

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

TEZĂ DE DOCTORAT

**ALTERNATIVE DE ABORDARE ECOLOGICĂ (VERZI) A
CROMATOGRAFIEI DE LICHIDE**

Doctorand:
Florina Micăle

Conducător doctorat:
Prof. Dr. Andrei Valentin Medvedovici

Comisia de doctorat:

Președinte: Prof. Dr. Camelia Bala
Conducător doctorat: Prof. Dr. Andrei Valentin Medvedovici

Referenți oficiali:

1. Prof. Dr. Csaba Paizs, Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeș Bolyai, Cluj-Napoca
2. Prof. Dr. Emeritus Ionel Ciucanu, Facultatea de Științe, Universitatea de Vest din Timișoara
3. Prof. Dr. Emeritus Victor David, Facultatea de Chimie, Universitatea din București

2022

Cuprins

PARTE TEORETICĂ	4
1. Chimie verde/ Chimie analitică verde: o scurtă introducere	5
1.1. Introducere	5
1.2. Dezvoltarea durabilă și chimia verde	5
1.3. Principiile chimiei verzi	6
1.4. Chimie analitică verde	8
2. Cromatografia de lichide în contextul chimiei analitice verzi	9
2.1. Reducerea consumului de solvenți în cromatografie	10
2.1.1. Influența diametrului interior al unei coloane cromatografice asupra consumului de solvenți	11
2.1.2. Influența dimensiunii particulelor de fază staționară și a lungimii coloanelor cromatografice asupra consumului de solvenți	12
2.2. Înlocuirea solvenților dăunători	20
2.3. Tehnici cromatografice verzi. Cromatografia la temperatură înaltă	20
2.4. Cromatografia de lichide bazată pe mecanism de interacție hidrofilă (HILIC)	22
2.5. Cromatografia cu fluide în stare sub sau supercritică	23
3. Soluții ecologice în prelucrarea probelor	25
3.1. Extracția accelerată cu solvenți (ASE)	25
3.2. Microextracția în fază solidă (SPME)	26
3.3. Extracția cu adsorbant depus pe suport magnetic (SBSE)	29
3.4. Microextracția în fază lichidă	30
3.5. Extracția cu fluide supercritice (SFE)	31
3.6. Extracția cu apă în stare subcritică	34
3.7. Extracția cu lichide ionice	34
PARTE EXPERIMENTALĂ	36
4. Parte experimentală	37
4.1. Studiu de retenție al unor compuși de tip oximă printr-o metodă lichid cromatografică, pe o fază staționară care funcționează bimodal, ca alternativă indirectă și "verde" de estimare a hidrofobității	37
4.1.1. Introducere	37
4.1.2. Reactivi și echipamente	38
4.1.3. Metoda cromatografică	45
4.1.4. Rezultate și discuții	46
4.1.4.1. Indici de hidrofobitate cromatografici	51
4.1.4.2. Aspecte termodinamice	61
4.1.5. Concluzii	65
4.2. Propilen carbonatul ca posibil modificador organic al fazei mobile în cromatografia de lichide de înaltă performanță	67
4.2.1. Introducere	67
4.2.2. Reactivi și echipamente	68
4.2.3. Metoda cromatografică	68
4.2.4. Rezultate și discuții	70
4.2.4.1. Studiu de miscibilitate	70
4.2.4.2. Rezistența hidrodinamică la deplasarea fazei mobile	71
4.2.4.3. Echivalența între conținutul de ACN și PC din faza mobilă necesar pentru o retenție similară	75

4.2.4.4. Toleranța față de soluții tampon anorganice	79
4.2.4.5. Curbele van Deemter	81
4.2.4.6. Aspecte termodinamice	82
4.2.4.7. Detecția UV	83
4.2.4.8. Aplicații cromatografice bazate pe diferite mecanisme de separare	87
4.2.4.9. Concluzii	92
4.3. Studiu de retenție al unor compuși din clasa hidrocarburilor aromatice policiclice cu scopul de a evalua etil-lactatul ca un posibil modificador organic, verde al fazei mobile în separările cromatografice	94
4.3.1. Introducere	94
4.3.2. Reactivi și echipamente	96
4.3.3. Metoda cromatografică	96
4.3.3.4. Rezultate și discuții	96
4.3.3.5. Rezistența hidrodinamică la deplasarea fazei mobile	97
4.3.3.6. Lungimea de undă de cut-off	98
4.3.3.7. Echivalența între conținutul de ACN și EL din faza mobilă necesar pentru obținerea unei retenții similare	99
4.3.3.8. Aspecte termodinamice	106
4.3.3.9. Corelația datelor de retenție cromatografică cu diferiți descriptori moleculari ai analiților de interes	109
4.3.3.10. Concluzii	119
5. Concluziile tezei	119
Referințe	122
ANEXA 1	128
Lucrări publicate în domeniul tezei de doctorat	158
Participări la manifestări științifice	158

4. Parte experimentală

4. 1. Studiu de retenție al unor compuși de tip oximă printr-o metodă lichid cromatografică, pe o fază staționară care funcționează bimodal, ca alternativă indirectă și "verde" de estimare a hidrofobității.

4. 1. 1. Introducere

Cea mai cunoscută proprietate ce descrie comportamentul unei specii chimice într-un mediu biologic sau în mediul înconjurător este lipofilitatea, definită de către IUPAC ca fiind afinitatea unei molecule sau a unei grupări funcționale pentru un mediu lipofil și care este de obicei, exprimată ca distribuția între două faze ale unui sistem lichid-lichid sau lichid-solid [62].

