A) :



$$K_{LA} = \frac{[LA]_s}{[L]_s * [A]_m} = \frac{[A]_s}{[L]_s * [A]_m} = \frac{1}{[L]_s} * \gamma_1 * K_{ow}^A \quad (2.1.1)$$

Pentru aditiv organic (S) :



$$K_{LS} = \frac{[LS]_s}{[L]_s * [S]_m} = \frac{[S]_s}{[L]_s * [S]_m} = \frac{1}{[L]_s} * \gamma_2 * K_{ow}^S \quad (2.1.2)$$

unde raportul $\frac{[A]_s}{[A]_m}$ reprezintă coeficientul de partiție a analitului între faza mobilă și faza staționară și este proporțional cu coeficientul de partiție apa-octanol K_{ow}^A , s-a notat cu γ_1 constanta de proporționalitate. Aceeași relație se aplică și pentru S.

Substituind $[L]_s$ din ecuația (2.1.2) în (2.1.1) rezultă :

$$K_{LA} = \frac{K_{LS}}{\gamma_2 * K_{ow}^S} * \gamma_1 * K_{ow}^A = \gamma * \frac{K_{ow}^A}{K_{ow}^S}, \text{ unde } \gamma \text{ este constanta rezultată din raportul } K_{LS} * \frac{\gamma_1}{\gamma_2}$$

Ținând cont de relația între k și $\frac{[A]_s}{[A]_m}$ și înlocuind în relația (2.1.1) rezultă :

$$k_A = \gamma * [L]_s * \frac{V_s}{V_m} * \frac{K_{ow}^A}{K_{ow}^S} \quad (2.1.3)$$

Deoarece concentrația lui L este mult mai mare decât concentrația lui A și raportul volumelor este constant pentru o coloană dată (egal cu $1/\Phi$), rezultă din relația (2.1.3), prin logaritmare, următoarea formulă ce leagă principalii parametrii hidrofobici implicați în retenție:

$$\log k_A = \Psi + \log K_{ow}^A - \log K_{ow}^S \quad (2.1.4)$$

Această ecuație ilustrează dependența factorilor de capacitate a compușilor studiați în funcție de hidrofobicitatea analiților și a aditivilor hidrofobi.

2.1.4.3. Corelarea parametrilor de lipofilicitate

Cel mai popular parametru cromatografic pentru lipofilicitate este factorul de capacitate izocratic ($\log k = \log \frac{t_r - t_0}{t_0}$, unde t_0 este timpul de retenție al unui compus nereținut, cum ar fi uracil) precum și factorul de capacitate extrapolat pentru o compoziție de 100% apă ($\log k_w$). Parametrul $\log k_w$ se determină prin extrapolarea graficului $\log k$ față de fracția volumică a modificatorului organic (φ) pentru o compoziție a fazei mobile de 100% apă. Această extrapolare se bazează pe modelul Snyder ce presupune o liniaritate între $\log k$ și φ , pe un domeniu limitat de compoziții ale fazei mobile [15] :

$$\log k = \log k_w - S \varphi \quad (2.1.6)$$

unde S este un parametru caracteristic solventului și φ este fracția volumică a solventului în faza mobilă [12]. Acest parametru S este considerat a fi foarte important pentru caracterizarea compușilor studiați într-un anumit sistem faza mobilă/staționară. O corelarea liniară dintre S și $\log k_w$ pentru un set de compuși indică o similitudine în interacțiile intermoleculare dintre solut și sistemul cromatografic. Parametrii de lipofilicitate propuși recent, cum ar fi media aritmetică a parametrilor de retenție (media valorilor $\log k - m \log k$) sau scorurile ($PCI/\log k$) corespunzătoare aplicării Principal Component Analysis (PCA) pe datele de retenție ($\log k$) au fost folosiți cu succes pentru analiza diferitelor clase de compuși.

La ora actuală sunt disponibile o gamă largă de baze de date și un număr mare de programe ce pot oferi datele experimentale pentru coeficienții de partiție 1-octanol/apă dar și pentru a calcula diferiți descriptori ai lipofilicității ($\log P$) pe baza diferiților algoritmi. Valorile parametrilor de lipofilicitate au fost calculați folosind Chem3D Ultra 8.0 ($\log P^C$ -prin metoda Crippen, $\log P^V$ -prin metoda Viswanadhan, $\log P^B$ -prin metoda Broto și $\log P^{(1)}$), ALCHEMY 2000 ($\log P^{(2)}$ prin aplicația SciLogP versiunea 2.2 și $\log P^{(3)}$ prin aplicația SciQSAR versiunea 3.0). În plus, a fost utilizat modulul disponibil online, ALOGPS (Virtual Computational Chemistry Laboratory), pentru calcularea a altor patru descriptori ai lipofilicității (ALOGPs, ALOGP, MLOGP, KOWWIN) și a doi parametri de solubilitate (ALOGpS și AC logS). Acești parametri calculați se regăsesc în continuare.

Parametrii experimentali de lipofilicitate obținuți din datele de retenție includ valorile $m \log k$ și $PCI/\log k$ dar și valorile $\log k_w$ și S (ecuația 2.1.6) obținuți prin extrapolarea valorilor $\log k$ pentru o compoziție a fazei mobile de 100 % apoasă. Profilele parametrilor investigați au demonstrat o comportare similară a compușilor în cazul folosirii alcoolilor cu lipofilicitate mică și valori ușor diferite pentru alcoolii cu lipofilicitate mare. În toate cazurile a fost observată o creștere a lipofilicității odată cu creșterea lanțului alchil al parabenilor.

Conform rezultatelor obținute, se poate considera că faza mobilă apă-hidrocarbură este mai bună pentru determinarea lipofilicității parabenilor decât amestecurile apă-hexanol și apă-octanol, în cazul coloanelor C18. Corelația dintre $\log K_{ow} - \log k_w$ și diferiți $\log P - \log k_w$ a fost investigată prin folosirea ecuațiilor de regresie de tip Collander. Pe baza celor mai buni parametri de regresie liniară a fost estimată valoarea parametrilor $\log K_{ow}$ pentru pentilparaben (PtyP) și octilparaben (OP).

2.1.5. Concluzii ale studiului cromatografic

Hidrofobicitatea este parametrul principal atunci când este discutată retenția cromatografică. Dacă schimbarea completă a naturii fazei mobile este un mod evident de a schimba hidrofobicitatea ei, aceasta aduce deseori incertitudini legate de natura fundamentală

a mecanismului de retenție. Adiția unor cantități mici de alcooli superiori ca aditivi de hidrofobicitate mică și medie oferă posibilitatea schimbării hidrofobicității fazei mobile, în pași suficienți de mici.

Rezultatele obținute în această secțiune au permis propunerea unui model competițional între moleculele de solut și aditivii din faza mobilă pentru explicarea tendințelor observate. Ecuația obținută descrie tendința de variație a $\log k_A$ pentru un analit A în anumite sisteme fază mobilă-fază staționară. Retenția compușilor scade odată cu scăderea hidrofobicității acestora și cu creșterea hidrofobicității aditivului folosit.

Selectivitatea metilenică a fost un alt parametru evaluat. Pe măsură ce procentul de modificador organic crește, selectivitatea metilenică scade, cel mai probabil datorită creșterii hidrofobicității aparente a fazei mobile. Este interesant de observat că există posibilitatea realizării unor baze de date de corespondență a aditivilor hidrofobi. Aceste tabele ar permite alegerea fazei mobile în funcție de selectivitatea metilenică dorită și de procentul de modificador organic acceptabil în faza mobilă. Astfel, se alege aditivul corect ce permite rularea unor faze mobile cu un conținut de modificador organic mai mic decât situațiile clasice.

Parametrii de lipofilicitate determinați experimental din datele de retenție au prezentat o corelație puternică cu valorile de referință $\log K_{ow}$ dar și cu diverși parametri de lipofilicitate calculați. Folosind rezultatele experimentale, au fost determinate cu acuratețe valorile $\log K_{ow}$ pentru doi dintre parabenii investigați (pencilparaben și butilparaben), ce nu erau raportate în literatură.

2.2. Mărimi termodinamice calculate din studii de retenție cu aditivi hidrofobi

2.2.1. Premizele studiului

Unul din parametrii ce pot influența retenția cromatografică este temperatura de termostatare a coloanei cromatografice [16]. Relația retenție – temperatură este folosită pentru estimarea parametrilor termodinamici aferenți procesului de partiție a substanțelor studiate într-un anumit sistem fază mobilă/fază staționară. Dependența factorilor de retenție de temperatura poate oferi informații asupra naturii interacțiunilor dintre analiți și faza staționară. Dacă această dependență este liniară ar putea sugera preponderența interacțiunilor hidrofobe, pe când deviațiile de la liniaritate pot sugera mecanisme de retenție complexe bazate atât pe interacțiuni hidrofobe cât și polare [17].

Cromatogramele obținute au prezentat o separare clară a compușilor aleși și o ușoară îmbunătățire a formei peak-urilor odată cu creșterea temperaturii. Acest efect este datorat cel mai probabil limitării dispersiilor longitudinale ca urmare a timpului de retenție mai mici.

După obținerea cromatogramelor și calcularea timpilor de retenție s-au trasat curbele van't Hoff și din valorile pantelor și intersecțiilor au fost calculate valorile entalpiei și entropiei

$$\log k = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} - \ln \Phi \quad (2.2.1)$$

Valorile entalpiei și entropiei calculate prezintă anumite variații interesante. În studiile anterioare s-a raportat o valoare relativ constantă a entalpiei cu modificarea compoziției procentuale a fazei mobile. În cazul de față se poate observa o variație puternică

a entalpiei în funcție de natura alcoolului folosit ca aditivi deși compoziția rămâne constantă la 50/50%. Acest lucru se poate explica dacă se consideră că pentru un sistem cu aceeași compuși dar în procente diferite se formează aproximativ aceleași asocieri analit-solvent și deci procesul de adsorbție este aproximativ același de fiecare dată. Pentru sistemele cu componenți diferiți aflați în același raport procentual se formează diferite asocieri analit-solvent și deci procesul de adsorbție este diferit pentru fiecare alcool în parte.

