

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE
ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN CHIMIE

TEZĂ DE DOCTORAT

STUDII DE RETENȚIE A UNOR COMPUȘI DE
IMPORTANȚA BIOCHIMICĂ ÎN CROMATOGRAFIA DE
LICHIDE PRIN MECANISME BAZATE PE INTERACȚII
HIDROFILE

Coordonator științific:

Prof. Dr. VICTOR DAVID

Doctorand:

TĂNASE MARIA-ANTONIA

Comisia de doctorat:

Președinte: Prof. Dr. Camelia BALA

Conducător de doctorat: Prof. 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

2021

CUPRINS

Introducere	4
1.1. INTRODUCERE ÎN TEORIA MECANISMELOR DE RETENȚIE ÎN CROMATOGRAFIA DE LICHIDE	8
1.1.1. Clasificarea metodelor în cromatografia de lichide după principiul de bază	8
1.1.2. Modelarea retenției cromatografice folosind echilibrul de partiție lichid-lichid	13
1.1.3. Modelarea retenției cromatografice folosind echilibrul de adsorbție lichid solid	15
1.1.4. Alte tipuri de echilibre în cromatografia de lichide	17
1.2. FAZE STAȚIONARE UTILIZATE ÎN MECANISMELE DE SEPARARE HILIC ȘI ZIC-HILIC	18
1.2.1. Faze staționare nemodificate chimic	19
1.2.2. Faze staționare modificate chimic	19
1.3. PREZENTAREA MECANISMELOR DE SEPARARE HILIC ȘI ZIC HILIC	30
1.3.1. Contribuția stratului apos imobilizat la suprafața fazelor staționare	30
1.3.2. Contribuția interacțiilor electrostatice	34
1.3.3. Contribuția legăturilor de hidrogen	35
1.3.4. Mecanisme de retenție cromatografică în HILIC ȘI ZIC-HILIC	37
1.4. MODELAREA RETENȚIEI ÎN HILIC ȘI ZIC HILIC	41
1.4.1. Influența solventului organic din componența fazei mobile	41
1.4.2. Influența tăriei ionice a fazei mobile	42
1.4.3. Influența pH-ului fazei mobile	43
1.4.4. Influența temperaturii coloanei cromatografice	43
1.5. APLICAȚII CURENTE ALE MECANISMULUI CROMATOGRAFIC BAZAT PE INTERACȚII HIDROFILE LA SEPARAREA DE COMPUȘI POLARI	45
2.1. STUDIU DE RETENȚIE A UNOR AMINO-ACIZI FOLOSIND COLOANE UMPLUTE CU FAZE STAȚIONARE DE TIP SULFOBETAINIC ÎN MECANISMUL DE SEPARARE CROMATOGRAFICĂ BAZAT PE INTERACȚII HIDROFILE	49
2.1.1. Caracterizarea compușilor studiați	49
2.1.2. Cadrul experimental	50
2.1.3. Influența modifierului organic al fazei mobile asupra retenției cromatografice	51
Problematica studiului	51

Condiții cromatografice	51
Rezultate și discuții	52
Concluzii	60
2.1.4. Influența tăriei ionice a fazei mobile asupra retenției cromatografice	61
Problematica Studiului	61
Condiții cromatografice	61
Rezultate și discuții	62
Concluzii	66
2.1.5. Concluzii generale	66
2.2. STUDIU DE RETENȚIE A UNOR DIPEPTIDE FOLOSIND COLOANE UMPLUTE CU FAZE STAȚIONARE DE TIP SULFOBETAINIC ÎN MECANISMUL DE SEPARARE CROMATOGRFICĂ BAZAT PE INTERACȚII HIDROFILE	67
2.2.1. Caracterizarea compușilor studiați	67
2.2.2. Cadrul experimental	69
2.2.3. Influența modifcatorului organic al fazei mobile asupra retenției cromatografice	69
Problematica studiului	69
Condiții cromatografice	69
Rezultate și discuții	70
Concluzii	78
2.2.4. Influența tăriei ionice a fazei mobile asupra retenției cromatografice	79
Problematica Studiului	79
Condiții cromatografice	79
Rezultate și discuții	79
Concluzii	83
2.2.5. Concluzii generale	83
2.3. INFLUENȚA TEMPERATURII ASUPRA RETENȚIEI ÎN MECANISMUL DE SEPARARE CROMATOGRFICĂ BAZAT PE INTERACȚII HIDROFILE	84
2.3.1. Caracterizare compuși studiați	84
2.3.2. Cadrul experimental	85
2.3.3. Influența temperaturii asupra retenției unor aminoacizi în mecanismul de separare cromatografică bazat pe interacții hidrofile	86

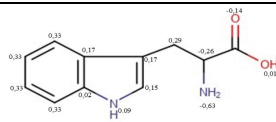
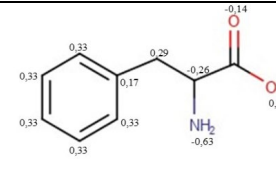
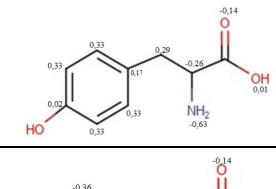
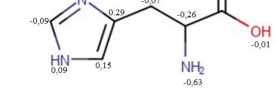
Problematica studiului	86
Condiții cromatografice	86
Rezultate și discuții	87
Concluzii	100
2.3.4. Influența temperaturii asupra retenției unor dipeptide în mecanismul de separare cromatografică bazat pe interacții hidrofile	101
Problematica studiului	101
Condiții cromatografice	101
Rezultate și discuții	102
Concluzii	114
2.3.5. Influența temperaturii asupra retenției unor compuși polari în mecanismul de separare cromatografică bazat pe interacții hidrofile	115
Problematica studiului	115
Condiții cromatografice	115
Rezultate și discuții	116
Concluzii	128
2.3.6. Concluzii generale	129
2.4. INFLUENȚA SOLVENTULUI PROBEI ȘI AL VOLUMULUI DE INECȚIE ASUPRA PARAMETRIILOR CROMATOGRAFICI ÎN MECANISMUL DE SEPARARE BAZAT PE INTERACȚII HIDROFILE FOLOSIND COLOANE UMPLUTE CU FAZE STAȚIONARE DE TIP SULFOBETAINIC	131
Problematica studiului	131
Cadrul experimental și condiții cromatografice	131
Rezultate și discuții	132
Concluzii	140
2.5. CONCLUZII GENERALE	142
ARTICOLE PUBLICE	144
CONFERINȚE ȘTIINȚIFICE	145
Bibliografie	146

Partea experimentală

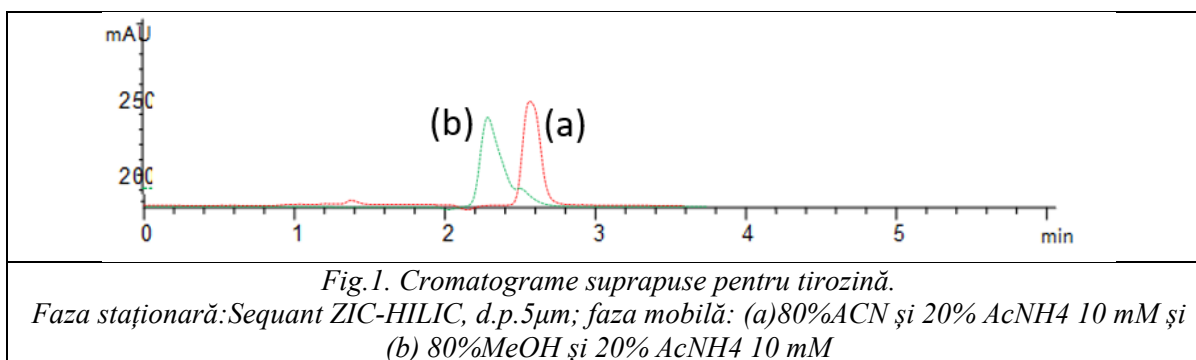
2.1. STUDIU DE RETENȚIE A UNOR AMINO-ACIZI PE COLOANE UMPLUTE CU FAZE STAȚIONARE DE TIP SULFOBETAINIC ÎN MECANISMUL DE SEPARARE CROMATOGRAFICĂ BAZAT PE INTERACȚII HIDROFILE

2.1.3. Influența modifierului organic al fazei mobile asupra retenției cromatografice

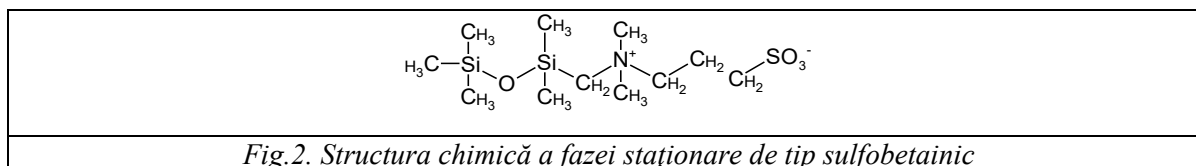
Tabel 1. Valorile pK_a , $\log K_{ow}$, $\log D$ ($pH=6$), μ , Sw și ale distribuției sarcinii pe fiecare atom pentru aminoacizii studiați.

Aminoacid	pK _a		log K _{ow}	log D (pH=6)	μ (D)	Sw (mg/L)	Sarcină/atom
	-NH ₂	-COOH					
Triptofan	9,396	-1,05	-1,05	-0,19	2,77	4193	
Fenilalanină	9,477	-1,28	-1,28	-1,18	2,22	3026,8	
Tirozină	9,125	-1,76	-1,76	-1,49	3,56	94372	
Histidină	9,253	-3,22	-3,22	-3,59	2,64	4193	

Retenția compușilor studiați este mai puternică în cazul folosirii acetonitrilului decât în cazul folosirii metanolului drept componentă organică în faza mobilă, după cum se poate observa în Figura 1. O posibilă explicație pentru acest comportament ar fi dezintegrarea stratului apos de la suprafața fazei staționare. Practic, moleculele de apă sunt înlocuite de moleculele de metanol, solvent protoic ce prezintă o capacitate mai mare de a forma legături de hidrogen creând o fază staționară mai hidrofobă [1]. Pe de altă parte, puterea de eluție a acetonitrilului este mai mică decât cea a metanolului având drept consecință timpi de retenție mai mari [2].