Lipofilitatea unui medicament, de exemplu, este asociată cu activitatea biologică, abilitatea de a se lega de proteinele plasmatică, metabolismul și nu în ultimul rând cu toxicitatea acestuia, care survine în urma acumulării în membranele celulare.

Pe de altă parte, lipofilitatea influențează biodisponibilitatea și bioconcentrarea substanțelor chimice care ajung în mediul înconjurător, în special în ape și sol, de unde, prin absorbție ajung în lanțul alimentar. Distribuția compușilor chimici între sol sau sedimente și apă este un factor important în stabilirea factorilor de risc asociați cu managementul reziduurilor periculoase și cu utilizarea corectă a substanțelor chimice destinate protecției culturilor agricole [63].

Cea mai acceptată și utilizată modalitate de exprimare a lipofilității (sau a caracterului hidrofob) se realizează cu ajutorul coeficientului de partiție octanol-apă ($K_{O/W}$) sau $\log P$.

Una dintre cele mai cunoscute și folosite metode directe de determinare experimentală a $\log P$ este metoda "shake-flask" care presupune un timp lung de determinare, utilizarea de volume mari de solvent, este sensibilă la prezența impurităților, dar mai ales, prezintă acuratețe redusă la extremele intervalului valoric (pentru valori foarte mari sau foarte mici ale $\log P$), datorită procesului de emulsificare a octanolului în apă. Pentru prevenirea formării emulsiei de octanol în apă se poate folosi metoda cu agitare lentă, care deși permite determinarea $\log P$ până la valori de aproximativ 9, implică, prin comparație cu metoda inițială, un timp îndelungat de analiză și operațiuni foarte laborioase [64, 65].

Aceste metode pot fi miniaturizate și automatizate, dar și în acest caz există o serie de aspecte ce limitează utilizarea lor la un domeniu restrâns de valori ale $\log P$.

Nevoia de procesare a unui număr cât mai mare de probe într-un timp cât mai scurt, cu costuri și impact asupra mediului cât mai scăzute, a dus la găsirea unor metode alternative care să fie ușor de automatizat, să necesite cantități mici de probă, să fie insensibile la impurități, să prezinte o bună acuratețe și să ofere rezultate reproductibile. O astfel de metodă larg acceptată și recunoscută este cromatografia de lichide în fază inversă care reprezintă o modalitate indirectă de estimare a hidrofobității [63].

Estimarea $\log P$ prin intermediul cromatografiei de lichide în fază inversă este acceptată deoarece prin mecanismul de separare, ce implică partiția analiților între 2 faze nemiscibile, este simulată partiția analiților în sistemul octanol-apă și anume: faza staționară apolară poate fi asimilată cu octanolul, iar componenta apoasă a fazei mobile poate fi asimilată cu apa.

Estimarea $\log P$ din date cromatografice se face cu ajutorul factorului de retenție k . Din punct de vedere practic se determină valorile lui k pentru diferite procente de modificador organic în faza mobilă și apoi se extrapolează valoarea acestuia pentru situația în care faza mobilă este alcătuită integral (100%) din solventul apos, folosind tehnica regresiei liniare sau polinomiale [66].

Dependența factorului de retenție cu procentul de solvent organic din faza mobilă poate fi descrisă de o ecuație de tipul:

$$\log k = \log k_w + S \times \varphi \quad (13)$$

în care $\log k_w$ reprezintă valoarea extrapolată a lui $\log k$ la 100% solvent apos, iar φ reprezintă procentul de solvent organic din faza mobilă, iar pentru o regresie binomială, dependența este de tipul:

$$\log k = \log k_w + a_1 \times \varphi + a_2 \times \varphi^2 \quad (14)$$

în care semnificația lui $\log k_w$ și φ este aceeași ca în cazul regresiei liniare, a_1 și a_2 fiind parametrii regresiei și neavând de obicei o semnificație fizică anume [63].

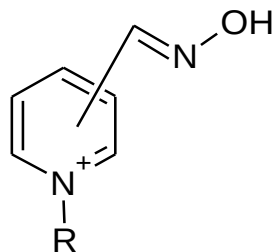
Scopul prezentului studiu se referă la estimarea unor indici de hidrofobicitate din date de retenție cromatografică și corelarea lor cu descriptorii de hidrofobicitate calculați cu ajutorul unor software-uri dedicate, pentru un set de 30 compuși din clasa mono-piridin oximelor.

Faza staționară pe care s-a realizat studiul funcționează în manieră bimodală, în funcție de procentul de solvent organic din faza mobilă: la valori de până la aproximativ 40% solvent organic, de exemplu, separarea se face după mecanism de fază inversă (RP), iar la valori de peste 80% solvent organic, mecanismul de separare este unul bazat pe interacția hidrofilă (HILIC).

4. 1. 2. Reactivi și echipamente

Studiul de retenție s-a făcut pe un set de 30 de compuși din clasa mono-piridin oximelor, a căror structură chimică este redată în **Figura 23**.

Piridin-oximele funcționează ca reactivatori ai acetilcolinesterazei, reprezentând agenți de clivare a legăturii dintre o funcțiune hidroxil dintr-un centru serinic situat la nivelul situsului activ al acetilcolinesterazei (AChE), blocată prin intermediul unui atom de fosfor dintr-o grupare (tio)fosfonil/fosforil aparținând unui gaz neurotoxic sau unei substanțe cu acțiune pesticidă.