2.2.4.1 Compensare entalpie-entropie

Compensarea entalpie-entropie a fost studiată în condiții RP-LC pentru setul de 2 compuși model (propilparaben și butilparaben) și diverși aditivi hidrofobi (de la etanol până la octanol). Relația următoare descrie parametrii termodinamici :

$$\Delta H = T_c \Delta S + \Delta G_{T_c} \quad (2.2.2)$$

unde T_c este temperatura de compensare, ΔG_{T_c} este variația de energie liberă Gibbs la T_c iar ΔH și ΔS sunt variațiile de entalpie și entropie.

În plus față de datele de retenție prezentate anterior s-au efectuat teste pentru o compoziție cu 1.5 % modificador organici și pentru o coloană monolitică (Chromolith RP-C18). Astfel toate experimentele folosite pentru calculele de compensare entalpie-entropie sunt :

Zorbax XDB-C18 : 1% aditiv hidrofob, 1 mL/min, 50/50, 15-50 ° C

Zorbax XDB-C18 : 1.5% aditiv hidrofob, 1 mL/min, 50/50, 15-50 ° C

Chromolith RP-C18: 1% aditiv hidrofob, 1 mL/min, 50/50, 15-50 ° C

Chromolith RP-C18: 1% aditiv hidrofob, 1.5 mL/min, 50/50, 15-50 ° C

Pentru a investiga posibilitatea existenței unui mecanism de compensare entalpie-entropie au fost aplicate procedurile sugerate de Krug et al. [18] pentru a confirma dacă natura compensărilor entalpie-entropie observate este datorită unor fenomene fizico-chimice sau datorită variațiilor datelor experimentale. Procedurile sugerate sunt de natură statistică și au ca principal scop eliminarea ipotezei prin care tendințele observate ar fi parte din variațiile naturale ce pot apărea în cadrul experimentelor.

I. Primul pas pentru confirmarea existenței unui mecanism de compensare entalpie-entropie este calcularea T_c . După calcularea parametrilor termodinamici se reprezintă grafic $\Delta H = f(\Delta S)$ și din panta acestor curbe se determină T_c . Rezultatele obținute sunt în tabelul următor.

Tabel 2.2.4. Valorile T_c determinate din pantele curbelor $\Delta H = f(\Delta S)$

	Propilparaben 1 % Modificator	Butilparaben 1 % Modificator	Propilparaben 1,5 % Modificator	Butilparaben 1,5 % Modificator
Zorbax	397,69 K	395,41 K	417,39 K	425,96 K
Monolitic	Propilparaben 1 mL/min 401,69 K	Butilparaben 1 mL/min 399,75 K	Propilparaben 1,5 mL/min 400,06 K	Butilparaben 1,5 mL/min 400,12 K

II. Pasul următor este compararea valorii T_c calculate din $\Delta H = f(\Delta S)$ cu valorile T_c obținute din $\Delta H = f(\Delta G_{T_{hm}})$ și cu valoarea T_{hm} .

Tabel 2.2.5. Valorile T_c (° K) și domeniile de încadrare

Compus	Condiții experimentale	T_c calculat din $\Delta H = f(\Delta S)$	T_c calculat din $\Delta H = f(\Delta G_{T_{hm}})$	Domeniu	
				$T_c(\text{minim})$	$T_c(\text{maxim})$
Propilparaben	Zorbax 1 % modificador	397,69	413,92	367,63	427,74
	Zorbax 1,5% modificador	417,39	481,46	352,61	482,17
Butilparaben	Zorbax 1 % modificador	395,41	409,67	367,52	423,31
	Zorbax 1,5% modificador	425,95	469,42	370,41	481,51
Propilparaben	Monolitic 1 mL/min	401,69	405,39	385,99	417,4
	Monolitic 1 mL/min	400,06	404,91	382,6	417,53
Butilparaben	Monolitic 1,5 mL/min	399,75	403,67	383,82	415,67
	Monolitic 1,5 mL/min	400,12	403,24	385,61	414,63

Pentru calcularea valorilor ΔH și $\Delta G_{T_{hm}}$ (valorile energiei libere Gibbs la media armonică a temperaturilor) se trasează graficul $\ln k = f(1/T - \langle 1/T \rangle)$, unde $\langle 1/T \rangle$ reprezintă valoarea mediei armonică a parametrilor $1/T$, pentru fiecare alcool utilizat. Valorile ΔH și $\Delta G_{T_{hm}}$ se calculează conform relațiilor

$$\Delta H = -R(\text{pantă}) \quad (2.2.3)$$

$$\Delta G_{T_{hm}} = -RT_{hm}(\text{intersecție}) \quad (2.2.4)$$

Prin reprezentarea grafică $\Delta H = f(\Delta G_{T_{hm}})$ se calculează valoarea T_c conform expresiei:

$$T_c = T_{hm} / (1 - \frac{1}{\text{pantă}}) \quad (2.2.5)$$

După calcularea valorilor T_c acestea trebuie comparate cu valorile T_{hm} (media armonică a temperaturilor utilizate în studiu) pentru a verifica existența unor fenomene fizico-chimice. Pentru a efectua această comparație se compară valorile T_c estimate cu valorile minime și maxime calculate după relațiile :

$$T_c(\text{minim}) = T_c - t * [V(T_c)]^2 \quad (2.2.6)$$

$$T_c(\text{maxim}) = T_c + t * [V(T_c)]^2 \quad (2.2.7)$$

unde t este valoarea coeficientului Student (pentru situația de față cu 8 mărimi și un grad de încredere de 95% valoarea acestuia este de 1,86)

$$T_c = \frac{\sum(\Delta H - \langle \Delta H \rangle)(\Delta S - \langle \Delta S \rangle)}{\sum(\Delta S - \langle \Delta S \rangle)^2} \quad (2.2.8)$$

$$V(T_c) = \frac{\sum(\Delta H - \Delta G_{T_c} - T_c \Delta S)^2}{(m-2) \sum(\Delta S - \langle \Delta S \rangle)^2} \quad (2.2.9)$$

unde m este numărul de perechi de date experimentale, 8 în cazul de față

Domeniul calculat pentru T_c nu cuprinde valoarea T_{hm} (305,22° K pentru setul de temperaturi folosite) și deci indică existența unui fenomen de compensare entalpie-entropie.

III. Prin reprezentarea curbelor van't Hoff și trasarea curbelor de tendință se studiază zona de intersecție a acestora.

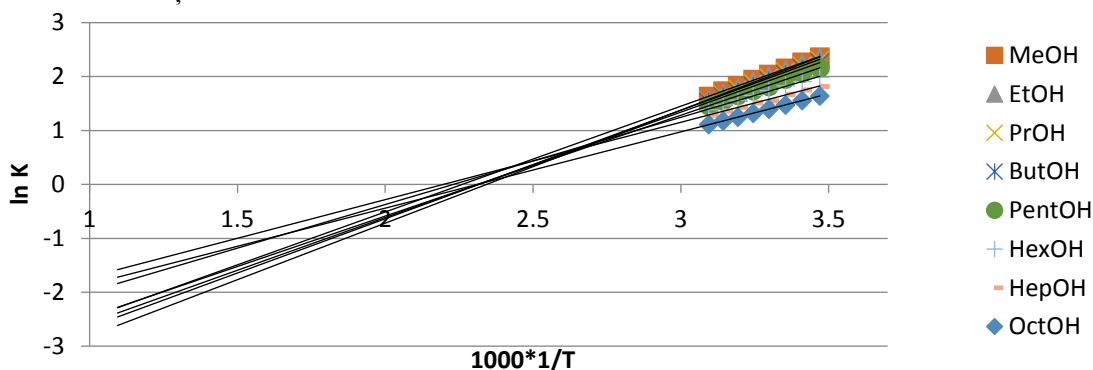


Figura 2.2.5. Curbele Van't Hoff pentru propilparaben și 1 % modificator pe coloana Zorbax

Pentru toate situațiile s-au obținut curbe ce se intersectează pe o zonă și nu într-un punct. Acest fapt este cel mai probabil datorită unor erori experimentale. Vizual se poate estima zona de intersecție pentru a estima un domeniu al T_c . Acest domeniu în toate situațiile nu a inclus T_{hm} .

IV. Ultimul test pentru confirmarea existenței unui mecanism de compensare entalpie-entropie este compararea probabilității intersecțiilor curbelor Van't Hoff cu probabilitatea de neintersecție. Pentru a evalua probabilitățile s-a folosit procedura ANOVA (analysis of variance). Dacă mecanismul de compensare entalpie-entropie este prezent atunci probabilitatea de intersecție are trebui să fie mult mai mare decât probabilitatea de neintersecție.

Pentru cazul propilparabenului și 1% modificator pe coloana Zorbax se observă că raportul $M_{scon}/M_{snoncon}$ este de aproximativ 10000 ori mai mare decât valoarea factorului F corespunzător indicând că probabilitatea intersecției este mult mai mare decât probabilitatea neintersecției. De asemenea valoarea raportului $M_{Snoncon}/M_{Se}$ este mult mai mic decât valoarea factorului F corespunzător și deci probabilitatea de neintersecție este mai mică decât erorile experimentale.