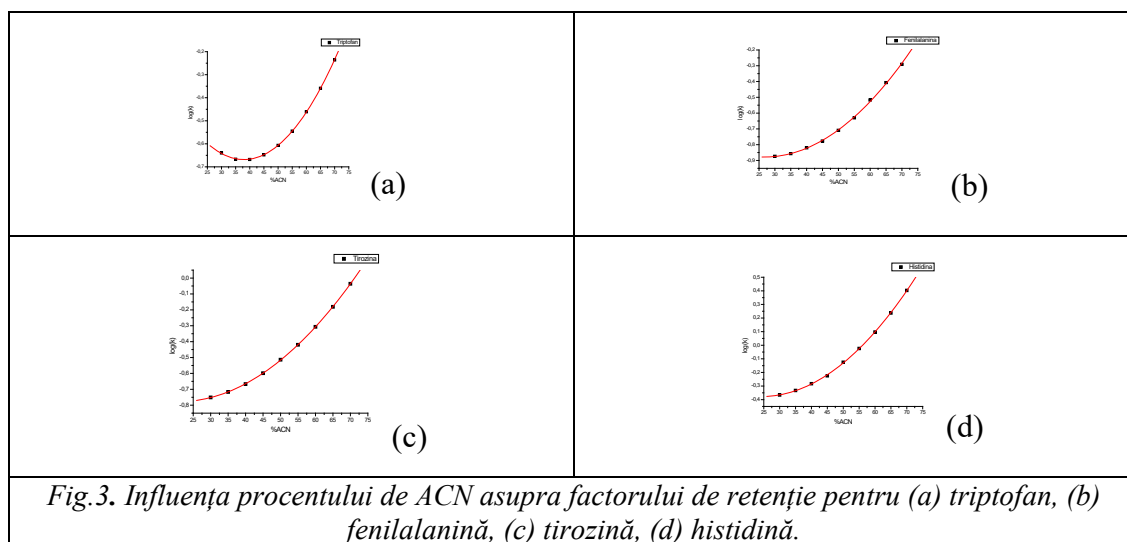
Complexitatea mecanismului de retenție în cromatografia de lichide bazată pe interacții hidrofile este evidențiată de comportamentul diferit al analiților studiați când faza mobilă conține modificatori organici diferiți. În cazul folosirii acetonitrilului drept componentă organică se observă o scădere a timpilor de retenție direct proporțională cu scăderea procentului de componentă organică, comportament tipic pentru separările HILIC, pe când în cazul metanolului timpul de retenție scade pentru tot intervalul studiat în cazul tirozinei; pe când în cazul celorlalți compuși, pentru procente de modificador organic între 70 și 55% tendința este scădere, urmată de o creștere în domeniul 40-30% sau 40-50% (în cazul triptofanului). În intervalul 55-40% valorile timpilor de retenție pentru histidină, fenilalanină și triptofan variază. Acest comportament este cauzat de creșterea concentrației de săruri din faza mobilă ce poate modifica valorile pKa-ului compușilor sau la disocierea grupărilor silanol reziduale de la suprafața silicei.



Valorile $\log k$ calculate pentru toți compușii studiați și diferite compoziții ale fazei mobile utilizate în experimentele efectuate au fost reprezentate grafic în funcție de procentul de modificador organic din faza mobilă. Aceste dependențe pot fi modelate matematic de o funcție polinomială de gradul doi, de forma :

$$\log k = A + B1 \cdot C_m + B2 \cdot C_m^2 \quad (1)$$

În care A, B1 și B2 sunt parametrii de regresie polinomială calculați cu ajutorul programului Origin iar C_m reprezintă procentul de componentă organică din faza mobilă. Valorile acestor parametrii sunt redați în Tabelul 2. După cum se poate observa, aceste regresii polinomiale de gradul doi sunt caracterizate de coeficienți de corelație buni, mai mari de 0,9.



Tabel.2. Parametrii de regresie pentru ACN ca modificador organic.				
ACN	Triptofan	Fenilalanină	Tirozină	Histidină
A	-0,0621	-0,6526	-0,6458	-0,15944
B ₁	-0,0319	-0,0169	-0,01273	-0,01801
B ₂	4,2177*10 ⁻⁴	3,1718*10 ⁻⁴	3,0619*10 ⁻⁴	3,7164*10 ⁻⁴
R ²	0,9999	0,9992	0,9999	0,9997

Dependențe polinomiale, în formă de U, sunt raportate în literatura de specialitate, atât pentru mecanisme de fază inversă, cât și pentru mecanisme bazate pe interacții hidrofile. Acestea sunt caracterizate de un punct minim situat în intervalul studiat de fază mobilă, sau în afara intervalului. Aceste curbe de eluție sunt descrise de ecuația (1), menționată anterior. În aceasta ecuație A reprezintă intersecția, adică valoarea extrapolată a factorului de retenție k ce corespunde unei faze mobile ce conține 100% componentă apoasă, parametru notat de regulă cu k_w . Din punct de vedere matematic, această curbă este caracterizată de un minim, notat cu $\log k_{\min}$, ce se poate obține punând condiția matematică $\frac{\partial \log(k)}{\partial C_m} = 0$. Acest punct minim de pe curba de eluție este caracterizat de o anumită valoare a concentrației de modificador organic, $(C_m)_{\min}$ și o valoare minimă a $\log k$, obținute utilizând următoarele ecuații:

$$(C_m)_{\min} = -\frac{B_1}{2B_2} \quad (2)$$

$$\log k_{\min} = A - \frac{B_1^2}{4B_2} \quad (3)$$

Valorile calculate pentru mărimile din ecuațiile de mai sus, pentru curbele de eluție în formă de U, sunt redată în tabelul următor.

<i>Tabel.3. Parametrii curbelor de eluție în formă de “U” pentru aminoacizii studiați.</i>				
Compus	Tirozină	Histidină	Fenilalanină	Triptofan
Modificator Organic Acetonitril				
$\log k_w$	-0,062	-0,652	-0,645	-0,159
$(C_m)_{\min}$	21,054	24,217	25,225	36,755
$\log k_{\min}$	-0,779	-0,376	-0,853	-0,510
Modificator Organic Metanol				
$\log k_w$	-0,019	-0,427	-0,418	-0,053
$(C_m)_{\min}$	45,690	39,062	30,090	40,350
$\log k_{\min}$	-0,293	-0,602	-0,508	-0,2547

Conform literaturii de specialitate, în cazul în care retenția cromatografică este descrisă de modelul partiției hidrofile, reprezentările grafice ce redau dependența retenției de procentul de modificator organic este redată de ecuația (4)

$$\log k = \log k_w - S\phi \quad (4)$$

Unde ϕ reprezintă fracția de volum a solventului tare (în acest caz apa) din faza mobilă, S este panta rezultată în urma unei reprezentări grafice conform unui model de regresie liniară, iar $\log k_w$ este retenția pentru o fază mobilă ce conține 100% componentă apoasă. Reprezentarea grafică $\log k$ vs fracția de volum ar trebui să fie o linie dreaptă pentru mecanismul de partiție.

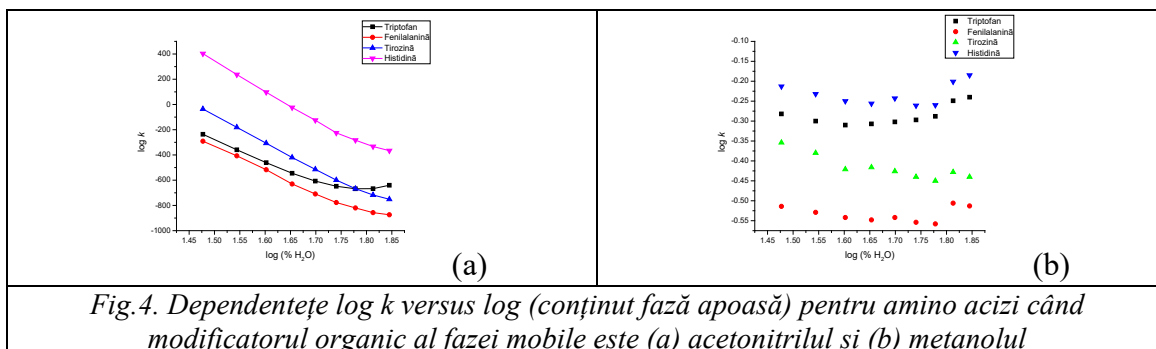
Dacă retenția se datorează adsorpției, atunci ecuația cea mai potrivită este Snyder – Soczewinski:

$$\log k = \log k_B - \frac{A_S}{n_w} \log \phi \quad (5)$$

Unde ϕ reprezintă fracția de volum a solventului tare din faza mobilă, $\log k_B$ este retenția folosind doar solventul B, A_S și n_w sunt ariile secțiunii transversale ocupate de molecula analitului la suprafață și molecula solventului (raportul A_S/n_w poate fi considerat o constantă ce poate fi estimată din reprezentarea grafică $\log k$ vs $\log \phi$). În acest caz, reprezentarea grafică $\log k$ vs $\log \phi$ ar trebui să fie descrisă de o linie dreaptă, pentru a confirma un mecanism de adsorpție[24].

Mecanismul de retenție pentru cei patru compuși a fost investigat pe baza celor două modele teoretice. După cum se poate observa în Figura 3, pentru acetonitril, dependențele $\log k$ vs conținutul componentei organice se pot reprezenta după o ecuație polinomială. În Figura 4 sunt reprezentate grafic valorile logaritmului zecimal al factorului de retenție în funcție de logaritmul zecimal al conținutului de fază apoasă pentru cazurile în care modificatorii organici ai fazei mobile sunt acetonitrilul sau metanolul. Aceste reprezentări grafice pot fi considerate polinomiale pentru toți compușii studiați.

Deoarece atât reprezentările grafice log-lin cât și cele log-log sunt descrise de funcții polinomiale, putem concluda că analiții sunt reținuți atât prin interacții directe cu faza staționară (mecanism de adsorpție) cât și indirecte prin partiția către stratul apos de la suprafața fazei staționare [25].



Parametrii pic-urilor cromatografice nu variază semnificativ în cazul modificării procentului de modifier organic al fazei mobile nici în cazul acetonitrilului nici în cazul metanolului. Cu toate acestea, în majoritatea cazurilor, valorile simetriei sunt mai mici ca 1, indicând apariția fenomenului de “tailing”, iar eficiența procesului cromatografic urmează o tendință de creștere când procentul de modifier organic scade.

Atât în cazul acetonitrilului cât și în cazul metanolului eficiența și simetria pic-urilor cromatografice se îmbunătățesc când procentul de componentă organică scade, și în consecință cantitatea de săruri crește, datorită suprimării interacțiilor electrostatice între grupările funcționale ale analiților și cele ale fazei staționare [26, 27].

2.1.4. Influența tăriei ionice a fazei mobile asupra retenției cromatografice

Tăria ionică a fazei mobile este un parametru ce afectează retenția în HILIC, prezența sărurilor în faza mobilă influențează efectele electostatice, atât pe cele de atracție cât și pe cele de repulsie. Creșterea concentrației de sare din faza mobilă duce la scăderea retenției dacă aceasta este influențată de interacții de schimb ionic de atracție sau la creșterea retenției dacă apar repulsii electrostatice [7]. În cazul folosirii unei faze mobile bogată în componentă organică, mecanismul de retenție nu este influențat semnificativ de concentrația acetatului de amoniu adăugat fazei mobile. Cu toate acestea, timpul de retenție scade semnificativ pentru histidină, mai puțin accentuat pentru triptofan, crește pentru fenilalanina și tirozina în intervalul 2,5-10mM și scade în intervalul 10-20mM. Scăderea timpilor de retenție ai tirozinei și fenilalaninei pentru

intervalul de concentrație 10-20 mM se datorează faptului că ionii disociați ai sărurilor acționează ca agenți de titrare pentru contraionii fazei staționare [28].