Denumire substituent (R)	Formula substituentului (R)	Poziția grupării oximă	Acronim
Etil	-C ₂ H ₅	2, 3, 4	2-PAE,3-PAE,4-PAE
Butil	-C ₄ H ₉	2, 3	2-PAB,3-PAB
Hexil	-C ₆ H ₁₃	2, 3, 4	2-PAH, 3-PAH, 4-PAH
Octil	-C ₈ H ₁₇	2, 3, 4	2-PAO, 3-PAO, 4-PAO
Decil	-C ₁₀ H ₂₁	2, 3	2-PAD, 3-PAD
Dodecil(Lauril)	-C ₁₂ H ₂₅	2, 3, 4	2-PAL, 3-PAL, 4-PAL
Benzil	-CH ₂ -C ₆ H ₅	2, 3, 4	2-PABn, 3-PABn, 4-PABn
Etil-fenil	-(CH ₂) ₂ -C ₆ H ₅	2, 3, 4	2-PAPE, 3-PAPE, 4-PAPE
Propil-fenil	-(CH ₂) ₃ -C ₆ H ₅	3	3-PAPP
Butil-fenil	-(CH ₂) ₄ -C ₆ H ₅	3, 4	3-PAPB, 4-PAPB
4-metilbenzil	-CH ₂ -C ₆ H ₄ -(CH ₃)	2, 3, 4	2-PAMB, 3-PAMB, 4-PAMB
4-t-butilbenzil	-CH ₂ -C ₆ H ₄ -C(CH ₃) ₃	3, 4	3-PATB, 4-PATB

Figura 23. Structura compușilor considerați pentru studiu.

Anionul oximat acționează ca un agent nucleofil, în timp ce atomul de azot cuaternar contribuie la poziționarea corectă a moleculei reactivatorului în raport cu centrul anionic reprezentând situl secundar de legare la nivelul intrării într-un canal îngust situat la suprafața enzimei.

Cu ajutorul unor softwar-uri dedicate, utilizând diverși algoritmi computaționali au fost calculate valorile unor descriptori de hidrofobicitate (denumiți generic log P) și ai unor parametri ai sistemului de clasificare biofarmaceutică (BCS) - solubilitatea în fluide biologice simulate și permeabilitatea gastro intestinală. Valorile log P calculate pentru analiții de interes prin diferiți algoritmi computaționali și corelația reciprocă dintre aceștia sunt ilustrate în **Tabelul 1***. (* numerotarea tabelelor și a figurilor este cea din teză).

4.1.3. Metoda cromatografică

Studiul de retenție s-a efectuat pe o coloană Acclaim Mixed-Mode HILIC-1 termostată la 25° C. O astfel de fază staționară constă în particule sferice, reprezentând silicagel modificat chimic cu radicali diol. Funcțiunile diol sunt legate la suprafața silicagelului prin intermediul unor lanțuri hidrocarbonate cu 12 atomi de carbon. Lanțurile alchilice creează condițiile necesare pentru interacțiile de tip hidrofob, în timp ce grupările diol vicinale asigură mediul hidrofil pentru mecanismul de interacție hidrofilă.

Volumul de injecție utilizat a fost de 2 μL. Studiul s-a făcut în condiții izocratice, pe un domeniu de la 5% la 90% solvent B.

Deteția s-a făcut monitorizând lungimile de undă de 220, 254 și 300 nm (± 4 nm), cu o referință la lungimea de undă de 480 nm (± 10 nm).

4.1.4. Rezultate și discuții

Estimarea indicilor de hidrofobicitate din date de retenție cromatografică a implicat o serie de etape. O primă astfel de etapă a fost calculul factorului de retenție $k=(t_R-t_0)/t_0$, unde t_R este timpul de retenție absolut, iar t_0 reprezintă timpul mort al coloanei. Timpul mort a fost determinat prin observarea picului de injecție. Fiecare injecție a fost repetată de trei ori. Pentru calculul factorului de retenție (k) s-a făcut media valorilor obținute, atât pentru timpul mort (t_0), cât și pentru timpul de retenție absolut (t_R), pentru cele 3 injecții. Pe durata studiului, nu s-au înregistrat valori ale deviațiilor standard (RSD) pentru valorile factorilor de retenție mai mari de 2%. Pentru coloana Acclaim Mixed-Mode HILIC-1 exploatată în condițiile experimentale, valoarea medie a timpului mort a fost de 1,23 min.

Valorile factorului de retenție au fost folosite pentru trasarea dependențelor funcționale $k=f(\phi)$ și $\log k=f(\phi)$, unde ϕ reprezintă procentul de modificador organic din faza mobilă. Exemple de astfel de dependențe sunt redată în **Figura 29.**, pentru 3-PAE-I și 3-PATB-Br.

După cum lesne se poate observa din **Figura 29.**, profilul retenției este o curbă în formă de U.

Partea stângă a curbei poate fi atribuită mecanismului de separare în fază inversă (RP), în care retenția scade cu creșterea procentului de solvent organic din faza mobilă. Separarea în RP se realizează prin repartiția analiților între faza mobilă polară și stratul hidrofob reprezentat de lanțurile hidrocarbonate (alchil) imobilizate chimic la suprafața particulelor de silicagel.