Aceleași tipuri de valori au fost observate pentru amândoi compuși în toate condițiile experimentale.

Tabel. 2.2.6 Calcule ANOVA pentru propilparaben și 1 % modificator pe coloana Zorbax

Surse de variație	Grade libertate	SS (Suma pătratelor)	MS (Medie pătratică)	
Total	63	SS t	5,920384	
Rânduri (aditiv)	7	SS r	2,7335978	
Coloane (temperatură)	7	SS c	3,1227001	
Interacțiuni	49	SS rc	0,0640864	
Pante	7	SS S	926572,42	
Concurente	1	SS con	926569,82	
Neconcurente	6	SS noncon	2,5962365	
Reziduali	42	SS e	-926572,4	
			MS con/MS noncon	2141337,631
			F(1, 6, 0,95)	234
			MS noncon/MS e	-1,96139E-05
			F(6, 42, 0,95)	3,78

După aceste teste putem trage concluzia că există o corelație între entalpie și entropie datorită existenței unui mecanism de compensare entalpie-entropie.

2.2.5. Concluziile studiului termodinamic

În cadrul acestui capitol a fost studiată retenția lichid cromatografică din punct de vedere termodinamic. Valorile entalpiei, entropiei și energiei libere Gibbs au fost calculate după care a fost studiată variația lor cu hidrofobicitatea aditivului organic. Rezultatele experimentale au sugerat o dependență de gradul doi a energiei libere Gibbs față de hidrofobicitatea aditivului ce sugerează mecanisme ce implică asocieri moleculare ca fiind baza procesului de adsorbție.

Un alt aspect investigat a fost existența unui mecanism de compensare entalpie-entropie. Conform procedurilor statistice s-a eliminat posibilitatea ca aceste observații experimentale sunt rezultatul erorilor normale de măsurare. Prin reprezentarea curbelor van't Hoff se obțin linii de tendință cu pante de aproximativ 0,75 sugerând că orice variație de entalpie este compensată într-o proporție de 75% de variația de entropie asociată.

2.3. Raportul volumelor de fază mobilă / fază staționară ("phase ratio") în mecanismul de fază inversă

2.3.1. Premisele studiului cromatografic

Caracterizarea coloanelor HPLC se face folosind mai mulți parametri printre care se află și raportul volumelor de faze "phase ratio" (Φ). Aceasta reprezintă raportul dintre volumul fazei staționare V_{st} și volumul fazei mobile V_o din coloană ($\Phi = V_{st}/V_o$) și influențează retenția și selectivitatea separării în HPLC, fiind inclus, de exemplu, în ecuația van't Hoff ca parte a termenului entropic. Măsurarea acestui parametru este dificilă deoarece nu există o limita de separare clară între cele două faze și natura diferită a fazelor mobile cauzează diferite grade de pătrundere a fazei mobile în faza staționară.

Dificultatea principală a determinării raportului volumelor de faze o reprezintă măsurarea valorii V_{st} . Pentru valoarea V_o este se poate folosi valoarea debitului fazei mobile (D) și a timpului mort t_o ($V_o = D t_o$). Determinarea timpului mort t_o poate fi efectuată prin: i)

determinarea exactă a timpului de retenție t_r pentru un compus nereținut (moleculă organică polară, cum ar fi uracil, o sare organică sau anorganică); *ii*) măsurarea diferenței de greutate a coloanei cromatografică când este umplută cu doi solvenți cu densități diferite; *iii*) măsurarea timpului până la apariția unei perturbări minore a liniei de bază din cromatogramă în cazul injectării fazei mobile deuterate sau a unui component din faza mobilă; *iv*) prin extrapolarea către punctul de 0 a graficului timpului de retenție t_r în funcție de numărul omolog a unei serii de compuși.

Pentru explicarea mecanismului de separare pe o coloană cromatografică RP se folosește momentan modelul partiționării pentru explicarea fenomenelor complexe ce au loc în cadrul acesteia. În cadrul acestui model raportul fazelor și mecanismul de retenție sunt strâns legate.

Recent, s-a propus o nouă metodă teoretică de evaluarea a raportului fazelor pentru o anumită coloană și o anumită fază mobilă [19]. Suportul teoretic pentru această metodă se bazează pe teoria solvofobică. În continuare s-a evaluat raportul fazelor pentru diferite coloane și diferite faze mobile.

Raportul fazelor este definit de expresia :

$$\Phi = \frac{V_{st}}{V_0} \quad (2.3.1)$$

unde V_{st} este volumul fazei staționare și V_0 este volumul mort al coloanei. Această expresie implică faptul că retenția în separarea RP-HPLC este un proces cu mecanism bazat pur pe partiție. Acest lucru a fost demonstrat în multe lucrări deși au fost propuse și alte modele.

Factorul de retenție k'_j pentru un compus j este dependent de raportul fazelor coloanei respective:

$$k'_j = K_j \Phi \quad (2.3.2)$$

unde K_j este constanta ce descrie echilibrul de partiție al compusului j între faza staționară și faza mobilă și depinde de natura analitului, a coloanei cromatografice și a fazei mobile pe când Φ este independent de analit.

Datorită importanței cunoașterii Φ există un număr considerabil de studii dedicate măsurării V_0 și estimării V_{st} . Pentru coloanele HPLC valoarea V_0 poate fi obținută prin folosirea unor procedee relativ simple cum ar fi măsurarea timpilor de retenție a unor compuși nereținuți. Spre deosebire de V_0 , V_{st} este dificil de calculat fără a cunoaște anumiți parametri (în cazul RP-HPLC: % de carbon, suprafața acoperită, număr atomi carbon per mol de silan, suprafața silicei, greutatea fazei staționare, densitatea grupărilor alchil, masa moleculară a silanului utilizat pentru fabricarea fazei staționare, etc). Chiar și cunoscând toți parametrii, calculul V_{st} nu poate ține cont de moleculele de solvent potențial imobilizate pe faza staționară și deci valoarea parametrului Φ nu poate fi estimată fără a ține cont de variația compoziției fazei mobile.

În rândul procedeelelor de evaluare a valorii Φ se distinge o procedură bazată pe măsurarea factorilor de retenție a unor hidrocarburi dintr-o serie omologă și folosirea

valorilor coeficienților de partiție apă/octanol $\log K_{ow}$ pentru aceeași compuși. Relația care arată dependența acestor parametrii este următoarea :

$$\log k'_j = a \log K_{ow,j} + \log \Phi \quad (2.3.3)$$

Dependența liniară dintre factorii de retenție și coeficienții de partiție apă/octanol a fost observată frecvent în literatura de specialitate. Această corelație a fost studiată și o posibilă explicație a fost publicată. Teoria solvofobică permite estimarea energiilor libere Helmholtz ale solutului j în două medii imiscibile A și B pentru echilibrul $j_B \leftrightarrow j_A$. Pe baza acestei estimări, constanta de echilibru poate fi obținută din formula:

$$\log K_{BA,j} = a'A_j + b'(V_j)^{-2/3} A_j + c'\mu_j^2 + d'\alpha_j \quad (2.3.4)$$

În formula (2.3.4) A_j este suprafața moleculară van der Waals, V_j este volumul molar, μ_j este momentul de dipol, iar α_j este polarizabilitatea, toate mărimile fiind caracteristice pentru solutul j. Parametrii a', b', c' și d' sunt constante pentru un anumit sistem. Prin simplificarea ecuației (2.3.4) se obține:

$$\log K_{BA,j} = a''A_j - b'' \quad (2.3.5)$$

În cadrul expresiei (2.3.5) a'' depinde doar de sistemul de solvenți BA și b'' depinde de funcționalitatea analitului j și de sistemul de solvenți. Valorile b'' sunt transferabile pentru o grupare funcțională specifică pentru orice compus j. În cazul hidrocarburilor s-a demonstrat ca valoarea acestui parametru este aproximativ 0. Prin aplicarea teoriei anterior prezentate pentru două echilibre separate a hidrocarburi j, în cazul unui sistem apă/octanol și un sistem fază staționară/fază mobilă rezultă:

$$\log K_{ow,j} = a''_j A_j \quad (2.3.6)$$

$$\log k'_j = a''_2 A_j + \log \Phi \quad (2.3.7)$$

Eliminarea termenului A_j între cele două ecuații rezultă în obținerea ecuației (2.3.3) ce este valabilă doar pentru o hidrocarbură.

Cele patru perechi consecutive de hidrocarburi aromatice au fost studiate prin acest procedeu teoretic pentru aflarea parametrului $\log \Phi$, dar care variază în funcție de perechile alese. Astfel valoarea cea mai mare pentru $\log \Phi$ a fost găsită pentru perechea propilbenzen/butilbenzen iar valoarea cea mai mică pentru perechea toluen/etilbenzen. Aceste observații se pot vedea în figurile 2.3.3, obținute pentru etanol ca și modificator organic.

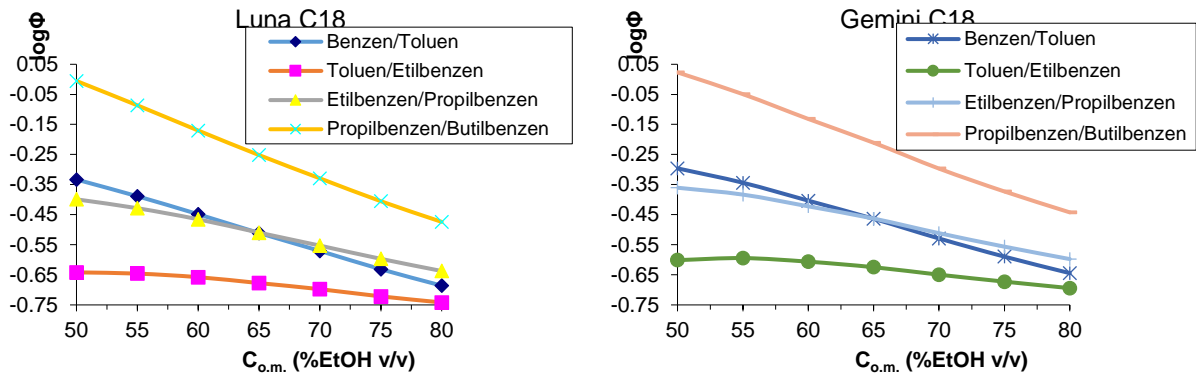


Figura 2.3.3. Comparație profil raport faze pentru diferite perechi de hidrocarburi aromatice folosind etanol ca modificator organic.