În intervalul de concentrație studiat, în cazul unei faze mobile ce conține mai puțină componentă organică, timpii de retenție sunt mai mici (mai ales în cazul histidinei) și nu se poate observa nicio tendință de creștere sau scădere a timpilor de retenție în funcție de concentrația de săruri adăugată componentei apoase a fazei mobile pentru niciun compus. În cazul în care retenția în HILIC este bazată pe un mecanism de schimb ionic, reprezentarea grafică a factorului de retenție în funcție de valoarea reciprocă concentrație de sare din componenta apoasă a fazei mobile ar trebui să fie descrisă de o funcție liniară. Pentru cazul în care faza mobilă a conținut un procent ridicat de componentă organică, graficele k vs $1/[AcNH_4]$ pot fi descrise de o funcție liniară (Fig.5(a)) ceea ce ar putea indica faptul că mecanismul de retenție dominant este de adsorbție bazat pe schimb ionic. În cazul în care faza mobilă a conținut un procent scăzut de component organic, graficele k vs $1/[AcNH_4]$ nu sunt descrise de o dependență lineară, (Fig.5(b)), mecanismul dominant nemaifiind bazat pe schimb ionic ci mai degrabă un mecanism mixt cu influențe atât din mecanisme de partiție cât și de adsorbție [5].

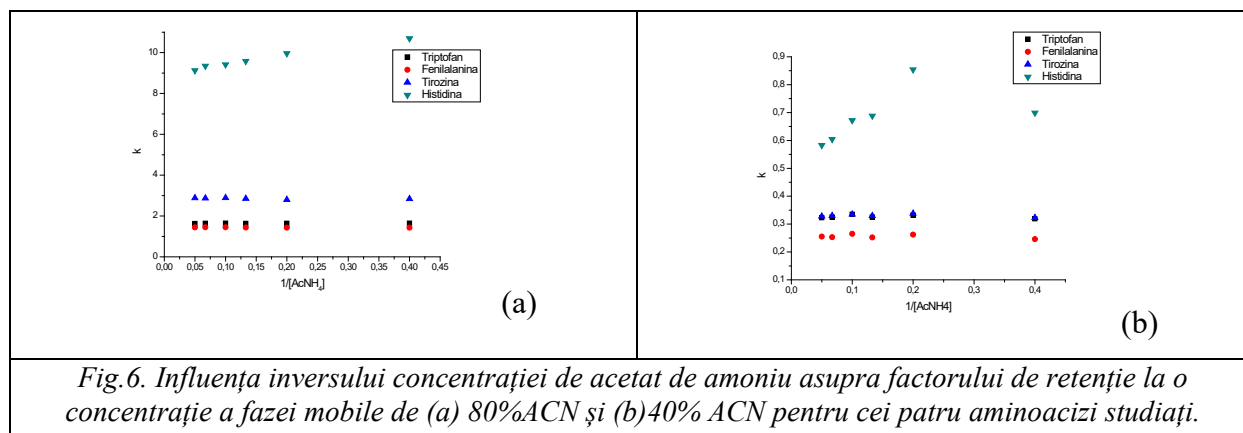


Fig.6. Influența inversului concentrației de acetat de amoniu asupra factorului de retenție la o concentrație a fazei mobile de (a) 80%ACN și (b) 40% ACN pentru cei patru aminoacizi studiați.

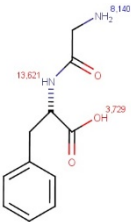
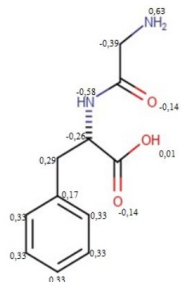
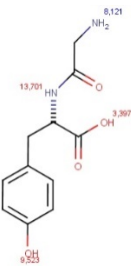
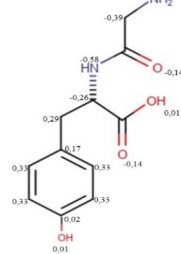
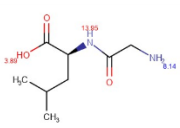
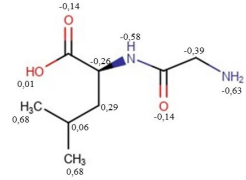
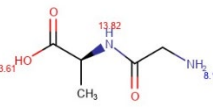
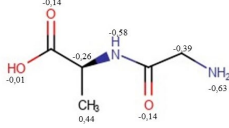
Asemănător studiului efectelor modifierului organic asupra retenției, nici în cadrul acestui studiu nu se observa variații ale simetriei sau eficienței pic-urilor cromatografice. În cazul unei faze mobile bogată în componentă organică, în afară de histidină, pentru toți ceilalți compuși valorile simetriei sunt mai mari ca 1, specific fenomenului de “fronting”. În literatura de specialitate acest fenomen este descris ca fiind cauzat de modificarea stratului apos de la suprafața fazei staționare [29]. În restul cazurilor, valorile simetriei sunt mai mici ca 1, indicând mecanisme multiple în procesul cromatografic. Creșterea pronunțată a valorilor eficienței în cazul

în care faza mobilă conține 40% modificador organic în componența subliniază suprimarea de către săruri a interacțiilor electrostatice prezente.

2.2. STUDIU DE RETENȚIE A UNOR DIPEPTIDE PE COLOANE UMPLUTE CU FAZE STAȚIONARE DE TIP SULFOBETAINIC ÎN MECANISMUL DE SEPARARE CROMATOGRAFICĂ BAZAT PE INTERACȚII HIDROFILE

2.2.3. Influența modificadorului organic al fazei mobile asupra retenției cromatografice

Tabel 4. Valorile pK_a , $\log K_{ow}$, $\log D$ ($pH=6$), μ , S_w și ale distribuției sarcinii pe fiecare atom pentru compușii studiați.

	pK_a	$\log K_{ow}$	$\log D$ ($pH=6$)	$\mu(D)$	S_w (mg/L)	Sarcină/atom
Glicil-l-fenilalanină		0,03	-2,29	5,42	1541	
Glicil-l-tirozină		-0,45	-2,6	5,08	12350	
Glicil-l-leucină		-0,43	-2,69	4,64	4229	
Glicil-l-alanină		-1,61	-3,95	4,74	104300	

Mecanismul de retenție în HILIC este bazat pe distribuția diferențială a moleculelor de analit între faza mobilă și stratul apos de la suprafața fazei staționare. Cu cât hidrofilicitatea analiților crește, echilibrul de partiție este deplasat spre dreapta iar analiții sunt reținuți mai

puternic [9]. De asemenea, cu cât valoarea momentului de dipol este mai mică, cu atât timpii de retenție ar trebui să fie mai mici [19]. În studiul celor patru dipeptide prezentate, se poate observa că timpii de retenție cresc în ordinea valorilor $\log k_{ow}$ și $\log D$ și invers față de valorile momentului de dipol: glicil-l-fenilalanină, glicil-l-tirozină, glicil-l-leucină, glicil-l-alanină pentru compoziții ale fazei mobile cuprinse între 55-70% acetonitril. Între 70-80% acetonitril ordinea de eluție este inversată între glicil-l-tirozină și glicil-l-leucină fiind posibil ca la procente mari de modificator organic valoarea pK_a -ului analiților să se schimbe față de valoarea acestuia în soluție apoasă [30].

În cazul folosirii acetonitrilului drept modificator organic, retenția analiților scade odată cu creșterea procentului de componentă organică, comportament specific separărilor HILIC. Cu cât procentul de solvent organic din faza mobilă crește, cu atât apa este mai puternic adsorbită la suprafața fazei staționare hidrofile, favorizând partiția lichid-lichid cu faza mobilă [31]. În cazul glicil-l-leucinei și glicil-l-alaninei, pentru compoziții ale fazei mobile cu mai puțin de 55% modificator organic, timpul de retenție scade sub timpul mort al coloanei, indicând interacții mai puternice ale analitului cu faza mobilă decât cu faza staționară.

Figura 8 prezintă reprezentarea grafică a valorilor calculate ale logaritmului zecimal al factorului de retenție în funcție de procentul de modificator organic din faza mobilă pentru glicil-l-fenilalanină și glicil-l-tirozină. Aceste dependențe pot fi modelate după o funcție polinomială de gradul 2, cu coeficienți de corelație mai mari de 0.9, indicând prezența și a altor mecanisme de retenție secundare, asociate adsorbției, în special legături de hidrogen și interacții ionice [24,32].

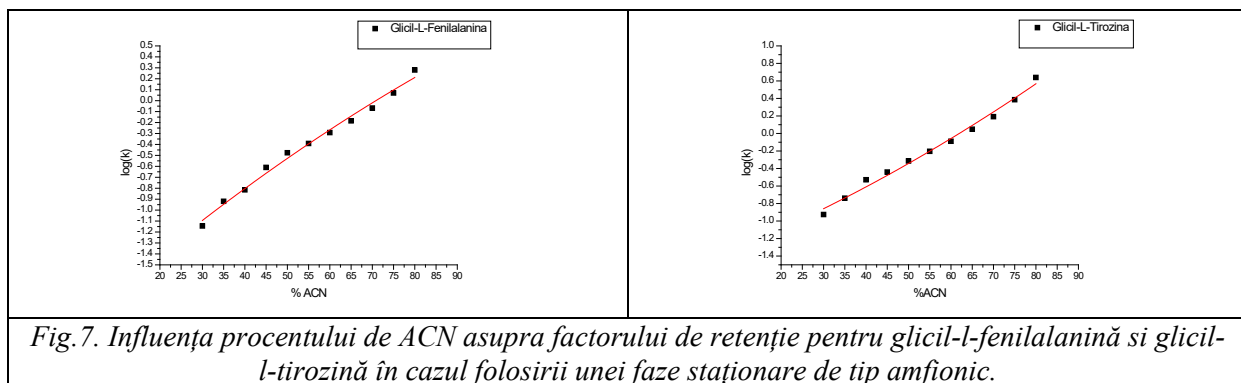


Fig.7. Influența procentului de ACN asupra factorului de retenție pentru glicil-l-fenilalanină și glicil-l-tirozină în cazul folosirii unei faze staționare de tip amfionic.

<i>Tabel.5. Parametrii de regresie pentru ACN ca modificator organic în cazul folosirii unei faze staționare de tip amfionic</i>		
	Glicil-l-fenilalanină	Glicil-l-tirozină
A	-2,05561	-1,4985
B₁	0,034	-0,0186
B₂	-7,420*10 ⁻⁵	9,0282*10 ⁻⁵
R²	0,987	0,986

În cazul înlocuirii acetonitrilului cu metanolul ca modificator organic al fazei mobile, pentru glicil-l-fenilalanină și glicil-l-tirozină, retenția este mai slabă, deși în cazul ambilor compuși studiați comportamentul este asemănător, în sensul în care retenția scade odata cu scăderea procentului de modificator organic. Valorile calculate pentru mărimile din ecuațiile (2) și (3) detaliate în capitolul anterior, pentru curbele de eluție în formă de “U” ale glicil-l-fenilalaninei și glicil-l-tirozinei, în cazul în care faza mobilă conține acetonitril sau metanol ca modificator organic, sunt redată în tabelul următor.

<i>Tabel.6. Parametrii curbelor de eluție în formă de “U” pentru dipeptidele studiate.</i>		
Compus	Glicil-l-fenilalanină	Glicil-l-tirozină
Modificator organic Acetonitril		
log k_w	-2,055	-1,498
(C_m)_{min}	22,91	9,960
log k_{min}	-1,665	1,587
Modificator organic Metanol		
log k_w	-2,017	-1,771
(C_m)_{min}	23,220	23,610
log k_{min}	-1,797	-2,015

La fel ca în cazul aminoacizilor influența modificatorului organic a fost studiată prin modelarea datelor conform ecuațiilor (4) și (5).

Reprezentările grafice de tip log-lin cât și cele log-log , pot fi considerate polinomiale pentru dipeptidele studiate, confirmând prezența unor mecanisme de retenție multiple, atât de tipul partiției hidrofile cât și de tipul adsorpției.