Partea dreaptă a curbei poate fi atribuită mecanismului de interacție hidrofilă (HILIC), când retenția crește odată cu creșterea componentei organice a fazei mobile. Separarea, în acest caz, are loc prin partiția analiților între faza mobilă și o peliculă de apă imobilizată prin intermediul legăturilor de hidrogen, la nivelul grupărilor diol vicinale, situate la capătul lanțurilor alchilice ale fazei staționare. În acest context, faza mobilă (cu un conținut important de solvent organic, în speță acetonitril) prezintă un caracter mai puțin polar în raport cu filmul de apă reținut la suprafața fazei staționare.

Tabel 1. Valori log P calculate pentru analiții de interes și corelația dintre aceștia.

#	Analit	ALOGPs	AC logP	miLogP	KOWWIN	XLOGP2	XLOGP3	ALOGP	Hy	MLOGP	SlogP	SLogD7.4	LogD7
1	2-PAE	-2.33	1.12	-2.47	-0.80	1.02	1.34	1.41	-0.12	0.81	-2.37	-2.90	-4.56
2	3-PAE	-2.76	1.01	-2.76	-0.80	0.93	1.00	0.98	-0.12	0.81	-2.54	-3.60	-4.06
3	4-PAE	-2.81	1.02	-3.73	-0.80	0.93	1.00	0.98	-0.12	0.81	-2.40	-3.29	-4.19
4	2-PAB	-1.69	2.05	-1.41	0.18	1.95	2.22	2.39	-0.20	1.43	-1.50	-2.19	-3.69
5	3-PAB	-2.22	1.94	-1.70	0.18	1.86	1.89	1.96	-0.20	1.43	-1.62	-2.82	-3.20
6	2-PAH	-0.71	2.97	-0.40	1.16	3.09	3.30	3.30	-0.27	2.00	-0.56	-1.37	-2.90
7	3-PAH	-1.46	2.87	-0.69	1.16	3.00	2.97	2.87	-0.27	2.00	-0.66	-2.01	-2.40
8	4-PAH	-1.35	2.87	-1.65	1.16	3.00	2.97	2.87	-0.27	2.00	-0.54	-1.73	-2.53
9	2-PAO	0.54	3.90	0.61	2.14	4.23	4.39	4.21	-0.31	3.45	0.45	-0.47	-2.11
10	3-PAO	-0.71	3.80	0.32	2.14	4.14	4.05	3.78	-0.31	3.45	0.35	-1.18	-1.61
11	4-PAO	-0.67	3.80	-0.64	2.14	4.14	4.05	3.78	-0.31	3.45	0.45	-0.88	-1.74
12	2-PAD	1.51	4.83	1.62	3.13	5.36	5.47	5.12	-0.35	3.95	1.47	0.46	-1.32
13	3-PAD	0.41	4.73	1.33	3.13	5.27	5.14	4.69	-0.35	3.95	1.37	-0.34	-0.82
14	2-PAL	2.43	5.76	2.63	4.11	6.50	6.55	6.04	-0.39	4.43	2.47	1.40	-0.52
15	3-PAL	1.40	5.66	2.35	4.11	6.41	6.22	5.61	-0.39	4.43	2.37	0.50	-0.03
16	4-PAL	1.27	5.66	1.38	4.11	6.41	6.22	5.61	-0.39	4.43	2.44	0.87	-0.15
17	2-PABn	-1.10	2.34	-1.25	0.41	1.96	2.63	2.64	-0.29	2.02	-1.08	-1.69	-3.13
18	3-PABn	-1.79	2.23	-1.54	0.41	1.87	2.30	2.21	-0.29	2.02	-1.22	-2.35	-2.63
19	4-PABn	-2.00	2.23	-2.51	0.41	1.88	2.75	0.32	-0.29	1.95	-1.07	-2.07	-2.75
20	2-PAPE	-0.74	2.40	-1.04	0.91	2.47	2.93	2.96	-0.31	2.29	-0.84	-1.54	-2.87
21	3-PAPE	-1.81	2.29	-1.33	0.91	2.39	2.59	2.53	-0.31	2.29	-0.97	-2.19	-2.38
22	4-PAPE	-1.82	2.29	-2.30	0.91	2.38	2.59	2.53	-0.31	2.29	-0.82	-1.89	-2.50
23	3-PAPP	-1.59	2.76	-0.81	1.40	2.74	2.95	2.99	-0.33	2.54	-0.60	-1.88	-1.98
24	3-PAPB	-1.31	3.22	-0.54	1.89	3.31	3.31	3.45	-0.35	2.79	-0.16	-1.50	-1.58
25	4-PAPB	-1.34	3.22	-1.51	1.89	3.31	3.31	3.45	-0.35	2.79	-0.02	-1.23	-1.71
26	2-PAMB	-0.78	2.65	-0.81	0.96	2.40	3.00	3.13	-0.31	2.29	-0.71	-1.34	-2.66
27	3-PAMB	-1.48	2.55	-1.09	0.96	2.31	2.66	2.70	-0.31	2.29	-0.86	-2.00	-2.16
28	4-PAMB	-1.71	2.55	-2.06	0.96	2.31	2.66	2.70	-0.31	2.29	-0.71	-1.71	-2.29
29	3-PATB	-0.35	3.75	0.17	2.32	3.69	3.97	3.61	-0.37	3.04	0.41	-0.92	-1.00
30	4-PATB	-0.22	3.75	-0.80	2.32	3.69	3.97	3.61	-0.37	3.04	0.55	-0.62	-1.13
Coefficient corelație		ALOGPs	AC logP	miLogP	KOWWIN	XLOGP2	XLOGP3	ALOGP	Hy	MLOGP	SlogP	SLogD7.4	LogD7
ALOGPs			0.9477	0.9490	0.9227	0.9430	0.9655	0.9394	-0.7188	0.9118	0.9417	0.9760	0.8140
AC logP				0.9421	0.9920	0.9935	0.9945	0.9523	-0.8029	0.9739	0.9968	0.9718	0.9353
miLogP					0.9226	0.9405	0.9459	0.9434	-0.7169	0.9083	0.9233	0.9158	0.8363
KOWWIN						0.9848	0.9832	0.9505	-0.8479	0.9804	0.9955	0.9610	0.9634
XLOGP2							0.9892	0.9549	-0.7543	0.9639	0.9889	0.9594	0.9115
XLOGP3								0.9438	-0.7983	0.9715	0.9934	0.9832	0.9138
ALOGP									-0.7602	0.9302	0.9467	0.9439	0.8663
Hy										-0.8638	-0.8302	-0.8091	-0.9095
MLOGP											0.9805	0.9507	0.9487
SlogP												0.9760	0.9474
SlogD7.4													0.8797