2.3.5. Raportul fazelor și constantele de echilibru

2.3.5.1. Premisele studiului

În secțiunile anterioare a fost studiat parametrul ce descrie raportul fazelor pentru un set de 3 coloane, un set de compuși omologi și 3 compoziții ale fazei mobile. Pentru a investiga detaliat aspecte privind selectivitatea metilenică și raportul fazelor au fost studiate un număr de 7 coloane cromatografice (dintre care 2 de tip core-shell), 4 seturi de compuși omologi și 2 compoziții ale fazei mobile.

Teoria solvofobică a fost folosită cu succes pentru explicarea retenției în cromatografia de lichide în fază inversă [7,8,20]. În cadrul acestei teorii pentru partiția unei specii j între două lichide imiscibile notate cu A și B, se poate scrie ecuația 2.3.4.

$$\log K_{BA,j} = aA_j + b(V_j)^{-2/3} A_j + c_j \mu_j^2 + d_j \alpha_j \quad (2.3.4)$$

unde A_j este suprafața moleculară van der Waals, V_j este volumul molar, μ_j este momentul de dipol, iar α_j este polarizabilitatea, toate mărimile fiind caracteristice pentru solutul j . Parametrii a , b , c_j și d_j depind de o mulțime de parametrii molecular cum ar fi : volum molar, diametre moleculare, presiuni critice, parametrii Kihara, potențiale de ionizare, tensiuni superficiale și constante dielectrice. Pentru un anumit număr de sisteme acești parametrii sunt disponibili în literatură [21-23], sau pot fi calculate cu anumite pachete software [24,25]. Chiar și în aceste condiții calcularea directă a valorii $\log K_{BA,j}$ este dificilă. Din fericire termenul $c_j \mu_j^2$ din ecuația 2.3.4 se poate elimina. Valoarea acestui termen ce depinde de momentul de dipol este foarte mic și ca atare poate fi neglijat pentru un număr ridicat de solvenți și soluți. Ecuația 2.3.4 devine astfel :

$$\log K_{BA,j} = aA_j + b(V_j)^{-2/3} A_j + d_j \alpha_j \quad (2.3.10)$$

Folosind anumite simplificări ecuația 2.3.10 devine :

$$\log K_{BA,j} = (a + b(V_j)^{-2/3} + d^*) A_j \quad (2.3.12)$$

unde d^* este un coeficient direct proporțional cu d_j . Ecuație 2.3.12 sugerează posibilitatea calculării constantei de distribuție $\log K_{BA,j}$ pe baza geometriei moleculei cu condiția cunoașterii parametrilor a' , b' și d^* . În plus această ecuație sugerează o potențială corelație liniară între $\log K_{BA,j}$ și suprafața van der Waals A_j cu condiția ca suma $a + b(V_j)^{-2/3} + d^*$ să aibă variații mici de la compus la compus și depinde doar de solvenții A și B. Ecuația 2.3.12 devine astfel :

$$\log K_{BA,j} = a' A_j \quad (2.3.13)$$

Dependența liniară exprimată prin ecuația 2.3.13 a fost observată experimental pentru sistemul A=octanol și B=apă utilizând o hidrocarbură ca specie j dar și pentru A=fază staționară C8/C18 și B=fază mobilă polară utilizând tot o hidrocarbură ca specie j [19].

Pentru a putea aplica ecuația 2.3.13 și altor compuși în afara hidrocarburilor implică introducerea unor corecții pentru entitățile polare prezente în aceste molecule. Pentru moleculele polare suprafața van der Waals A_j include atât componentele polare cât și pe cele nepolare. Deoarece ecuația 2.3.4 este bazată pe interacțiuni hidrofobe se presupune că partea polară a moleculei dizolvate într-un solvent polar nu contribuie la interacțiunile solvofobice, raportul componentei organice la suprafața van der Waals A_j trebuie substrasă din ecuația 2.3.13 :

$$\log K_{BA,j} = a'(A_j - \sum_i b_i'') = a' A_j - \sum_i b_i'' \quad (2.3.14)$$

unde a' depinde doar de sistemul de solvenți A și B iar b_i'' depinde de grupările funcționale ale analitului j și de sistemul de solvenți A și B. Valorile b_i'' sunt în mod ideal specifice diferitelor grupări funcționale și pot fi transferate de la un compus la altul pentru aceeași grupare funcțională. Ecuația 2.3.14 a fost verificată pentru sistemul octanol/apă pentru gamă variată de compuși. În acest caz ecuația 2.3.14 poate fi scris simplificat :

$$\log K_{ow,j} = a_1 A_j - b_1 \quad (2.3.15)$$

unde a_1 este un coeficient specific sistemului octanol/apă și $b_1 = \sum_i b_i''$

Pentru aplicarea modelului teoretic al partiției unui solut j între două lichide imiscibile A și B în cromatografia de lichide în fază inversă este necesar ca separarea cromatografică să fie descrisă ca partiție și guvernata în principal de interacțiuni solvofobice [19]. Pentru un sistem ce îndeplinește aceste condiții ecuația 2.3.14 duce la următoare expresie a factorului de capacitate:

$$\log k_j' = a' A_j - \sum_i b_i'' + \log \Phi \quad (2.3.16)$$

Pentru calcularea volumelor și suprafețelor van der Waals există date de literatură [82] și chiar pachete software [24]. Ecuația 2.3.16 poate fi rescrisă

$$\log k_j' = a_2 A_j - b_2 \quad (2.3.17)$$

unde a_2 este un coeficient specific fazei mobile și coloanei cromatografice utilizate iar $b_2 = \sum_i b_i'' - \log \Phi$. Expresiile 2.3.15 și 2.3.17 pot fi combinate pentru a forma :

$$\log k'_j = \frac{a_2}{a_1} \log K_{ow,j} + \left(\frac{a_2 b_1}{a_1} - b_2 \right) \quad (2.3.18)$$

Dependențe liniare între $\log k'_j$ și $\log K_{ow,j}$ au fost raportate experimental în mod repetat [26]. Pentru cazul special al unei hidrocarburi ca specie j , $\sum_i b_i'' = 0$ și notând $a = \frac{a_2}{a_1}$ expresia 2.3.18 devine :

$$\log k'_j = a \log K_{ow,j} + \log \Phi \quad (2.3.19)$$

Pentru echilibrul de partiție a speciei j între faza mobilă și faza staționară se poate scrie

$$k'_j = K_j \Phi \quad (2.3.20)$$

Prin compararea ecuațiilor 2.3.19 și 2.3.20 se poate concluziona că :

$$\log K_j = a \log K_{ow,j} \quad (2.3.21)$$

2.3.5.4. Raportul fazelor

Ecuția 2.3.19 a fost verificată pentru benzen, toluen, etilbenzen, propilbenzen și butilbenzen folosind diferite coloane și compoziții ale fazei mobile. Valorile $\log K_{ow}$ au fost preluate din tabelul 2.3.7 și valorile $\log k'$ au fost calculate conform procedurii descrise anterior. Figura 2.3.6 demonstrează o corelație liniară foarte bună între $\log k'$ și $\log K_{ow}$ (valorile r^2 au fost între 0,9957 și 0,9985). Valorile pantelor aferente $\log k' = f(\log K_{ow})$ pentru celelalte situații se pot regăsi în tabelele următoare.

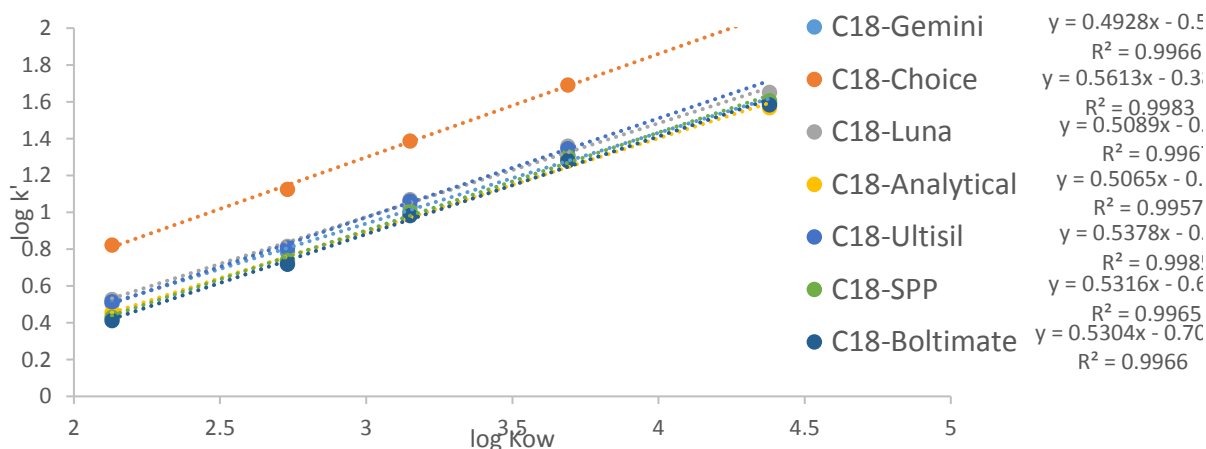


Figura 2.3.6. Exemplu $\log k' = f(\log K_{ow})$ pentru seria benzen-butilbenzen, folosind MeOH ca și modificator organic

Rezultatele obținute ilustrează o liniaritate comun întâlnită a dependenței $\log k'$ în funcție de $\log K_{ow}$ dar și o anumită similaritate între K_j pentru o anumită compoziție a fazei mobile și analit și diferitele coloane C18 (panta fiind proporțională cu acest parametru). Aplicarea ecuației 2.3.21 permite calcularea valorilor $\log K_j$ folosind valorile medii a ce se pot regăsi în tabelul 2.3.8

Valorilor a obținute pentru ACN sunt mai mici față de cele obținute pentru MeOH pentru același % de modificador organic deoarece ACN este considerat un solvent mai puternic decât MeOH.