Timpii de retenție sunt mai mari în cazul folosirii unei faze staționare de tip silice decât în cazul folosirii unei faze staționare de tip sulfobetainic. Această observație are la baza faptul că interacțiunile între compușii studiați și acest tip de fază staționară sunt mai puternice.

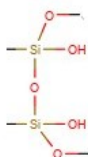


Fig.8. Structura chimică a fazei staționare de tip silice nemodificată chimic.

<i>Tabel.7. Parametrii de regresie pentru ACN ca modifier organic în cazul folosirii unei faze staționare de tip silice.</i>				
	Glicil-l-fenilalanină	Glicil-l-tirozină	Glicil-l-leucină	Glicil-l-alanină
A	-0,006	-0,0119	0,1646	-0,0223
B₁	-0,00558	-0,0031	-0,0193	-0,0113
B₂	$1,9916 \cdot 10^{-4}$	$2,1086 \cdot 10^{-4}$	$3,5613 \cdot 10^{-4}$	$3,4186 \cdot 10^{-4}$
R²	0,985	0,992	0,990	0,996

Pentru toți cei patru compuși se observă coeficienți de corelație mai mari decât în cazul folosirii unei faze staționare de tip sulfobetainic, indicând interacții suplimentare puternice între analiti și faza staționare, cel mai probabil cauzate de faptul că stratul apos este mai vast în cazul acestui tip de fază staționară, datorită unei concentrații mai mari de grupări silanol polare față de fazele staționare modificate chimic. Această particularitate permite procese de partiție mai pronunțate.

2.2.4. Influența tăriei ionice a fazei mobile asupra retenției cromatografice

Mecanismul de retenție HILIC este influențat puternic de contribuția tăriei ionice a fazei mobile. Prezența sărurilor în faza mobilă influențează interacțiile electrostatice între analit și faza staționară. Cele mai des utilizate săruri în HILIC sunt acetatul de amoniu și formiatul de amoniu datorită solubilității crescute a acestora în solventul fazei mobile.

Din datele experimentale obținute se observă că timpul de retenție este mai mare în cazul folosirii formiatului de amoniu decât în cazul folosirii acetatului de amoniu, puterea de eluție a ionului acetat este mai mică decât cea a ionului formiat [9].

În general, creșterea concentrației de săruri din faza mobilă are drept consecință scăderea interacțiilor electrostatice în cazul în care este folosită o fază staționară de tip sulfobetainic în separarea analiților ce pot ioniza. Deoarece tendința tuturor compușilor analizați este de creștere a timpului de retenție este posibil să existe interacții de tipul repulsiilor electrostatice între gruparea SO_3^- aparținând fazei staționare și grupările carboxil deprotonate ale analiților.

Întrucât reprezentarea grafică k vs $1/[\text{AcNH}_4]$ (Figura 9) nu este descrisă de o funcție liniară pentru niciunul din compuși, interacțiile de schimb ionic nu sunt cele care contribuie cel mai puternic la mecanismul de retenție.

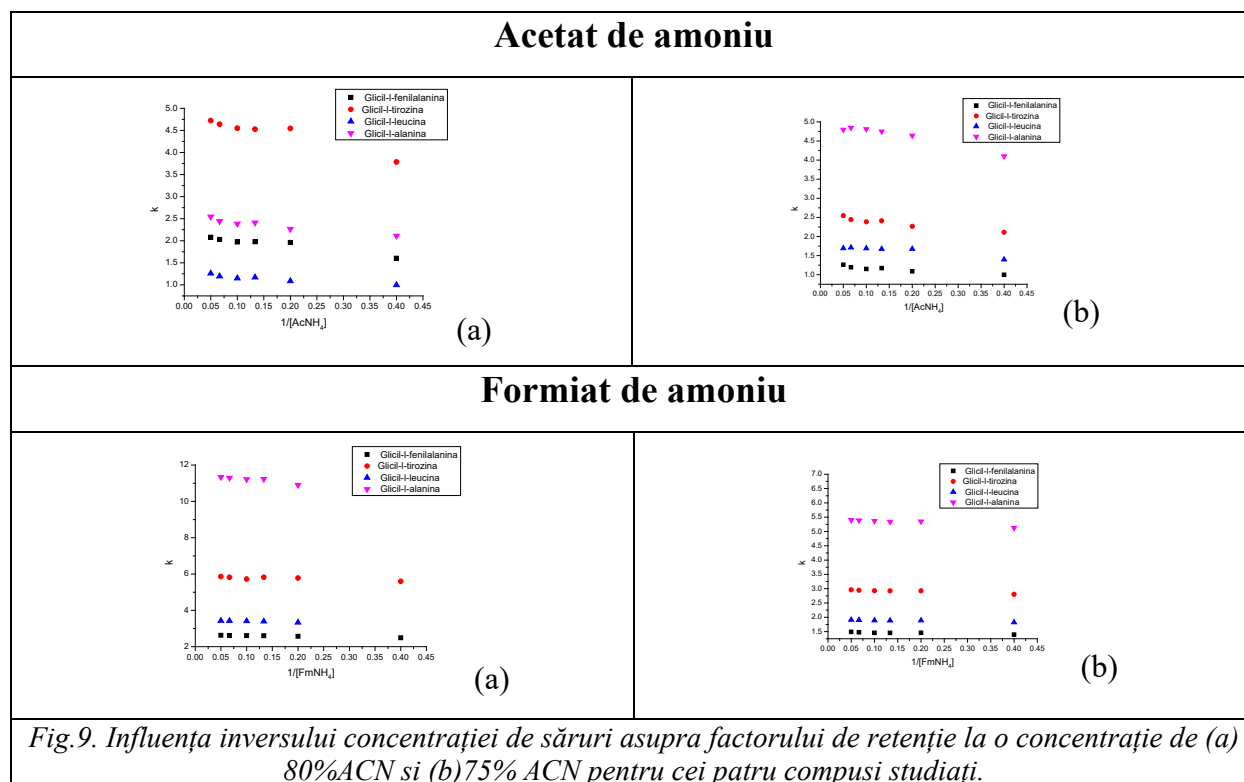


Fig.9. Influența inversului concentrației de săruri asupra factorului de retenție la o concentrație de (a) 80%ACN și (b) 75% ACN pentru cei patru compusi studiați.

2.3. INFLUENȚA TEMPERATURII ASUPRA RETENȚIEI ÎN MECANISMUL DE SEPARARE CROMATOGRAFICĂ BAZAT PE INTERACȚII HIDROFILE

2.3.3. Influența temperaturii asupra retenției unor aminoacizi în mecanismul de separare cromatografică bazat pe interacții hidrofile

În separările HILIC, temperatura este un parametru cu importante influențe asupra retenției cromatografice. Relația dintre factorul de retenție și temperatură este dată de ecuația van't Hoff:

$$\ln k = -\Delta H^0 / RT + \Delta S^0 / R + \ln \phi \quad (6)$$

unde ΔH^0 și ΔS^0 reprezintă entalpia și entropia de retenție, R constanta gazelor (8.314 J/mol*K), T temperatura în grade Kelvin iar ϕ raportul de volume al celor două faze.

Deși variațiile timpilor de retenție în funcție de temperatură nu sunt semnificative, se observă trei comportamente ale compușilor analizați folosind faze mobile ce conțin acetonitril sau metanol drept modificator organic, atunci când temperatura coloanei cromatografice crește: timpul de retenție scade pentru fenilalanină și histidină, crește pentru triptofan iar în cazul tirozinei retenția crește între 20 și 30°C și scade între 30 și 50°C. În cazul tirozinei, reprezentarea grafică a comportamentului acesteia urmează o formă de “U”, sugerând schimbarea mecanismului

de retenție în jurul temperaturii de 30°C, posibil de la un mecanism de partiție (între 20 și 30°) spre un mecanism de schimb ionic (între 30 și 50°), similar comportării cromatografice la influența concentrației de modificador organic. În toate cazurile analizate, timpii de retenție au fost mai mici pentru metanol decât pentru acetonitril, aspect detaliat în capitolul 2.1.

Valorile $\ln k$, calculate pentru toți compușii studiați au fost reprezentate grafic în funcție de inversul temperaturii coloanei cromatografice ($1/T$). O parte din aceste dependențe, pot fi modelate matematic de o funcție liniară de forma:

$$\ln k = A + B \cdot 1/T \quad (7)$$

cât și de o funcție polinomială de gradul doi de forma:

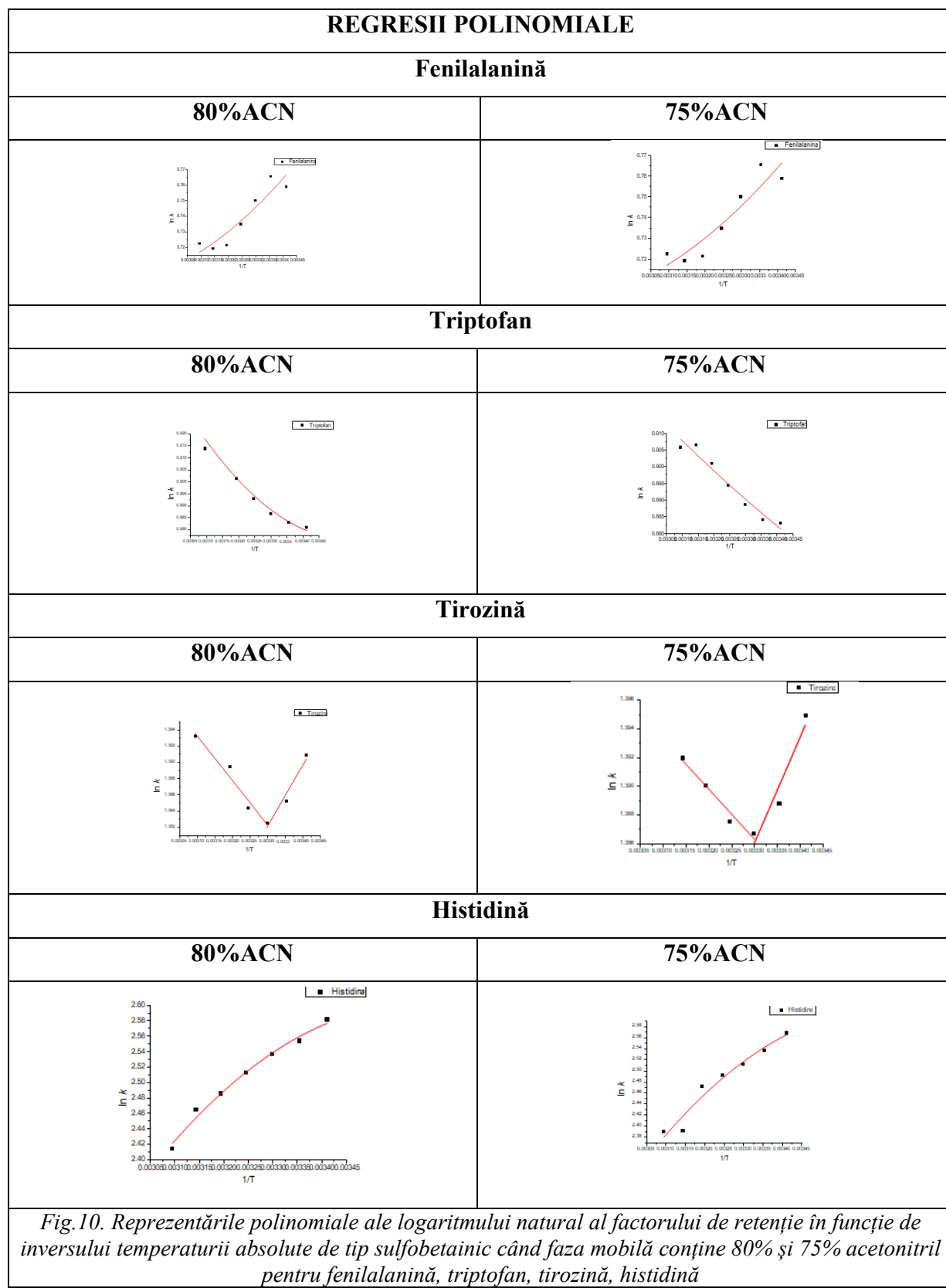
$$\ln k = A + B1 \cdot 1/T + B2 \cdot (1/T)^2 \quad (8)$$