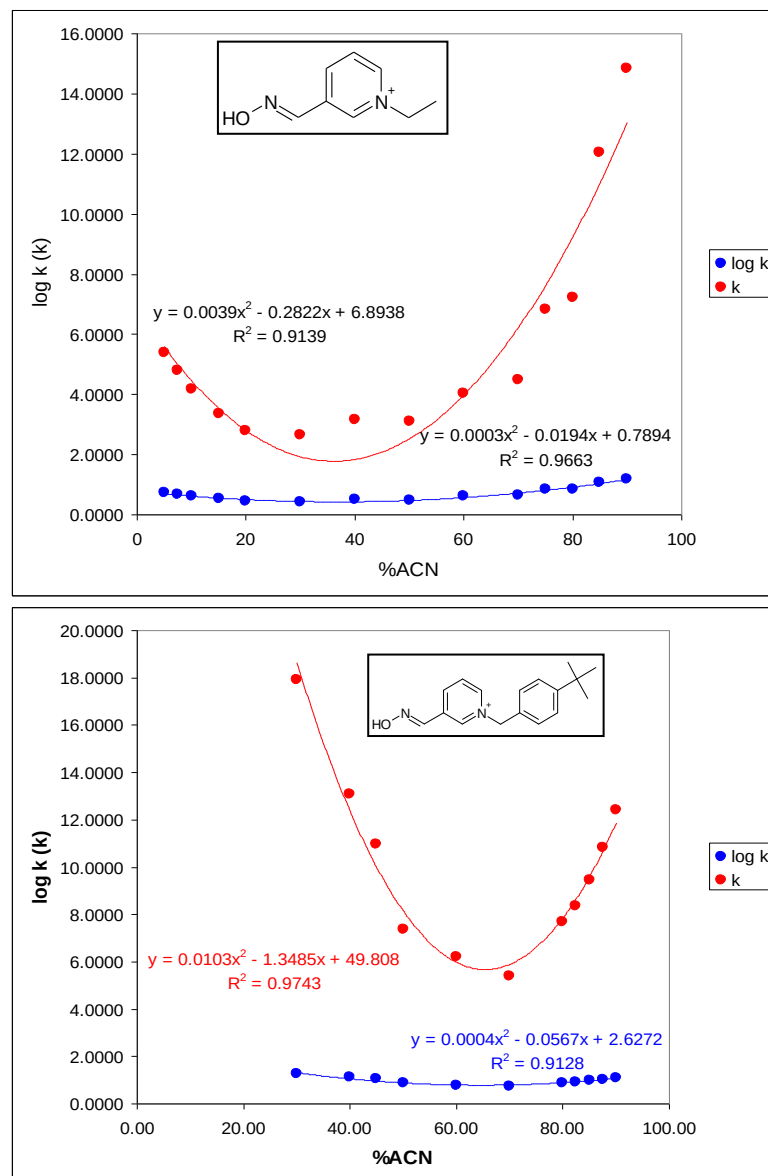


Figura 29. Dependențele funcționale reprezentând variația factorului de retenție (k) și respectiv ale logaritmului factorului de retenție ($\log k$) în raport cu procentul de solvent organic din faza mobilă, pentru analiții 3-PAE-I și 3-PATB-Br

Un interes deosebit s-a acordat porțiunii din curbă pentru care retenția este minimă ($k_{\min}$ sau $\log k_{\min}$) și compoziției fazei mobile la care retenția este minimă (ϕ corespunzător lui $k_{\min}$ sau $\log k_{\min}$). Această compoziție a fost denumită arbitrar ISOELUT. Indicilor de hidrofobicitate estimați din dependențele funcționale $\log k=f(\phi)$, le va fi adăugat prefixul LOG.

4.1.4.1. Indici de hidrofobicitate cromatografici

Valorile minime pentru factorul de retenție ($k_{\min}$) și ale logaritmului corespunzător ($\log k_{\min}$) se pot determina din datele de retenție corespunzătoare fiecărui analit.