Suplimentar din ecuația 2.3.19 se poate concluziona că intersecție regresiiilor liniare este de fapt $\log \Phi$, acesta valori se pot regăsi în tabelul 2.3.9. Se poate observa din acest tabel că raportul fazelor Φ variază cu compoziția fazei mobile .

Variația raportului fazelor cu compoziția fazei mobile și cu natura ei este rezultatul modificării limitelor dintre faza mobilă și faza staționară. Acetonitrilul este un solvent ce interacționează mai puternic cu faza staționară și prin urmare sistemele cu C18-Acetonitril sunt caracterizate de un raport al fazelor mai mare decât sistemele C18-Metanol, lucru ce se poate observa din tabelul 2.3.9

Tabel 2.3.9 Valorile $\log \Phi$ aferente $\log k' = f(\log K_{ow})$ pentru seria benzen-butilbenzen și faza mobilă MeOH/Apă cu 0,1% H3PO4 și pentru fază mobilă ACN Apă cu 0,1% H3PO4

% MeOH	C18-Gemini	C18-Choice	C18-Luna	C18-Analytical	C18-Ultisil	C18-SPP	C18-Boltimate
45	-	-	-	-	-	-0,6066	-0,6313
47,5	-	-	-	-	-	-0,6102	-0,6158
50	-	-	-	-	-	-0,6278	-0,6395
52,5	-	-	-	-	-	-0,6468	-0,6635
55	-	-	-	-	-	-0,6568	-0,6695
57,5	-	-	-	-	-	-0,6710	-0,6853
60	-0,5399	-0,3848	-0,5524	-0,6240	-0,6408	-0,6935	-0,7099
62,5	-0,5574	-0,3903	-0,5748	-0,6385	-0,5843	-	-
65	-0,5739	-0,4066	-0,5861	-0,6552	-0,6003	-	-
67,5	-0,5941	-0,4219	-0,6003	-0,6743	-0,6195	-	-
70	-0,6126	-0,3663	-0,6176	-0,6969	-0,6426	-	-
72,5	-0,6331	-0,4550	-0,6386	-0,7206	-0,6623	-	-
75	-0,6570	-0,4759	-0,6631	-0,7419	-0,6835	-	-

%ACN	C18-Gemini	C18-Choice	C18-Luna	C18-Analytical	C18-Ultisil	C18-SPP	C18-Boltimate
30	-	-	-	-	-	-0,3926	-0,3798
32,5	-	-	-	-	-	-0,3682	-0,3840
35	-	-	-	-	-	-0,3775	-0,3919
37,5	-	-	-	-	-	-0,3676	-0,4008
40	-	-	-	-	-	-0,3965	-0,4199
42,5	-	-	-	-	-	-0,4131	-0,4363
45	-	-	-	-	-	-0,4339	-0,4674
47,5	-	-	-	-	-	-	-
50	-0,2803	-0,1377	-0,2633	-0,3555	-0,2629	-	-
52,5	-0,2810	-0,0922	-0,2730	-0,3758	-0,2794	-	-
55	-0,2961	-0,1218	-0,2884	-0,3705	-0,2980	-	-
57,5	-0,3308	-0,1470	-0,3166	-0,4254	-0,3234	-	-
60	-0,3594	-0,1733	-0,3449	-0,4557	-0,3510	-	-
62,5	-0,3681	-0,2047	-0,3719	-0,4838	-0,3810	-	-
65	-0,4204	-0,2808	-0,4070	-0,5134	-0,4105	-	-

Pentru determinarea raportului fazelor este necesară minimizarea oricăror interacțiuni cu excepția celor de tip hidrofobic. Din acest motiv este recomandată utilizarea

hidrocarburilor sau compușilor cu grupări nepolare pentru determinarea raportului fazelor. În figura 2.3.7 este reprezentată variația parametrului a pentru seria benzen-butilbenzen pe cele șapte coloane și cei doi modificatori organici în funcție de procentul de componentă organică.

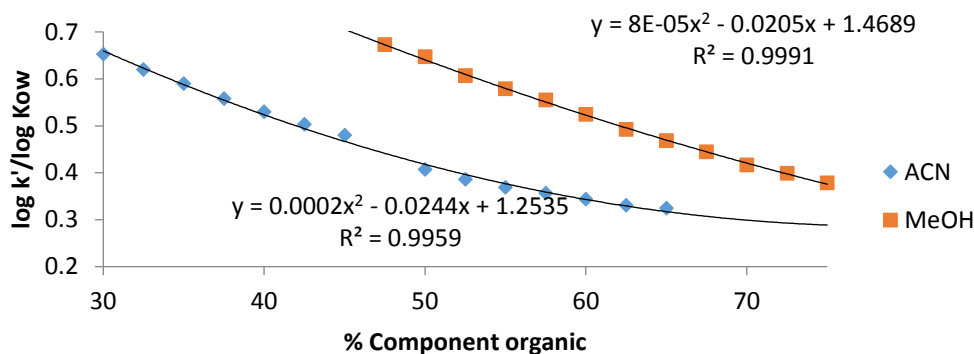


Figura 2.3.7. Reprezentare $\log k' / \log K_{ow}$ în funcție de % de componentă organică pentru seria benzen-butilbenzen

2.3.5.5 Compuși hidrofobi cu grupări polare

În cazul compușilor hidrofobi care conțin grupări polare ecuația 2.3.18 poate fi scrisă ca:

$$\log k'_j = a \log K_{ow,j} + b \quad (2.3.22)$$

$$\text{unde } b = \frac{a_2}{a_1} \sum_i b''_i - \sum_j b'_j + \log \Phi \quad (2.3.23)$$

În ecuația 2.3.23 termenul $\sum_i b''_i$ este pentru sistemul octanol/apă iar termenul $\sum_j b'_j$ este pentru sistemul fază staționară/fază mobilă.

Expresia 2.3.22 nu poate fi folosită pentru calcularea valorilor K_j sau Φ deoarece valorile parametrului b sunt necunoscute. Acesta este motivul pentru care evaluarea raportului fazelor unei coloane cromatografice se face utilizând o serie omologă de hidrocarburi. În plus prezența grupărilor polare rezultă în influența altor tipuri de interacțiuni pe lângă cele hidrofobe asupra separării cromatografice. În practică se vor observa deviații ale valorii parametrului a față de valorile măsurate pentru seria de hidrocarburi.

2.3.6 Selectivitate metilenică

2.3.6.1 Premisele studiului

Selectivitatea metilenică este un parametru ce caracterizează hidrofobicitatea unei faze staționare și este definit ca

$$\alpha(CH_2) = \frac{k(X-CH_2-Y)}{k(X-Y)} \quad (2.3.30)$$

unde $\alpha(CH_2)$ este selectivitatea metilenică, iar k este factorul de retenție aferent compușilor $X - Y$ respectiv $X - CH_2 - Y$.

Valoarea selectivității metilenice este determinată experimental ca fiind constantă pentru o serie omologă pentru o anumită coloană și compoziție a fazei mobile, astfel dependența $\log k$ în funcție de numărul de grupări metilenice poate fi considerată ca fiind liniară. Din acest motiv valoarea selectivității metilenice poate fi obținută și din calcularea pantei β a liniei de tendințe aferente graficului $\log k$ în funcție de numărul de grupări metilenice.

Valoarea constantă a selectivității metilenice poate fi justificată dacă se consideră contribuția grupării metilenice la schimbarea energiei libere Gibbs asociată cu transferul unei molecule din faza mobilă în faza staționară ca fiind constantă.