Pe baza datelor obținute prin reprezentarea grafică a logaritmului natural al factorului de retenție în funcție de inversul temperaturii absolute se pot estima valorile ΔH° , în cazul dependențelor lineare. Valorile variației de entalpie standard se pot estima în mecanismul HILIC folosind valorile calculate ale pantei (B), $\Delta H^\circ = -R \cdot B$. Astfel, pentru triptofan, în cazul în care faza mobilă conține 80% acetonitril, $\Delta H^\circ = 8,979$ kJ/mol și în cazul în care faza mobilă conține 75% acetonitril $\Delta H^\circ = 7,050$ kJ/mol. În cazul în care ΔH° este mai mare ca zero, procesul de retenție poate fi considerat ca fiind endoterm.

Figura 10 și tabelul 9 redau reprezentările grafice și parametrul de regresie în cazul în care logaritmul natural al factorului de retenție este reprezentat grafic în funcție de inversul temperaturii absolute folosind o funcție polinomială de gradul doi.

Forma curbată a reprezentărilor grafice ale logaritmului natural al factorului de retenție în funcție de inversul temperaturii absolute este atribuită unei retenții cromatografice realizate atât prin procese de partiție cât și prin unele mecanisme secundare suprapuse acestora, cel mai probabil interacții ionice[33].

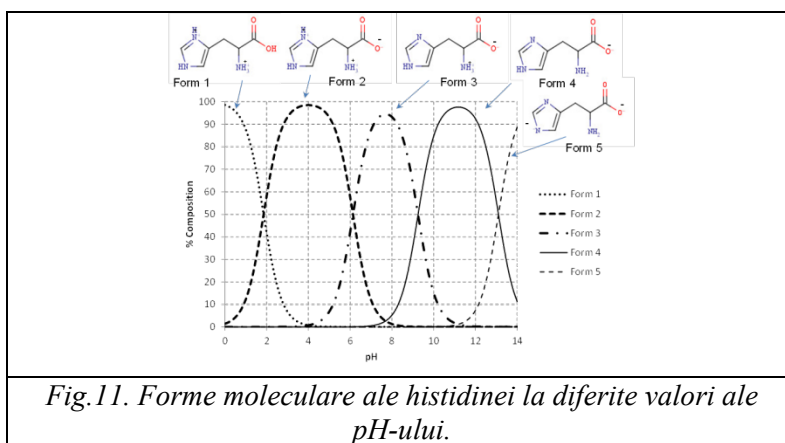
Dependențe care redau abateri de la liniaritatea van't Hoff sunt raportate în literatură de specialitate, în unele cazuri de mecanism de fază inversă [15,16].



Tabel 8. Valorile parametrilor de regresie pentru reprezentările polinomiale ale logaritmului natural al factorului de retenție în funcție de inversului temperaturii absolute când faza mobilă conține 80% și 75% acetonitril pentru fenilalanină, triptofan, tirozină, histidină

	Fenilalanină		Triptofan		Tirozină		Histidină	
	80%ACN	75%ACN	80%ACN	75%ACN	80%ACN	75%ACN	80%ACN	75%ACN
A	5,561	1,179	3,496	1,4342	-	-	-6,8486	-7,038
B₁	$-3,181 \cdot 10^3$	$-6,033 \cdot 10^2$	$-1,478 \cdot 10^3$	$-2,472 \cdot 10^2$	-	-	$5,264 \cdot 10^3$	$5,277 \cdot 10^3$
B₂	$-5,211 \cdot 10^5$	$1,474 \cdot 10^5$	$2,087 \cdot 10^5$	$0,249 \cdot 10^5$	-	-	$-7,333 \cdot 10^5$	$-7,2186 \cdot 10^5$
R²	0,975	0,801	0,914	0,935	-	-	0,983	0,934

Deviațiile de la legea van't Hoff sunt comune în cadrul mecanismului de separare cromatografică HILIC [34]. Acestea se pot datora fie diferitelor forme ale compuşilor implicați în separare, forme existente în faza mobilă, care vor fi implicate în interacții multiple cu suprafața polară a fazei staționare (interacții ion-ion, ion-dipol, dipol-dipol). De exemplu, în cazul histidinei, aceasta poate prezenta mai multe forme protonate/deprotonate, în funcție de pH-ul fazei mobile (Figura 11). La un pH ~ 7 pentru o componentă apoasă dată de soluția de concentrație de 10mM CH₃COONH₄ folosită în studiu, histidina poate avea cel puțin două forme disociate, care vor interacționa diferit cu grupările polare de pe suprafața fazei staționare.



Pentru comparație, în a doua parte a acestui studiu s-a urmărit influența temperaturii unei coloane cromatografice umplută cu o fază staționară de tip silice nemodificată chimic asupra retenției cromatografice a histidinei (cel mai puternic reținut compus) când faza mobilă conține 75% acetonitril ca modificator organic și 10 mM acetat de amoniu în faza apoasă. Deși comportamentul acesteia este același, datele experimentale sugerează interacții mai puternice ale analitului cu această fază staționară decât în cazul folosirii unei faze staționare de tip sulfobetainic.

2.3.4. Influența temperaturii asupra retenției unor dipeptide în mecanismul de separare cromatografică bazat pe interacții hidrofiele

În cazul tuturor compușilor studiați se observă o descreștere a timpului de retenție cu creșterea temperaturii fazei staționare, comportament considerat clasic pentru separările cromatografice ce folosesc mecanisme bazate pe interacții hidrofiele. Acest comportament indică faptul că procesul de transfer al acestor analiți hidrofilii din faza mobilă către faza staționară este un proces exoterm, favorizat de temperaturi joase [9].

În cazul în care reprezentările grafice ale logaritmului natural al factorului de retenție în funcție de inversul temperaturii absolute pot fi modelate matematic după o funcție liniară, mecanismul de retenție este datorat fenomenelor de partiție a anaților între faza mobilă bogată în componentă organică și startul apos adsorbit la suprafața fazei staționare [6]. Astfel de dependențe apar în cazul glicil-l-fenilalaninei când faza mobilă conține 75% modificador organic și pentru glicil-l-leucina când faza mobilă conține 80% modificador organic. Pentru acești compuși, valorile ΔH^0 calculate (folosind relația prezentată în Capitolul 2.3.3.) au fost de -9,926 kJ/mol în cazul glicil-l-fenilalaninei și -8,837 kJ/mol în cazul glicil-l-leucinei.

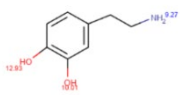
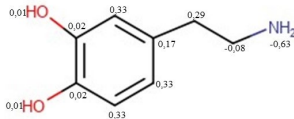
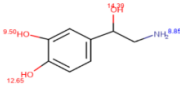
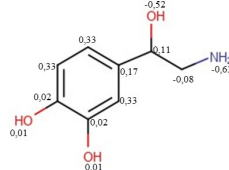
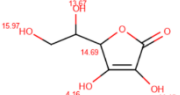
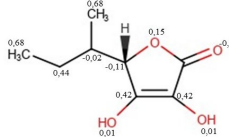
În cazul în care s-au realizat reprezentări grafice ale logaritmului natural al factorului de retenție în funcție de inversul temperaturii absolute modelate matematic după o funcție liniară s-au obținut valori ale R^2 mai mari de 0,99 în cazul glicil-l-fenilalaninei și glicil-l-alaninei (pentru un procent de acetonitril de 75%) și pentru glicil-l-tirozină și glicil-l-leucină (când faza mobilă a avut 80% modificador organic). În celelalte cazuri, coeficienții de corelație mai buni decât în cazul reprezentărilor liniare. În acest caz, în mecanismul de retenție al compușilor intervin și alte fenomene față de cele de partiție, posibil atracții electrostatice între grupările sulfonate ale fazei mobile și cele amino ale analiților.

A doua parte a acestui studiu își propune observarea mecanismului de retenție al celor patru compuși studiați când coloana cromatografică este una SeQuant ZIC-HILIC produsă de Merck, cu dimensiunile 100 mm lungime, 4,6 mm diametru interior și dimensiunea particulelor de 3,5 μm . Pentru toți compușii studiați se poate observa același comportament cromatografic, timpii de retenție fiind mai mici în cazul folosirii coloanei cromatografice cu dimensiuni mai mici.

De asemenea, s-a urmărit mecanismul de retenție pentru trei compuși (glicil-l-fenilalanină, glicil-l-leucină și glicil-l-tirozină) în cazul folosirii unei faze staționare de tip silice

nemodificată chimic. Timpii de retenție pentru toți compușii sunt mai mari decât în cazul folosirii unei faze staționare de tip sulfobetainic cu același diametru al particulelor, 5 μm . Aceasta diferență se datorează faptului că în cazul fazelor staționare de tip silice stratul apos este mai subțire, crescând posibilitatea analiților de a interacționa cu grupările funcționale ale fazei staționare [35].