Indicii notați cu **ISOELUT** și **LOG ISOELUT** pot fi determinați în primă instanță printr-o fitare polinomială (de gradul II), aplicată pentru toate valorile experimentale. Practic, se trasează dependențele funcționale $k/\log k = f(\phi)$. Valorile experimentale ale retenției se corelează cu procentul de modificator organic din faza mobilă, după o relație de tipul

$$c + b \times \phi + a \times \phi^2, \text{ al cărei minim este } -\frac{b}{2a}.$$

Urmând același algoritm, pentru cele 2 porțiuni ale curbei de eluție, prin aplicarea unor regresii liniare sau de tip putere și egalarea ecuațiilor corespunzătoare regresiilor se pot determina indicii notați cu **ISOELUT1** sau **LOG ISOELUT 1** (pentru regresii liniare) și respectiv **ISOELUT2** sau **LOG ISOELUT2** (pentru regresii de tip putere).

Pentru a se face o comparație cu scalele de hidrofobicitate ”uzuale”, valorile retenției, exprimată prin factorul de retenție (k) sau prin logaritmul acestuia ($\log k$) au fost extrapolate la o compoziție ipotetică a unei faze mobile cu un conținut de 100% apă, situație în care k și $\log k$ devin k_w și $\log k_w$. Extrapolarea a fost făcută prin regresii liniare și binomiale, pe porțiunea din curba de eluție corespunzătoare mecanismului RP. Acești indici de hidrofobicitate au fost notați cu k_w^{lin} , $\log k_w^{lin}$, k_w^{bin} și $\log k_w^{bin}$. Pentru porțiunea corespunzătoare mecanismului HILIC a curbei de eluție a fost propusă o scală de hidrofilicitate, prin extrapolarea retenției la o fază mobilă cu un conținut exclusiv de solvent organic ($\phi = 100\%$). Indicii corespunzători au fost notați cu **HYL** sau **LOG HYL**.

Corelarea valorilor descriptorilor de hidrofobicitate obținute din date de retenție cromatografică cu valorile calculate prin software-urile enumerate în secțiunea experimentală este prezentată în **Tabelul 7**.

Tabelul 7. Coeficienții de corelație dintre valorile descriptorilor de hidrofobicitate estimați din date de retenție cromatografică și cei calculați.

	r_{xy}									
	ALOGPs	AClogP	miLogP	KOWWIN	XLOGP2	XLOGP3	Hy	MLOGP	ALOGP	Log D7
k_{min}	0,958	0,977	0,934	0,963	0,977	0,983	-0,758	0,935	0,943	0,884
$\log k_{min}$	0,938	0,977	0,927	0,973	0,964	0,978	-0,894	0,954	0,944	0,918
ISOELUT	0,842	0,915	0,835	0,942	0,895	0,899	-0,891	0,914	0,904	0,931
LOG ISOELUT	0,809	0,881	0,810	0,904	0,865	0,873	-0,874	0,880	0,885	0,864
ISOELUT1	0,479	0,512	0,460	0,508	0,484	0,529	-0,518	0,577	0,393	0,537
LOG ISOELUT1	0,678	0,740	0,661	0,752	0,700	0,750	-0,817	0,806	0,640	0,788
ISOELUT2	0,552	0,598	0,526	0,602	0,558	0,621	-0,730	0,668	0,493	0,642
LOG ISOELUT2	0,193	0,209	0,117	0,214	0,201	0,226	-0,267	0,240	0,135	0,232
k_w^{lin}	0,788	0,784	0,767	0,753	0,793	0,787	-0,546	0,803	0,770	0,652
$\log k_w^{lin}$	0,847	0,862	0,836	0,843	0,862	0,863	-0,672	0,878	0,840	0,766
k_w^{bin}	0,754	0,812	0,756	0,787	0,817	0,800	-0,570	0,814	0,778	0,714
$\log k_w^{bin}$	0,139	0,278	0,202	0,304	0,246	0,239	-0,377	0,257	0,259	0,374
HYL	0,488	0,472	0,479	0,413	0,458	0,502	-0,327	0,520	0,363	0,363
LOG HYL	0,430	0,405	0,420	0,346	0,400	0,440	-0,245	0,464	0,298	0,291

În **Tabelul 7**, cu caractere îngroșate (bold) sunt figurate valorile coeficientului de corelație (r) mai mari de 0,9. Caracterele îngroșate și italice reprezintă valorile lui r cuprinse între 0,8 și 0,9. Analizând datele din **Tabelul 7**, se poate observa că indicii k_{min} , $\log k_{min}$, ISOELUT și LOG ISOELUT sunt mai bine corelați cu descriptorii de hidrofobicitate calculați, comparativ cu toți ceilalți descriptori estimați din date de retenție cromatografică.

4.1.4.2. Aspecte termodinamice

Trecerea de la mecanismul de RP la cel de HILIC a fost evaluată, sub aspect termodinamic, pentru compusul 3-PAB.

Studiul de retenție s-a făcut în condițiile unei faze mobile ACN/apă, în care proporția de solvent organic a fost de 10, 40, 55, 80 și 90%. Valorile temperaturii la care a fost ținută coloana cromatografică au fost de 20, 25, 30, 35, 40 și 45°C.

După trasarea dependențelor funcționale $\ln k = f(1/T)$, cunoscute ca și curbele van't Hoff, au fost calculate entalpia (ΔH^0), entropia (ΔS^0) și energia liberă Gibbs (ΔG^0), corespunzătoare transferului analitilor între faza mobilă și faza staționară. Datorită faptului că pe profilul retenției, pe cele 2 laturi ale curbei în formă de U se observă că retenția este aproximativ

identică, egalând relațiile van't Hoff corespunzătoare mecanismului RP și respectiv HILIC se poate deduce că volumul stratului apos reținut la suprafața fazei staționare este într-o bună aproximație apropiat ca valoare de cel al stratului hidrocarbonat.