O justificare teoretică pentru liniaritatea $\log k$ poate fi obținută folosind teoria solvofobică. În cadrul acestei teorii pentru partiția unei specii j între două lichide imiscibile notate cu A și B, se poate scrie ecuația 2.3.4.

$$\log K_{BA,j} = aA_j + b(V_j)^{-2/3} A_j + c_j \mu_j^2 + d_j \alpha_j \quad (2.3.4)$$

unde A_j este suprafața moleculară van der Waals, V_j este volumul molar, μ_j este momentul de dipol, iar α_j este polarizabilitatea, toate mărimile fiind caracteristice pentru solutul j . Folosind simplificările utilizate în capitolul anterior s-a ajuns la ecuația 2.3.16

$$\log k'_j = a' A_j - \sum_i b'_i + \log \Phi \quad (2.3.16)$$

Ariile și volumele moleculare van der Waals sunt proprietăți geometrice și pot fi calculate pe baza structurii moleculei și a razelor van der Waals. La ora actuală sunt disponibile multiple surse cu aceste mărimi [88,89] dar și diverse pachete software capabile de a le calcula [81]. Una din metodele de calcul a ariei van der Waals folosește următoare ecuație cu o aproximație bună [60]:

$$A = \sum_{atom} A_{atom} - \sum_{legături} C_{legături} - 13.75(m - 1) \quad (2.3.31)$$

unde termenul $\sum_{atom} A_{atom}$ se referă la suma ariilor per atomi individuali, iar termenul $\sum_{legături} C_{legături}$ se referă la suma ariilor legăturilor și termenul m este numărul de atomi din moleculă. Ținând cont de expresia 2.3.31 introducerea unei grupări metilenice suplimentare ($-CH_2-$) în compusul j induce o variație constantă a ariei van der Waals notată cu k . Astfel se poate scrie următoarea ecuație :

$$A_{j+n(CH_2)} = A_j + nk \quad (2.3.32)$$

Dependența liniară a ariei van der Waals în funcție de numărul de grupări metilenice este susținută de diferite metode teoretice de calcul [82,91]. Prin combinarea ecuației 2.3.32 cu ecuația 2.3.16 rezultă :

$$\log k'_{j+n(CH_2)} = a' A_j - \sum_i b_i'' + \log \Phi + n a' k \quad (2.3.33)$$

Ecuția 2.3.33 este echivalentă cu

$$\log k'_{j+n(CH_2)} - \log k'_j = n a' k \quad (2.3.34)$$

Ecuția 2.3.34 indică o creștere constantă a valorii $\log k'_j$ pentru o serie de compuși omologi. Deși creșterea este constantă valoarea exactă conform ecuației 2.3.33 este dificil de calculat deoarece valorile diferiților parametri sunt dificili de cunoscut. În orice caz, această ecuație oferă o justificare teoretică a dependenței liniare observate a $\log k'_j$ în funcție de numărul de grupări metilenice fără utilizarea unor ipoteze echivalente cu $\Delta(\Delta G_{CH_2}) = \text{constant}$.

În cadrul acestui model nu este necesară utilizarea unei serii specifice de compuși omologi pentru măsurarea valorilor $\alpha(CH_2)$. În practică este de preferat utilizarea unei serii de hidrocarburi aromatice omologe deoarece acestea prezintă aproape exclusiv interacțiuni solvofobice.

Tabel 2.3.14 Valorile $\log \alpha(CH_2)$ pentru MeOH ca și modificator organic

% MeOH		60	62,5	65	67,5	70	72,5	75
C18-Gemini	Alchilbenzeni	0,271	0,257	0,244	0,231	0,218	0,205	0,193
	Esteri benzoici	0,267	0,254	0,241	0,229	0,216	0,204	0,193
	Hidroxiesteri	0,270	0,259	0,247	0,236	0,225	0,214	0,203
	Hidroxiketone	0,285	0,273	0,263	0,252	0,242	0,232	0,222
C18-Choice	Alchilbenzeni	0,283	0,266	0,253	0,240	0,235	0,214	0,202
	Esteri benzoici	0,284	0,271	0,259	0,245	0,232	0,220	0,208
	Hidroxiesteri	0,290	0,278	0,266	0,253	0,242	0,231	0,220
	Hidroxiketone	0,305	0,293	0,281	0,270	0,260	0,249	0,239
C18-Luna	Alchilbenzeni	0,280	0,267	0,253	0,238	0,224	0,211	0,199
	Esteri benzoici	0,275	0,262	0,249	0,236	0,224	0,211	0,199
	Hidroxiesteri	0,277	0,266	0,254	0,242	0,230	0,219	0,208
	Hidroxiketone	0,290	0,279	0,268	0,258	0,246	0,236	0,226
C18-Analytical	Alchilbenzeni	0,281	0,263	0,250	0,237	0,225	0,213	0,201
	Esteri benzoici	0,276	0,263	0,251	0,239	0,226	0,214	0,202
	Hidroxiesteri	0,287	0,275	0,263	0,251	0,239	0,228	0,217
	Hidroxiketone	0,301	0,290	0,280	0,269	0,258	0,247	0,237
C18-Ultisil	Alchilbenzeni	0,270	0,266	0,253	0,240	0,228	0,215	0,204
	Esteri benzoici	0,276	0,263	0,251	0,240	0,229	0,215	0,204
	Hidroxiesteri	0,279	0,268	0,257	0,245	0,235	0,224	0,213
	Hidroxiketone	0,292	0,281	0,271	0,261	0,251	0,241	0,231
% MeOH		45	47,5	50	52,5	55	57,5	60
C18-SPP	Alchilbenzeni	0,385	0,370	0,356	0,332	0,317	0,303	0,290
	Esteri benzoici	0,369	0,354	0,340	0,329	0,316	0,329	0,288
	Hidroxiesteri	0,367	0,354	0,340	0,330	0,315	0,303	0,290
	Hidroxiketone	0,376	0,364	0,352	0,342	0,329	0,317	0,305
C18-Boltimate	Alchilbenzeni	0,390	0,371	0,356	0,335	0,317	0,303	0,290
	Esteri benzoici	0,378	0,353	0,342	0,326	0,313	0,299	0,288
	Hidroxiesteri	0,370	0,356	0,349	0,329	0,316	0,304	0,292
	Hidroxiketone	0,380	0,367	0,364	0,343	0,332	0,319	0,308

Ecuția 2.3.34 scrisă pentru o valoare $n=1$ este echivalentă cu

$$\log \alpha(CH_2) = \log k'_{j+(CH_2)} - \log k'_j = a' k \quad (2.3.35)$$

Deși ecuația 2.3.35 este o simplificare a ecuației 2.3.34 ea nu este utilă pentru calcularea valorilor $\log \alpha(CH_2)$ datorită dificultății calculării valorilor $a'k$. Din acest motiv ecuația 2.3.35 nu poate fi folosită pentru prezicerea variațiilor $\log \alpha(CH_2)$ la schimbarea coloanei sau fazei mobile.

Din tabelele 2.3.14 și 2.3.15 se poate observa că variația $\log \alpha(CH_2)$ de la o coloană la alta cu menținerea constantă a compoziției fazei mobile este minimă, acest lucru putând fi explicat de natura similară a coloanelor : toate coloane utilizate au grupări C18. În plus se poate observa pentru coloana C18-Choice, ce are un conținut procentual de carbon mare (27%), doar o ușoară creștere a $\alpha(CH_2)$. Pentru coloana core-shell Boltimate cu un conținut procentual de carbon mic (9%) se observă valori $\alpha(CH_2)$ relativ similare cu restul coloanelor. Deoarece valorile $\alpha(CH_2)$ variază puternic cu compoziția și nu cu coloana utilizată, s-a folosit media valorilor selectivităților metilenice pentru a studia variația acestora cu compoziția fazei mobile.

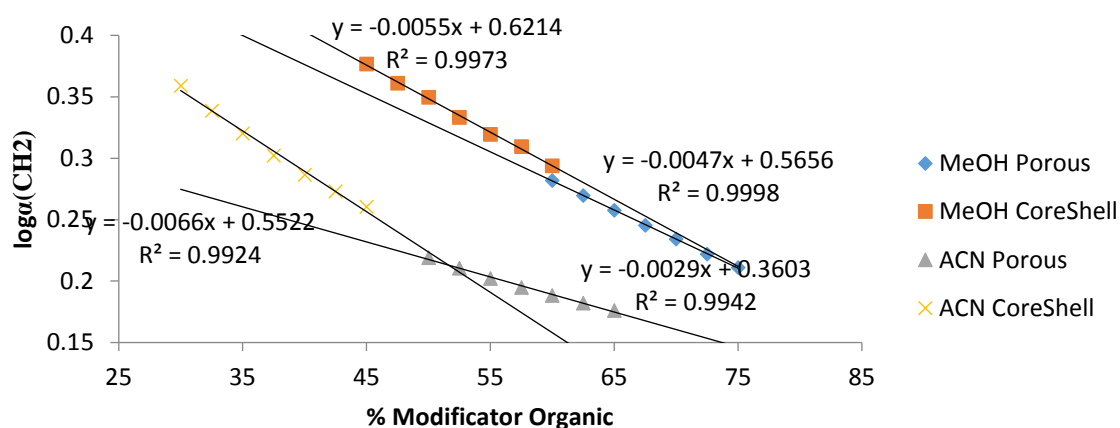


Figura 2.3.11. Variația mediei $\log \alpha(CH_2)$ pentru coloanele studiate în funcție de conținutul de modificador organic din faza mobilă.

Aceste rezultate arată o variație puternică a selectivității metilenice cu compoziția fazei mobile. Împreună cu variația mică asociată cu schimbarea coloanei cromatografice, selectivitatea metilenică se dovedește a fi un parametru relativ insensibil pentru a cuantifica diferențele în capacitatea de separare a diferitelor coloane cromatografice. Mai exact, o ușoară modificare a fazei mobile (ex 2.5%) generează o variație a selectivității metilenice egală sau mai mare decât folosirea altor coloane.

În practică, natura fazei staționare este cea care generează diferențe între selectivitățile diferitelor coloane. Conform rezultatelor prezentate în acest studiu selectivitatea diferită între diversele coloane C18 este rezultatul unor interacțiuni diferite de cele hidrofobice, în mod uzual cu grupările silanol reziduale. Grupările silanol reziduale participă la interacțiuni polare și justifică diferența de selectivitate observată pentru coloane C18 și compuși cu grupări polare.