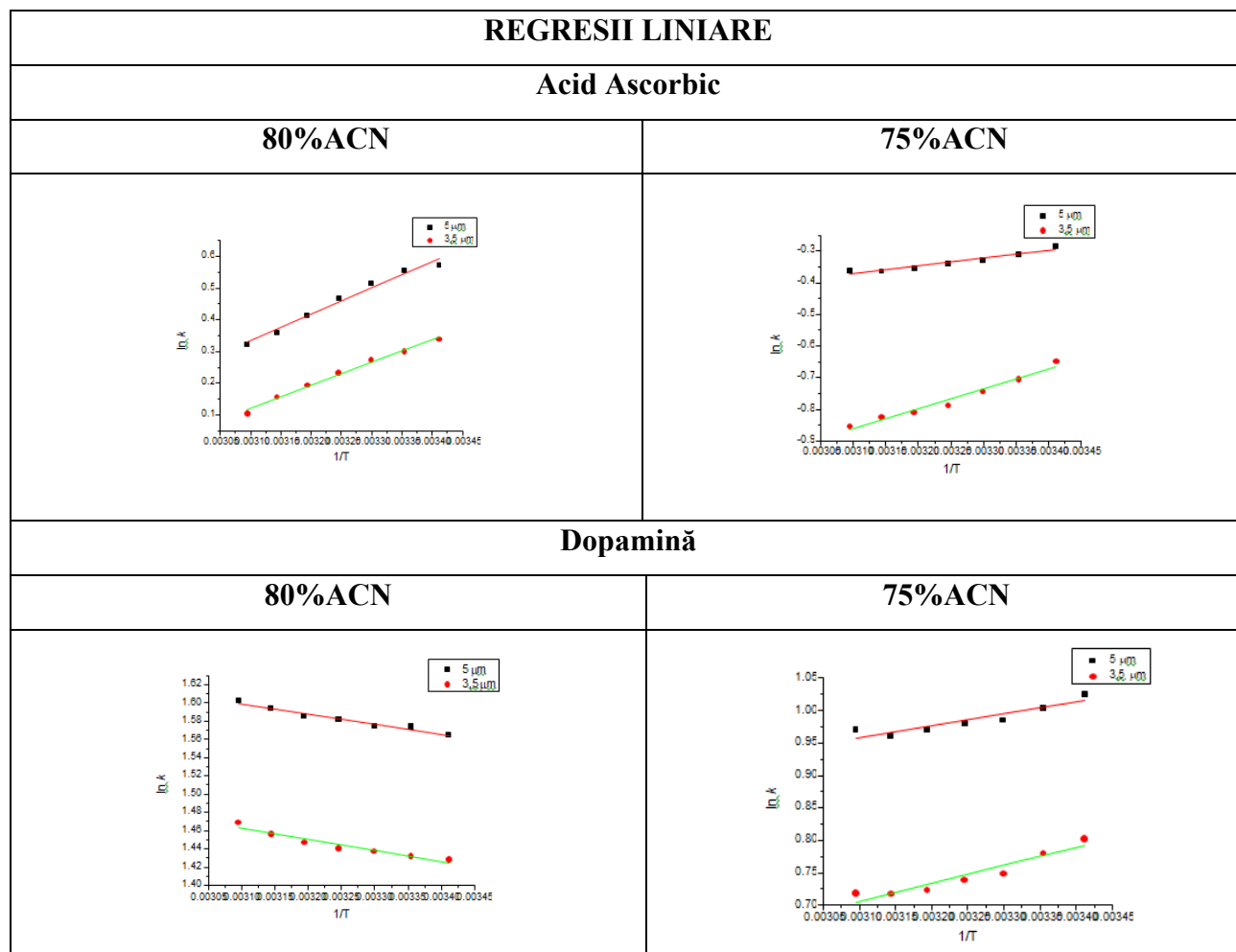
2.3.5. Influența temperaturii asupra retenției unor compuși polari în mecanismul de separare cromatografică bazat pe interacții hidrofiele

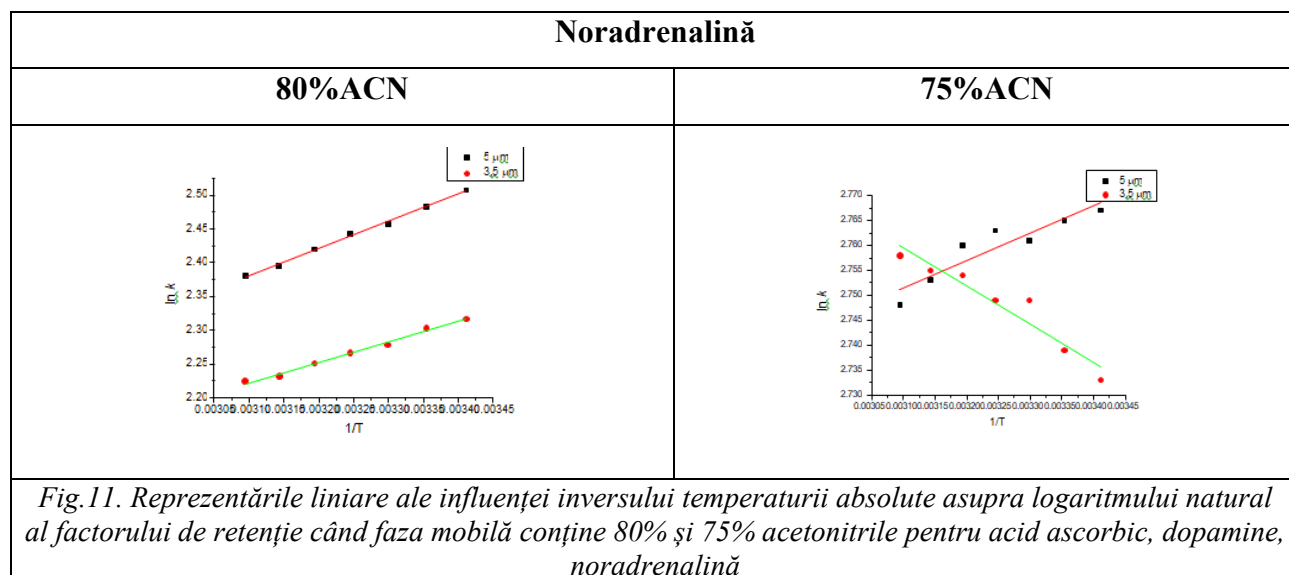
Tabel 9. Valorile pK_a , $\log K_{ow}$ și ale distribuției sarcinii pe fiecare atom pentru compușii studiați.						
Compus	pK_a	$\log K_{ow}$	$\log D$ (pH=6)	μ (D)	Sw (mg/L)	Sarcină/atom
Dopamină		0,78	-2,17	2,91	1000000	
Noradrenalină		-1,1	-2,90	2,06	1000000	
Acid ascorbic		-1,91	-3,75	5,49	1000000	

Atunci când faza mobilă este bogată în componentă organică mecanismul de retenție este în mare parte cel de partiție hidrofilă al analiților între faza mobilă și stratul apos de la suprafața fazei staționare. În afară de cazul dopaminei și noradrenalinei când faza mobilă conține 80% modificador organic și al noradrenalinei când faza mobilă conține 75% modificador organic, timpii de retenție observați în această parte studiului scad când temperatura coloanei cromatografice crește, indicând faptul că într-adevăr mecanismul dominant este cel al partiției hidrofiele, proces considerat exoterm [34]. Deviațiile de la acest comportament observate în cazul dopaminei și noradrenalinei și sunt datorate posibilelor interacții electrostatice de atracție între gruparea amino a analiților și gruparea sulfonat a fazei mobile dar și a unei posibile modificări a grosimii stratului apos de la suprafata fazei staționare [36]. Comportamentul celor trei compuși studiați nu diferă atunci când diametrul particulelor fazei staționare este modificat.

Doar în cazul noradrenalinei când faza mobilă conține 75% acetonitril, coeficientul R^2 pentru reprezentările liniare ale a valorilor logaritmului natural al factorului de retenție în funcție de inversul temperaturii absolute a fost mai mare de 0,99, putându-se calcula valoarea variației entalpiei standard a procesului de transfer al analitului din faza mobilă spre faza staționară, ΔH^0 . Valoarea acestui parametru este -3,326 kJ/mol când faza staționară folosită are diametrul particulelor de 5 μm și de -2,507 kJ/mol când când faza staționară folosită are diametrul particulelor de 3,5 μm , indicând un proces exoterm.

În cazul în care aceleași date sunt reprezentate printr-o funcție polinomială de gradul II se obțin valori îmbunătățite ale coeficientului R^2 , apropiate de 0,99, cu excepția dopaminei și noradrenalinei, deși și în aceste cazuri coeficienții de corelație sunt mai mari de 0,9. Acest lucru sugerează că deși mecanismul de retenție principal este cel de partiție există și interacții între analit și faza staționară.



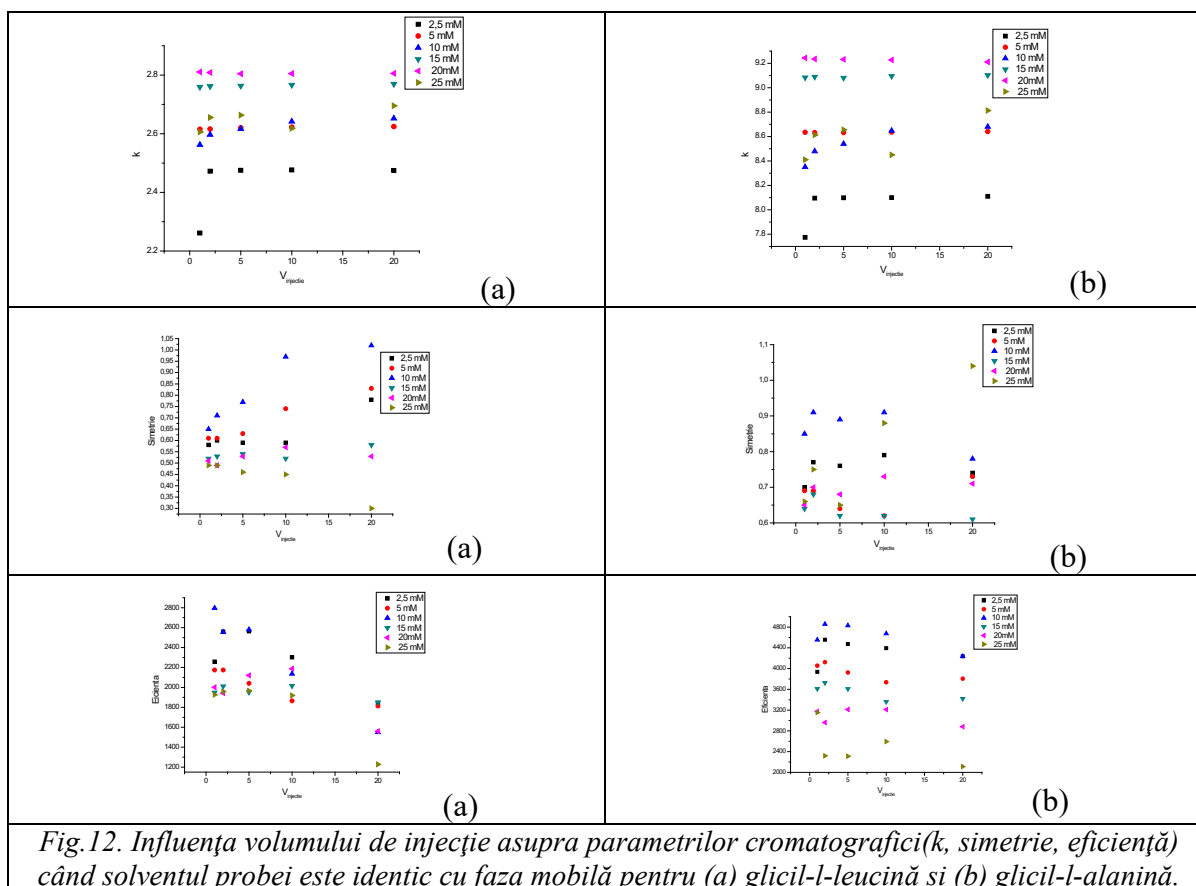


Pentru comparație, modificatorul organic a fost înlocuit cu metanol. După cum era de așteptat, timpii de retenție scad față de cazul folosirii acetonitrilului datorită faptului că metanol este un solvent polar, protic ce prezintă capacitatea de a dezlocui moleculele de apă din startul apos de la suprafața fazei staționare [37]. În acest caz, timpul de retenție al acidului ascorbic scade sub timpul mort al coloanei. Acest compus are capacitatea de a forma legături de hidrogen cu faza mobilă [23]. Datorită acestui fapt interacționează foarte slab cu faza staționară. Pentru ceilalți doi compuși timpii de retenție scad, întărind ideea că acești analiți participă mai degrabă la procese de partiție între faza mobilă și statul apos de la suprafața fazei staționare. Coeficienți de corelație mai mari de 0,99 se obțin și în cazul reprezentării grafice a logaritmului natural al factorului de retenție în funcție de inversul temperaturii absolute după o funcție matematică polinomială de gradul II, indicând faptul că interacții secundare există și în cazul folosirii metanolului ca modificator organic.