4.1.5. Concluzii

În urma studiului de retenție al unor compuși din clasa mono-piridinoximelor, pe o fază staționară ce funcționează bimodal, în sensul că separările pot avea loc atât după un mecanism RP cât și după unul HILIC, a fost propusă o serie de indici de hidrofobicitate.

S-a demonstrat că retenția minimă, exprimată prin factorul de retenție și prin logaritmul acestuia, respectiv ($k_{\min}$, $\log k_{\min}$) și compoziția fazei mobile corespunzătoare retenției minime (ISOELUT și LOG ISOELUT) pot funcționa ca descriptori de hidrofobicitate. Valorile acestor indici se corelează acceptabil la nivel statistic cu valorile $\log P$ calculate. Mai mult, corelația acestor indici nou propuși este adeseori superioară celor estimați prin procedurile deja în uz, și anume prin extrapolarea retenției la o compoziție a fazei mobile exclusiv apoase ($\phi=0\%$), cu ajutorul regresiei liniare sau binomiale.

Estimarea indicilor de hidrofobicitate din date de retenție cromatografică, pe o coloană care funcționează bimodal poate fi utilă în elaborarea unor scale de hidrofobicitate pentru compuși ce prezintă anumite particularități structurale și pentru care abordarea bazată pe un singur mecanism de separare poate fi dificilă sau neconcludentă.

4.2. Propilen carbonatul ca posibil modificador organic al fazei mobile în cromatografia de lichide de înaltă performanță

4.2.1. Introducere

Impactul tehnicilor cromatografice asupra mediului înconjurător poate fi unul redus doar dacă, de-a lungul întregului proces de analiză, începând cu prelevarea probelor, prelucrarea acestora (prin extracție, derivatizare și orice alt procedeu necesar în vederea analizei), și continuând cu analiza propriu-zisă, sunt luate în considerare principiile chimiei verzi.

Potențialul cromatografiei de lichide de înaltă performanță (HPLC) de a se constitui ca o metodă analitică verde poate fi pus în practică prin procedeele deja cunoscute și general acceptate, care constau în reducerea consumului de solvenți organici și/sau înlocuirea acestora cu variante mai puțin dăunătoare, cu impact redus asupra sănătății utilizatorilor cât și asupra mediul înconjurător [22].

Evaluarea gradului de verde al unui solvent se face pe baza a 2 criterii principale: pe baza metodologiei de evaluare a ciclului de viață (LCA) și pe baza proprietăților privitoare la siguranța acestora, atât în raport cu mediul înconjurător cât și cu sănătatea umană (EHS) [69, 70].

Printre cei mai cunoscuți și utilizați solvenți care îndeplinesc majoritatea condițiilor asociate solvenților verzi se numără apa, dioxidul de carbon în stare critică (CO_2) și lichidele ionice.

În ultimul deceniu o serie de solvenți încep să fie din ce în ce mai utilizați în practică și în consecință să fie tot mai prezenți în literatura de specialitate datorită caracterului lor verde și a utilizării lor în cadrul proceselor sustenabile. Rezultatele obținute, prin utilizarea acestor solvenți s-au dovedit a fi superioare, comparativ cu cele obținute în cazul solvenților obținuți din surse convenționale, în special din petrol.

Solvenții proveniți din surse regenerabile, căci despre ei este vorba, au devenit disponibili comercial și printre cei mai cunoscuți se pot aminti propilen -carbonatul (PC), etil-lactatul (EL) sau *d*-limonenul [71].

În ciuda faptului că mulți dintre acești solvenți sunt disponibili comercial ca solvenți de puritate cromatografică, ei au fost prea puțin investigați ca potențiali solvenți alternativi în HPLC.

Propilen-carbonatul (R,S-4-metil-1,3-dioxolan-2-onă) este un ester al acidului carbonic,

obținut din propilen glicol prin diverse metode de sinteză mai mult sau mai puțin verzi [72-75] și este folosit ca solvent polar aprotic, atât în chimia analitică cât și în sintezele organice [76-78].

Substituirea acetonitrilului (ACN), în cromatografia de lichide bazată pe mecanism de fază inversă cu un amestec de PC și metanol (MeOH), în cadrul unor aplicații din domeniul farmaceutic și al mediului a fost deja raportată în literatură [79-82]. Această abordare, de a utiliza un amestec de PC și MeOH, ca alternativă verde a avut ca scop studierea unor aspecte ce țin strict de aplicabilitatea unui asemenea amestec, fără a se investiga în amănunt ce presupune o astfel de substituție. De aceea, în prezentul studiu au fost studiate o serie de aspecte practice și fundamentale ce țin de o astfel de abordare.

Studiind în manieră comparativă proprietățile ACN și PC respectiv cele ale MeOH și etanolului (EtOH), se poate lesne deduce că un amestec PC/EtOH reprezintă o alternativă mai verde în raport cu amestecul PC/MeOH și în mod evident, mult mai verde decât ACN.

În studiul de față, posibilitatea înlocuirii ACN cu PC a fost evaluată în conformitate cu următoarele aspecte:

- Condițiile necesare pentru a obține o miscibilitate totală între componentele fazei mobile
- Rezistența hidrodinamică la deplasarea fazei mobile (căderea de presiune) în sistemul cromatografic
- Echivalența între conținutul de ACN și PC din faza mobilă pentru a obține o retenție similară
- Toleranța față de soluții tampon anorganice
- Debitul optim determinat din curbele van Deemter
- Compararea între datele termodinamice asociate retenției cromatografice
- Influența PC asupra detecției UV
- Evaluarea posibilității înlocuirii ACN cu PC în separarea unor compuși prin cromatografie de lichide bazată pe mecanism cu formare de perechi ionice respectiv de interacție hidrofilă (HILIC).