Prin definiție, selectivitatea metilenică nu necesită folosirea hidrocarburilor pentru a fi măsurată experimental și conform teoriei expuse anterior orice serie omologă poate fi utilizată cu condiția existenței interacțiunilor hidrofobice ca și factor principal al separării. Reducerea interacțiunilor ce pot apărea în cadrul separărilor lichid cromatografice doar la interacțiuni hidrofobice nu este ușor de făcut. Din acest motiv se preferă utilizarea unor serii

omologe de hidrocarburi pentru limitarea interacțiunilor suplimentare. Chiar și în aceste situații pot apărea interacțiuni suplimentare de natură sterică sau de tip π - π în cazul hidrocarburilor cu structură aromatică. Datorită dificultăților aferente detecției hidrocarburilor în sistemele HPLC se preferă utilizarea hidrocarburilor aromatice.

Rezultatele experimentale sugerează că premisele teoriei conform căreia selectivitatea metilenică nu depinde de seria de compuși omologi utilizați este parțial confirmată. Nu se poate confirma existență numai a interacțiunilor hidrofobe în cazul coloanelor C18. Rezultatele selectivității metilenice sunt apropiate pentru serii omologe diferite cu diferențe în domeniul erorilor experimentale (4-5%). Se confirmă că natura fazei mobile influențează drastic selectivitatea metilenică pe când natura fazei staționare are o influență practic neglijabilă.

2.4. Influența interacțiunilor π - π asupra retenției cromatografice

2.4.1. Premisele studiului

Pentru separarea compușilor aromatici folosind faze staționare cu grupări fenil sau ciano un rol important îl joacă interacțiunile π - π [27]. Interacțiunile π - π joacă de asemenea un rol important în procesele de retenție LC a compușilor investigați cu structuri aromatice, bazate pe utilizarea acetonitrilului ca modificator organic al fazei mobile.

Afinitatea compușilor aromatici pentru faze staționare cu grupări fenil poate fi folosită pentru controlarea selectivității separării [28], dar și creșterea sensibilității în analiza HPLC bazată pe aplicarea de volume mari de injecție [29]. Anumite studii au concluzionat că interacțiunile π - π sunt condiționate de anumite cerințe geometrice și în realitate interacțiunile de tip π - π sunt de fapt rezultatul atracțiilor π - σ ce compensează pentru repulsiile π - π . În general, energiile implicate în aceste interacțiuni sunt comparabile cu cele implicate în interacțiunile van der Waals (8-30 KJ/mol).

Scopul acestei secțiuni este compararea retenției unui grup de cinci hidrocarburi aromatice pe trei coloane cu fază staționară de tip fenil, folosind două tipuri de fază mobilă (apă/metanol și apă/acetonitril).

Se poate observa că retenția cea mai mare o prezintă coloana Phenomenex Gemini C6-Phenyl. Acest fenomen este previzibil deoarece această coloană are cel mai mare procent de carbon din seria coloanelor studiate.

După obținerea cromatogramelor și calcularea timpilor de retenție s-au trasat curbele de $\log k$ în funcție de procentul de modificator organic, conform ecuației (Soczewinski-Snyder):

$$\log k = \alpha + \beta * C_{m.o.} \quad (2.4.1)$$

unde $\log k$ este logaritmul factorului de capacitate, $C_{m.o.}$ este concentrația volumică a modificatorului organic în faza mobilă, iar parametrii α și β sunt parametrii de regresie.

Parametrii α și β au fost calculați prin regresii liniare aplicate corelațiilor $\log k = f(C_{m.o.})$. Aceste regresii se pot găsi în tabelul 2.4.3 și demonstrează o corelație foarte bună între $\log k$ și $C_{m.o.}$. În figura 2.4.2 se pot observa dependențele liniare pentru seria de hidrocarburi studiată pe coloana Zorbax Phenyl cu modificator organic acetonitril.

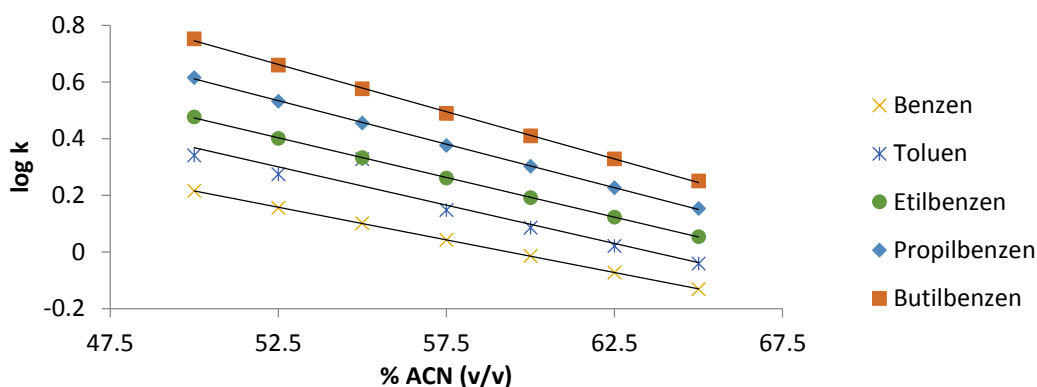


Figura 2.4.3. Regresie liniară $\log k = f(C_{o.m.})$ exemplificat pentru coloana Zorbax Phenyl și ACN ca și modificator

Din datele prezentate se observă că retenția hidrocarburilor studiate este mai mare pentru metanol comparativ cu acetonitril, folosite în același procent în faza mobilă. Această diferență devine evidentă prin compararea datelor de retenție în condiții identice (figura 2.4.4)

În studii anterioare s-a sugerat că folosirea acetonitrilului ca modificator organic în asemenea sisteme duce la o împiedicare a interacțiunilor $\pi-\pi$ între analiți și faza staționară [30]. Diferența dintre acetonitril și metanol observată ar putea confirma această ipoteză în condițiile în care analiții studiați nu conțin ale grupări funcționale și deci nu sunt implicate în alte interacțiuni cu componentele fazei mobile.

Comportarea cromatografică a celor trei coloane studiate a diferit în aceleași condiții experimentale și chiar similarității între fazele staționare. Acest lucru poate fi atribuit raportului fazelor, "phase ratio", diferit pentru fiecare coloană:

$$k = \Phi_{coloană} * K \quad (2.4.2)$$

unde $\Phi_{coloană}$ reprezintă raportul volumelor fazei staționare și fazei mobile, iar K reprezintă constanta de partiție pentru hidrocarbura studiată în sistemul faza mobilă – fază staționară și se consideră că este egal pentru fiecare coloană.

Raportul fazelor poate fi corelată prin aproximație cu conținutul procentual de carbon (%C) din faza staționară. O fază staționară cu un grad mai mare de carbon echivalează cu lanțuri hidrocarbonate mai dese și deci cu un volum al fazei staționare mai mare. Folosind %C putem sorta cele trei coloane în ordinea Phenomenex > Zorbax Eclipse > Brownlee Phenyl PE. Această ordine descrie de asemenea ordinea valorilor parametrilor extrapolați $\log k_w$, ce se respectă pentru fiecare hidrocarbură și modificator organic.

2.4.5. Concluzii

În cadrul acestui capitol a fost studiată retenția lichid cromatografică pentru analiți cu structuri aromatice folosind faze staționare de tip fenil. Retenția mai mare a fost observată pentru metanol folosit ca și modificator organic, comparativ cu acetonitril sugerând o posibilă interferență a acetonitrilului asupra interacțiunilor de tip $\pi-\pi$ între analiți și faza staționară.

Valorile extrapolate $\log k_w$ au prezentat o corelație foarte bună cu valorile $\log K_{ow}$ în ciuda folosirii fazelor staționare de tip fenil, sugerând o asemănare la nivel fundamental a mecanismului de partiție cromatografic.

3. Concluzii finale

În cadrul acestei teze au fost studiate aspecte ale mecanismului de retenție în cadrul RP-LC. Studiul a început prin modificarea caracterului hidrofob al fazei mobile prin adăugarea unor alcooli superiori rezultând în propunerea unui model competițional de retenție, unde moleculele de analit se află într-o competiție cu moleculele de solvent și exprimarea acestei dependențe printr-o ecuație de forma :

$$\log k_A = \Psi + \log K_{ow}^A - \log K_{ow}^S \quad (2.1.4)$$

Ecuația obținută descrie tendința de variație a $\log k_A$ pentru un analit A în anumite sisteme fază mobilă-fază staționară. Retenția compușilor scade odată cu scăderea hidrofobicității acestora și cu creșterea hidrofobicității aditivului folosit. Pe lângă $\log k_A$ a fost studiată retenția prin prisma selectivității metilenice și a diferiților parametri de lipofilitate. Prin extrapolarea datelor obținute se deduc diferiți parametri fără efectuarea experimentelor practice (ex. alegerea altei faze mobile cu selectivitate similară, estimarea parametrilor de hidrofobicitate pentru compuși necunoscuți etc)

Din punct de vedere termodinamic retenție este descrisă printr-o entalpie, entropie și energie liber Gibbs la fel ca orice alt proces. Adăugarea unui aditiv organic în faza mobilă a produce o variație a acestor parametri, rezultatele experimentale sugerând o dependență de gradul doi a energiei libere Gibbs față de hidrofobicitatea aditivului. Mecanismele de retenție ce implică asocieri moleculare sunt teoretizate ca fiind baza procesului de adsorbție.