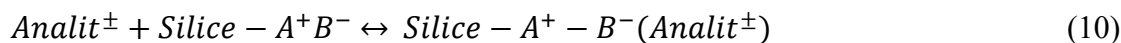
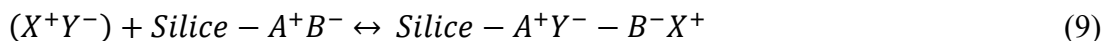
2.4. INFLUENȚA SOLVENTULUI PROBEI ȘI AL VOLUMULUI DE INECȚIE ASUPRA PARAMETRILOR CROMATOGRAFICI ÎN MECANISMUL DE SEPARARE BAZAT PE INTERACȚII HIDROFILE FOLOSIND COLOANE UMPLUTE CU FAZE STAȚIONARE DE TIP SULFOBETAINIC

Pentru a investiga efectul volumului de inecție în cazul mecanismului ZIC-HILIC, glicil-l-leucina și glicil-l-alanina au fost utilizate ca compuși test. Pentru acești compuși, valorile pK_a , $\log P$ și ale distribuției sarcinii pe fiecare atom sunt detaliate în Capitolul 2.2.

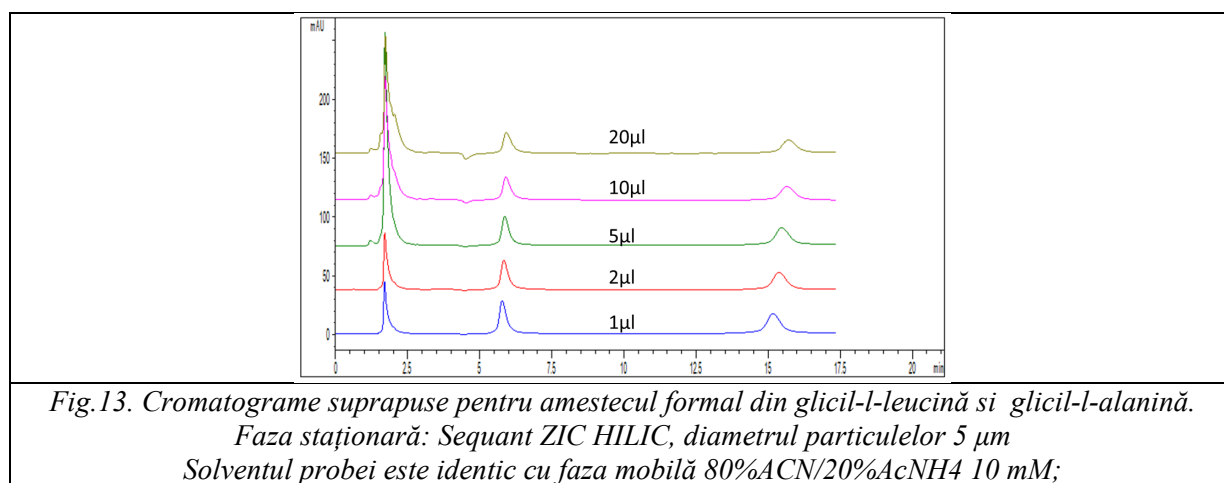
În prima parte a studiului solventul probei este chiar faza mobilă, ce are componentă organică acetonitrilul (80%) și componentă apoasă acetatul de amoniu de diferite concentrații (2,5, 5, 10, 20, 25 mM). După cum se poate observa în Figura 14 valorile timpilor de retenție nu variază semnificativ în nici unul din cazuri (variația k nu este mai mare de 0,1). Nici ceilalți parametri cromatografici, simetria și eficiența nu variază semnificativ atunci când volumul de injecție crește de la 1 la 20 μ l, deși în majoritatea cazurilor simetria urmează o tendință descendentă pe când eficiența are tendința de a crește. În toate cazurile, parametrii cromatografici au valori mai bune în cazul glicil-l-alaninei, compusul ce eluează ultimul.



Pentru a suprima interacțiile de tip electrostatic este necesară adăugarea de săruri în faza mobilă. Ecuațiile (9) și (10) redau schematic echilibrele competitive care au loc între sărurile fazei mobile, faza staționară de tip sulfobetainic și analit. Acestea disociază, suprimând interacțiile electrostatice dintre analit (ce poate avea grupări cationice sau anionice) și faza staționară de tip sulfobetainic (cu grupări de tip amoniu cuaternar, A^+ , și grupări de tip sulfonat, B^-), formele picurilor cromatografice îmbunătățindu-se.



În cazul în care concentrația de săruri este foarte mică, este posibil ca interacțiile electrostatice dintre moleculele de analit și grupările funcționale ale fazei staționare să nu fie suprimate pe deplin, iar în cazul în care concentrația lor este ridicată este posibil să apară probleme în ceea ce privește miscibilitatea dintre componenta organică și cea apoasă ale fazei mobile [38]. De aceea, valoarea optimă a concentrației de acetat de amoniu pentru acest studiu a fost de 10 mM, în acord cu valori folosite și în alte studii, raportate în literatura de specialitate.



În a doua parte a acestui studiu, solventul probei este diferit de faza mobilă (ce conține 80% acetonitril și 20% acetat de amoniu 20 mM) fiind compus din acetonitril (80%) și diferite concentrații de acetat de amoniu (2,5, 5, 10, 20 mM).

Variația concentrației de săruri din compoziția solventului probei nu modifică parametrii cromatografici pentru al doilea compus eluat, glicil-l-alanina. După cum se poate observa în Figura 16, în cazul glicil-l-leucinei se poate observa apariția unui pic negativ când concentrația acetatului de amoniu din compoziția solventului probei crește, acest fapt ducând la scăderea valorilor simetriei și eficienței atunci când volumul injectat în coloană cromatografică crește. Tendințe similare se observă pentru toate cele 4 concentrații ale acetatului de amoniu din solventul probei. Această observație demonstrează faptul că echilibrele la care participă analitul în mecanismul de retenție al cromatografiei de lichide bazată pe interacții hidrofile sunt mai

sensibile la creșterea volumului de injecție în situația în care solventul probei este diferit de faza mobilă.

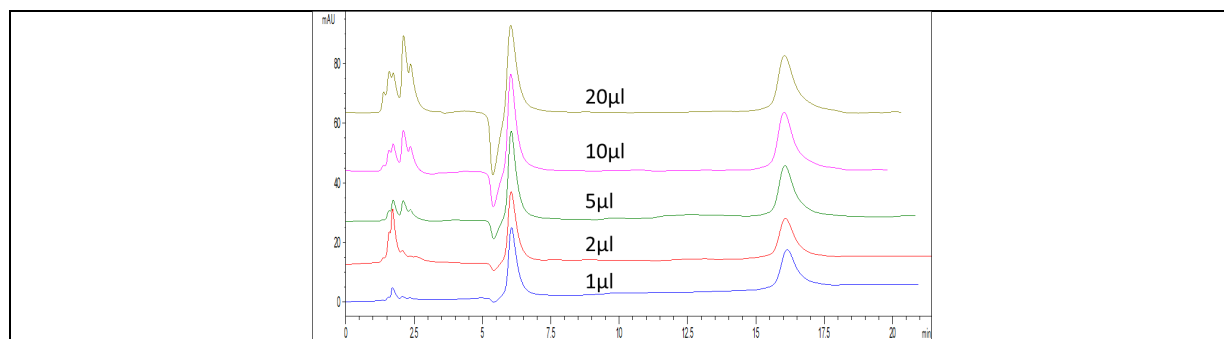


Fig.14.Cromatograme suprapuse pentru amestecul formal din glicil-L-leucină și glicil-L-alanină.
Faza staționară: Sequant ZIC HILIC, diametrul particulelor 5 μm
Faza mobilă: 80%ACN și 20% AcNH₄ 20mM iar solventul probei este: 80%ACN/20%AcNH₄ 10 mM.

2.5. CONCLUZII GENERALE

În cadrul părții experimentale a tezei intitulate “Studii de retenție a unor compuși de importanță biochimică în cromatografia de lichide prin mecanisme bazate pe interacții hidrofile” s-a urmărit influența parametrelor cromatografice asupra retenției unor analiti cu caracter polar în cadrul mecanismului de separare cromatografică bazat pe interacții hidrofile.

Pentru două clase de compuși, amino acizi (tirozină, histidină, fenilalanină, triptofan) și dipeptide (glicil-L-fenilalanină, glicil-L-leucină, glicil-L-tirozină, glicil-L-alanină) s-a urmărit influența compoziției fazei mobile (concentrația modifierului organic și tăria ionică) și influența temperaturii fazei staționare. Pentru acidul ascorbic, dopamină și nordrenalină a fost urmărită influența temperaturii fazei staționare. Influența solventului probei și a volumului de injecție a fost urmărită pentru glicil-L-leucină, glicil-L-alanină. Faza mobilă a conținut acetonitril sau metanol ca modifier organic și acetat de amoniu sau formiat de amoniu ca săruri adăugate în componența apoasă. Fazele staționare folosite au fost de tip silice nemodificată chimic, sau modificată cu un ligand de tip sulfobetainic, ce conține o grupare de amoniu cuaternar încărcată pozitiv și o grupare de tip sulfonate încărcată negativ la capătul distal al ligandului atașat silicagelului.

În ceea ce privește influența modifierului organic al fazei mobile, rezultate favorabile au fost obținute pentru aminoacizi și dipeptide în cazul folosirii acetonitrilului, față de cazul folosirii metanolului. Reprezentarea grafică al logaritmului zecimal al factorului de retenție în funcție de concentrația de modifier organic a avut drept rezultat obținerea unor grafice curbate

ce indică un mecanism de retenție mixt, dominat de partiția hidrofilă a analiților între startul apos de la suprafața fazei staționare și volumul fazei mobile, în special când aceasta conține un procent ridicat de componentă apoasă. În acord cu literatura de specialitate, acestui mecanism se suprapun interacții electrostatice de atracție sau de respingere între analit și faza staționară.

Suprimarea interacțiilor electrostatice s-a dovedit a avea loc atunci când *concentrația de săruri adăugate fazei mobile* crește, atât la concentrații mari cât și la concentrații scăzute de componentă organică. Studiul comparativ al ionilor acetat și formiat adăugați fazei mobile demonstrează că retenția cromatografică este mai puternic influențată de concentrația de săruri decât de tipul acestora.

S-a efectuat de asemenea un studiu amplu ce vizează *influența temperaturii asupra procesului de retenție* în mecanismul de separare bazat pe interacții hidrofile. Pentru majoritatea compușilor, timpul de retenție a scăzut odată cu creșterea temperaturii fazei staționare, indiferent de tipul fazei staționare sau de compoziția fazei mobile. Acest fapt indică faptul că procesul de transfer al analitilor din faza mobilă spre startul apos al fazei staționare este guvernat de partiție. Deviații de la acest comportament au avut drept cauză posibile interacții ale analitilor cu faza staționară suprapuse mecanismului de partiție.

Încercarea de a corela retenția cromatografică în mecanismul ZIC-HILIC cu anumiți descriptori moleculari ($\log K_{ow}$, $\log D$ sau μ) ai compușilor investigați nu a dat rezultate acceptabile datorită diversității compușilor studiați.

Deoarece s-a constatat că forma pic-urilor cromatografice și a valorilor simetriei și eficienței sunt nefavorabile a fost propus un studiu asupra *influenței solventului probei și al volumului de probă injectat în coloana cromatografică*. În cazul în care solventul probei este identic cu faza mobilă rezultate favorabile au fost obținute pentru volume de injecție de până la 20 μ L. În cazul în care solventul probei este diferit de faza mobilă pot apărea influențe asupra retenției primului compus eluat, mai pronunțate în cazul unor volume medii de injecție (până la 20 μ L). De aceea este recomandat ca în cazul în care sunt necesare volume de injecție mari, solventul probei să fie identic sau cât mai apropiat de faza mobilă. În cazul în care acest lucru nu este posibil, volumul de injecție folosit în separarea cromatografică ar trebui să fie cât mai mic.

În concluzie, pentru analitii studiați, în cazul folosirii mecanismului de separare cromatografică bazat pe interacții hidrofile sunt prezente două tipuri de interacții suprapuse:

partiția analitilor între stratul apos aflat la suprafața fazei staționare și volumul fazei mobile și interacții electrostatice sau legături de hidrogen între analiți și faza mobilă sau faza staționară.

ARTICOLE PUBLICATE

E. Bacalum, **M.A. Tănase**, M. Cheregi, H.Y. Aboul-Enein, V. David, Retention Mechanism In Zwitterionic Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (ZIC-HILIC) Studied For Highly Polar Compounds Under Different Elution Conditions, Revue Roumain de Chimie, 61, (2016), 531-539.

<http://revroum.lew.ro/wp-content/uploads/2016/06/Art%2008.pdf>

M.A Tănase, E. Bacalum, V. David, Variability Of Temperature Dependences Of The Retention Of Strongly Polar Compounds Under ZIC-HILIC Liquid Chromatographic Mechanism, Separation Science Plus, 2, (2019), 12-17.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/sscp.201800144>

M. Tănase, A-C. Soare, V. David, S. Moldoveanu, Sources Of Non-Linear Van't Hoff Temperature Dependence In High-Performance Liquid Chromatography, ACS Omega, 4, (2019), 19808–19817.

<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsomega.9b02689>

M. Tănase; V. David, Influence Of The Injected Sample Composition On The Retention Parameters Of Polar Compounds Under ZIC-HILIC Mechanism In Liquid Chromatography, Revue Roumain de Chimie, 64, (2019), 1037-1041.

<http://revroum.lew.ro/wp-content/uploads/2019/12/Art%2003.pdf>

CONFERINȚE ȘTIINȚIFICE

M.A Tănase, M.C Cheregi, I.G. David, V. David, Retention Studies For Various Peptides In Liquid Chromatography Based On Hydrophilic Interaction Mechanism, Conferința Internațională “CHIMIA”, 24-26 mai 2018, Constanța, Romania

M.A Tănase, V. David, Studiu termodinamic pentru mecanismul de separare ZIC HILIC în HPLC aplicat unor compuși de importanță biochimică, Sesiunea de Comunicări Științifice, ediția a XIV-a, 25-26 mai 2018, București, România

M.A Tănase, M.C. Cheregi, I.G. David, V. David, Comparison Of Retention Behaviour Of Some Amino-Acids And Their Peptides On Two Different Columns, Under HILIC And ZIC-HILIC Mechanisms, Conferința națională de chimie, ediția a XXXV-a, 2-5 octombrie 2018, Călimanești –Căciulata, Vâlcea, România

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1] Y. Guo, S. Gaiki, Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1218 (2011) 5920–5938. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.052>.
- [2] B. Buszewski, S. Noga, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)--a powerful separation technique, *Anal Bioanal Chem*. 402 (2012) 231–247. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>.
- [3] P. Hemström, K. Irgum, Hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Separation Science*. 29 (2006) 1784–1821. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600199>.
- [4] A.J. Alpert, Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, *Journal of Chromatography A*. 499 (1990) 177–196. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)96972-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)96972-3).
- [5] D.V. McCalley, Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1217 (2010) 3408–3417. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.03.011>.
- [6] R.-I. Chirita, C. West, A.-L. Finaru, C. Elfakir, Approach to hydrophilic interaction chromatography column selection: Application to neurotransmitters analysis, *Journal of Chromatography A*. 1217 (2010) 3091–3104. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.03.001>.
- [7] G. Greco, T. Letzel, Main Interactions and Influences of the Chromatographic Parameters in HILIC Separations, *Journal of Chromatographic Science*. 51 (2013) 684–693. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt015>.
- [8] M. Liu, J. Ostovic, E.X. Chen, N. Cauchon, Hydrophilic interaction liquid chromatography with alcohol as a weak eluent, *Journal of Chromatography A*. 1216 (2009) 2362–2370. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.012>.
- [9] Y. Guo, S. Gaiki, Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1074 (2005) 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.058>.
- [10] P. Jandera, Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review, *Analytica Chimica Acta*. 692 (2011) 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.047>.
- [11] J. Soukup, P. Jandera, Hydrosilated silica-based columns: The effects of mobile phase and temperature on dual hydrophilic-reversed-phase separation mechanism of phenolic acids, *Journal of Chromatography A*. 1228 (2012) 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.077>.
- [12] Y. Guo, S. Srinivasan, S. Gaiki, Investigating the Effect of Chromatographic Conditions on Retention of Organic Acids in Hydrophilic Interaction Chromatography Using a Design of Experiment, *Chromatographia*. 66 (2007) 223–229. <https://doi.org/10.1365/s10337-007-0264-0>.

- [13] L.R. Snyder, Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3rd ed, Journal of the American Chemical Society. 132 (2010) 9220–9220. <https://doi.org/10.1021/ja104156b>.
- [14] G. Subramanian, ed., A practical approach to chiral separations by liquid chromatography, VCH, Weinheim ; New York, 1994.
- [15] T. Galaon, V. David, Deviation from van't Hoff dependence in RP-LC induced by tautomeric interconversion observed for four compounds, Journal of Separation Science. 34 (2011) 1423–1428. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100029>.
- [16] T. Galaon, D.-F. Anghel, V. David, H.Y. Aboul-Enein, Unusual Temperature-Retention Dependences Observed for Several Benzodiazepines in RP-HPLC Using Different Mobile Phase Compositions, Chromatographia. 76 (2013) 1623–1630. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2540-5>.
- [17] A.J. Alpert, M. Shukla, A.K. Shukla, L.R. Zieske, S.W. Yuen, M.A.J. Ferguson, A. Mehlert, M. Pauly, R. Orlando, Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates, Journal of Chromatography A. 676 (1994) 191–202. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)00467-6](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)00467-6).
- [18] S.C. Churms, Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on size exclusion, Journal of Chromatography A. 720 (1996) 151–166. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00305-3](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00305-3).
- [19] T. Yoshida, Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review, Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 60 (2004) 265–280. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2004.01.006>.
- [20] Z. Hao, C.-Y. (Joey) Lu, B. Xiao, N. Weng, B. Parker, M. Knapp, C.-T. Ho, Separation of amino acids, peptides and corresponding Amadori compounds on a silica column at elevated temperature, Journal of Chromatography A. 1147 (2007) 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.057>.
- [21] R. Li, J. Huang, Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography, Journal of Chromatography A. 1041 (2004) 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.04.033>.
- [22] M.A. Strege, S. Stevenson, S.M. Lawrence, Mixed-Mode Anion–Cation Exchange/Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry as an Alternative to Reversed Phase for Small Molecule Drug Discovery, Analytical Chemistry. 72 (2000) 4629–4633. <https://doi.org/10.1021/ac000338b>.
- [23] A.E. Karatapanis, Y.C. Fiamegos, C.D. Stalikas, Study of the Behavior of Water-Soluble Vitamins in HILIC on a Diol Column, Chromatographia. 71 (2010) 751–759. <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1564-3>.
- [24] M.R. Euerby, J. Hulse, P. Petersson, A. Vazhentsev, K. Kassam, Retention modelling in hydrophilic interaction chromatography, Analytical and Bioanalytical Chemistry. 407 (2015) 9135–9152. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9079-2>.
- [25] R.-I. Chirita, C. West, S. Zubrzycki, A.-L. Finaru, C. Elfakir, Investigations on the chromatographic behaviour of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography, Journal of Chromatography A. 1218 (2011) 5939–5963. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.002>.
- [26] Y. Guo, Recent progress in the fundamental understanding of hydrophilic interaction chromatography (HILIC), Analyst. 140 (2015) 6452–6466. <https://doi.org/10.1039/C5AN00670H>.

- [27] J.C. Heaton, D.V. McCalley, Some factors that can lead to poor peak shape in hydrophilic interaction chromatography, and possibilities for their remediation, *Journal of Chromatography A*. 1427 (2016) 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.056>.
- [28] A.J. Alpert, Effect of salts on retention in hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1538 (2018) 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.01.038>.
- [29] J.C. Heaton, J.J. Russell, T. Underwood, R. Boughtflower, D.V. McCalley, Comparison of peak shape in hydrophilic interaction chromatography using acidic salt buffers and simple acid solutions, *Journal of Chromatography A*. 1347 (2014) 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.026>.
- [30] X. Subirats, M. Rosés, E. Bosch, On the Effect of Organic Solvent Composition on the pH of Buffered HPLC Mobile Phases and the pK_a of Analytes—A Review, *Separation & Purification Reviews*. 36 (2007) 231–255. <https://doi.org/10.1080/15422110701539129>.
- [31] A. Sentkowska, M. Biesaga, K. Pyrzynska, Application of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography for the Quantification of Flavonoids in *Genista tinctoria* Extract, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2016 (2016) 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/3789348>.
- [32] P.J. Boersema, S. Mohammed, A.J.R. Heck, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics, *Anal Bioanal Chem*. 391 (2008) 151–159. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1865-7>.
- [33] H. Qiu, E. Wanigasekara, Y. Zhang, T. Tran, D.W. Armstrong, Development and evaluation of new zwitterionic Hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases based on 3-P,P-diphenylphosphonium-propylsulfonate, *Journal of Chromatography A*. 1218 (2011) 8075–8082. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.016>.
- [34] Z. Hao, B. Xiao, N. Weng, Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC), *Journal of Separation Science*. 31 (2008) 1449–1464. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700624>.
- [35] D.V. McCalley, U.D. Neue, Estimation of the extent of the water-rich layer associated with the silica surface in hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1192 (2008) 225–229. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.049>.
- [36] Y. Guo, N. Bhalodia, B. Fattal, I. Serris, Evaluating the Adsorbed Water Layer on Polar Stationary Phases for Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC), *Separations*. 6 (2019) 19. <https://doi.org/10.3390/separations6020019>.
- [37] A.E. Karatapanis, Y.C. Fiamegos, C.D. Stalikas, A revisit to the retention mechanism of hydrophilic interaction liquid chromatography using model organic compounds, *Journal of Chromatography A*. 1218 (2011) 2871–2879. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.069>.
- [38] J.P. Danaceau, E.E. Chambers, K.J. Fountain, Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) for LC–MS/MS analysis of monoamine neurotransmitters, *Bioanalysis*. 4 (2012) 783–794. <https://doi.org/10.4155/bio.12.46>.