Mărimile termodinamice măsurate au prezentat o corelație ce poate fi atribuită erorilor experimentale. Conform procedurilor statistice s-a eliminat posibilitatea ca aceste observații experimentale sunt rezultatul erorilor normale de măsurare. Prin reprezentarea curbelor van't Hoff se obțin linii de tendință cu pante de aproximativ 0,75 sugerând că orice variație de entalpie este compensată într-o proporție de 75% de variația de entropie asociată

Studierea retenției prin perspectiva fazei mobile nu poate oferi o imagine completă și în continuare a fost studiată influența fazei staționare. Prin folosirea diferitelor coloane cromatografice cu faze staționare de tip C18 și diferite clase de compuși a fost studiată influența asupra retenției prin prisma raportului fazelor, selectivității metilenice și rezoluției folosind modelul solvofobic.

$$\log K_{BA,j} = aA_j + b(V_j)^{-2/3} A_j + c_j \mu_j^2 + d_j \alpha_j \quad (2.3.4)$$

Raportul fazelor este un parametru ce caracterizează unic fiecare sistem fază staționară-fază mobilă. În cazul studiilor folosind seria de alchilbenzeni sa observat că odată cu creșterea raportului de componentă organică raportul fazelor scade. Astfel în cadrul volumului definit ca fiind interiorul unei coloane cromatografice o proporție mai mare este ocupată de faza mobilă. Interfața dintre faza staționară și faza mobilă este o barieră dinamică ce se modifică odată cu modificarea procentului de modificador organic. În esența gradul de

penetrare al lanțurilor hidrocarbonate de către faza mobilă crește cu cantitatea de modificator organic și are ca efect o micșorare a volumului ocupat de faza staționară.

Raportul fazelor variază atât de la o compoziție la alta dar și de la o coloană la altă. Variația între coloane este mult mai mică decât variația dintre compoziții sugerând o influență mult mai mare a fazei mobile. Diferențele ce apar între coloane pot fi justificate și dacă se ține cont de parametrii fizici diferiți ai suporturilor fazelor staționare (porozitate, suprafață, etc)

Pentru selectivitatea metilenică rezultatele experimentale sugerează că nu depinde de seria de compuși omologi. Indiferent de seria de compuși omologi utilizată sau de grupările funcționale ale acestora rezultatele selectivității metilenice sunt apropiate cu diferențe în domeniul erorilor experimentale (4-5%). Se confirmă că natura fazei mobile influențează drastic selectivitatea metilenică pe când natura fazei staționare are o influență practic neglijabilă.

Utilizarea coloanelor fenil a oferit o perspectivă asupra potențialelor interacțiuni de tip π - π între analiți și faza staționară în contextul modelului solvofobic. Valorile extrapolate $\log k_w$ au prezentat o corelație foarte bună cu valorile $\log K_{ow}$ în ciuda folosirii fazelor staționare de tip fenil, sugerând o asemănare la nivel fundamental a mecanismului de retenție chiar și în prezența unor interacții suplimentare.

4. Articole Publicate

4.1 Lista lucrărilor publicate in cadrul tezei de doctorat:

1. E.Caiali, V.David, *Retention behaviour of aromatic hydrocarbons in reversed-phase HPLC based on phenyl-silica stationary phase*. **Revue Roumaine de Chimie**, 64 (4), 367-372 (2019).
2. S.C.Moldoveanu, E.Caiali, V.David, *Results from solvophobic theory applied on methylene selectivity in reversed-phase HPLC*. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, 41 (1), 24-32 (2018).
3. E.Caiali, S.C. Moldoveanu, V.David, *Comparison of the phase ratio for C18 HPLC columns using three different organic modifiers (methanol, ethanol, and acetonitrile) in mobile phase composition*. **Revue Roumaine de Chimie**, 62 (8-9), 629-636 (2017).
4. S.C. Moldoveanu, E.Caiali, V.David, *Phase ratio and equilibrium constant in RP-HPLC obtained from octanol/water partition constant through solvophobic theory*. **Chromatographia**, 80 (10), 1491-1500 (2017).
5. E.Caiali, V.David, H.Y. Aboul-Enein, S.C. Moldoveanu, *Evaluation of the phase ratio for three C18 high performance liquid chromatographic columns*. **Journal of Chromatography A**, 1435, 85-91 (2016).
6. E.Caiali, D.Casoni, P. Ionita, V.David, C. Sârbu, *Parabens lipophilicity determination with mobile phases containing low and medium hydrophobic alcohols*. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, 37 (16), 2287-2301 (2014).

4.2. Comunicări științifice

1. Sesiunea de Comunicări Științifice Studentești, prezentare "Studiu termodinamic a doi parabeni prin cromatografie de lichide în fază inversă cu diferiți aditivi hidrofobi în faza mobilă", 22 Mai 2015, București, Romania

2. Sesiunea de Comunicări Științifice Studentești, prezentare "Thermodynamic study of the reversed-phase mechanism in liquid chromatography for mobile phases containing hydrophobic additives", 14 Iunie 2014, București, Romania

5. Referințe selective

1. J.G. Dorsey, W.T. Cooper, Retention mechanisms of bonded-phase liquid chromatography, *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 857A-867A.
2. R. Kaliszan, QSRR: Quantitative structure-(chromatographic) retention relationships, *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 3212-3246.
3. V. David, A. Medvedovici, Structure - retention correlation in liquid chromatography for pharmaceutical applications, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, **2007**, 30, 761-789.
4. D. Casoni, J. Petre, V. David, C. Sârbu, Prediction of pesticides lipophilicity from the computational molecular descriptors, *J. Sep. Sci.*, **2011**, 34, 247-254.
5. T. Hartmann, J. Schmitt, Lipophilicity – Beyond Octanol/Water: a Short Comparison of Modern Technologies, *Drug Discov. Today Technol.*, **2004**, 1, 431-439.
6. A. Nasal, D. Siluk, R. Kaliszan, Chromatographic Retention Parameters in Medicinal Chemistry and Molecular Pharmacology, *Curr. Med. Chem.* **2003**, 10, 381-426.
7. J.G. Dorsey, K. A. Dill, The Molecular Mechanism of Retention in RP-LC, *Chem. Rev.* **1989**, 89, 331-346.
8. Cs. Horváth, W. Melander, I. Molnár, Solvophobic Interactions in Liquid Chromatography with Nonpolar Stationary Phases, *J Chromatogr.* **1976**, 125, 129-156.
9. A. Vailaya, Cs. Horváth, Solvophobic Theory and Normalized Free Energies of Nonpolar Substances in Reversed Phase Chromatography, *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 5875-5888.
10. X. Liu, H. Tanaka, A. Yamauchi, B. Testa, H. Chuman, Determination of Lipophilicity by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Influence of 1-Octanol in the Mobile Phase, *J. Chromatogr. A* **2005**, 1091, 51-59.
11. X. Liu, H. Tanaka, A. Yamauchi, B. Testa, H. Chuman, H. Lipophilicity Measurement by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC): A Comparison of Two Stationary Phases Based on Retention Mechanisms, *Helv. Chim. Acta* **2004**, 87, 2866-2876.
12. C. Giaginis, S. Theocharis, A. Tsantili-Kakoulidou, Octanol/Water Partitioning Simulation by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography for Structurally Diverse Acidic Drugs: Effect of n-Octanol as Mobile Phase Additive, *J. Chromatogr. A* **2007**, 1166, 116-125.
13. R. L. Elder, Final Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, and Butylparaben. *J. Am. Coll. Toxicol.* **1984**, 3, 147-209.
14. T. Angelov, A. Vlasenko, W. Tashkov, HPLC Determination of pKa of Parabens and Investigation on Their Lipophilicity Parameters, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **2008**, 31, 188-197.

15. K. Valkó, L.R. Snyder, J.L. Glajch, Retention in Reversed-Phase Liquid Chromatography as a Function of Mobile-Phase Composition, *J. Chromatogr. A* **1993**, 656, 501-520.
16. J. Krupcik, E. Benicka, Selectivity tuning, Encyclopedia of Chromatography (J. Cazes, Ed.), Taylor and Francis, 3th Edition, **2009**, p. 2136-2142
17. L.C. Sander, L.R. Field, Effect of eluent composition on thermodynamic properties in high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.* **1980**, 52, 2009-2013.
18. R.R. Krug, Detection of the Compensation Effect (θ Rule), *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, **1980**, 19, 50-59.
19. S. Moldoveanu, V. David, Estimation of the phase ratio in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, **2015**, 1381, 194–201.
20. O. Sinanoğlu, Intermolecular forces in liquids. In: Hirschfelder JO (ed) *Advances in chemical physics*, vol 12. Wiley, New York, **1967**, 283–326
21. JJ Jasper, The surface tension of pure liquid compounds. *J Phys Chem Ref Data*, **1972**, 1, 841–1009
22. K.J. Miller, J. Savchik, A new empirical method to calculate average molecular polarizabilities, *J Am Chem Soc*, **1979**, 101, 7206–7213.
23. S.C. Moldoveanu, A. Savin, Aplicatii in chimie ale metodelor semiempirice de orbitali moleculari. Editura Academiei RSR, Bucuresti, **1980**, 193–199.
24. <http://www.chemaxon.com>.
25. M. Pitejean, On the analytical calculation of van der Waals surfaces and volumes: some numerical aspects, *J Comput Chem*, **1994**, 15, 507–523.
26. E. Talebian, M. Talebian, A general review on the derivation of Clausius–Mossotti relation, *Optik*, **2013**, 124, 2324–2326
27. G. Thevenon-Emeric, A. Tchaplá, M. Martin, Role of π - π interactions in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **1991**, 550, 267-283.
28. P. Stepnowski, J. Nichthauser, W. Mroziak, B. Buszewski, Usefulness of π ... π aromatic interactions in the selective separation and analysis of imidazolium and pyridinium ionic liquid cations, *Anal. BioAnal. Chem.*, **2006**, 385, 1483-1491.
29. 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, *J. Chromatogr. Sci.*, **2013**, 51, 166-172.
30. V. David, N. Grinberg, S.C. Moldoveanu, Long range molecular interactions involved in the retention mechanism in liquid chromatography, *Advances in Chromatography*, **2018**, 54, 77-110.