4.2.4. Rezultate și discuții

Studiind comparativ caracteristicile ACN și PC, prezentate în **Tabelul 11**, se poate observa că atât ACN cât și PC sunt solvenți polari, aprotici, caracterizați de momente de dipol mari și de valori relativ asemănătoare ale solubilității Hansen și Hildebrand. Pe lângă aceste caracteristici asemănătoare se pot de asemenea observa 2 aspecte care necesită o investigare atentă.

Un prim aspect se referă la faptul că PC este parțial miscibil cu apa și ca atare fazele mobile obținute în amestec cu aceasta nu sunt omogene pe tot domeniul rapoartelor de amestecare.

Al doilea aspect este legat de valorile mai mari ale densității și vâscozității PC, comparativ cu cele ale ACN. O consecință a acestor din urmă caracteristici poate fi o rezistență hidrodinamică sensibil mai mare la deplasarea fazei mobile și o rezistență mai mare la transferul de masă al analiților în faza mobilă. Rezistența crescută la transferul de masă poate fi urmată, de asemenea, de o scădere a eficienței separărilor cromatografice.

4.2.4.1. Studiu de miscibilitate

Dat fiind faptul că PC este parțial miscibil cu apa, se impune identificarea unui al treilea solvent pentru a genera un sistem ternar care să asigure o fază mobilă omogenă pe tot domeniul de rapoarte volumetrice de amestecare. Alcoolii inferiori pot reprezenta un astfel de solvent, deoarece sunt miscibili cu apa în orice proporție. Ținând cont de densitatea, vâscozitatea și de faptul că scopul prezentului studiu a fost de a evalua o alternativă verde la solvenții dăunători, etanolul (EtOH) a fost ales drept componentă a sistemului ternar. Stabilirea rapoartelor volumetrice necesare pentru ca cele 3 componente ale fazei mobile să fie total miscibile a fost făcută astfel:

- pentru faze mobile cu un conținut mare de apă, PC a fost adăugat în amestec cu

EtOH;

- pentru faze mobile cu un conținut scăzut de apă, PC a fost adăugat amestecului apă/EtOH.

În urma acestei abordări s-a putut observa că proporția necesară pentru a se obține o miscibilitate completă între PC sau apă și etanol a fost de cel puțin 7/3, în rapoarte de volum.

4.2.4.2. Rezistența hidrodinamică la deplasarea fazei mobile

În cazul în care faza mobilă constituită din amestecul binar ACN/H₂O este înlocuită cu un amestec ternar PC/EtOH/H₂O, creșterile valorice referitoare la căderea de presiune înregistrată pe coloana cromatografică pot fi de la 1,1 ori la 9,2 ori mai mari.

Valori mai mari de presiune sunt obținute în cazul în care PC este adăugat amestecului de EtOH/H₂O (7/3 v/v), comparativ cu situația când eluția se realizează cu o fază mobilă obținută prin adăugarea amestecului PC/EtOH (7/3 v/v) în H₂O.

Trebuie însă menționat că în condițiile experimentale abordate în studiul nostru, limita de 400 bar a presiunii, acceptată pentru sistemele HPLC "clasice" nu a fost depășită.

4.2.4.3. Echivalența între conținutul de ACN și PC din faza mobilă necesar pentru o retenție similară

Condițiile practice necesare pentru a se face trecerea de la un mod de eluție bazat pe ACN/apă la cel bazat pe PC/EtOH/apă sunt ca acest transfer să poată fi făcut într-un mod simplu și rapid, fără a compromite însă criteriile de performanță sau selectivitatea.

Studiul de evaluare a transferului metodei cromatografice bazate pe ACN la cea bazată pe PC s-a făcut cu ajutorul a 3 seturi de compuși:

- Un set de compuși cu caracter acid (acizii fenofibric, lovastatic și simvastatic)
- Un set de compuși cu caracter neutru (toluen, fluoren și fluoranthen)
- Un set de compuși cu caracter bazic (carbamazepină, diltiazem și nicergolină).

Studiul de retenție s-a făcut pe o coloană Purospher STAR RP-18e (75 mm L x 4 mm i.d. x 3 μm d.p.), termostată la 25 °C. Separările s-au făcut izocratic, la debitul de 0,5 mL/min.

În modul de eluție bazat pe ACN, pentru compușii cu caracter acid, componenta apoasă a fazei mobile a fost reprezentată de o soluție de 0,1% acid formic, pentru compușii cu caracter neutru apa neaditivată a fost componenta apoasă a fazei mobile, iar pentru cei cu caracter bazic componenta apoasă a fazei mobile a fost reprezentată de o soluție tampon borat, de concentrație 5 mM, având pH = 9.

În modul de eluție alternativ PC a fost adăugat amestecului EtOH/apă (7/3 v/v), cu aceeași aditivi ca în cazul modului de eluție bazat pe ACN. Detecția UV s-a făcut prin monitorizarea lungimilor de undă de 238 nm pentru compușii având caracter acid, 254 nm pentru cei cu un caracter neutru și 220 nm pentru cei cu un caracter bazic.

În prima etapă a transferului metodei s-a făcut trecerea de la ACN la PC și de la apă la apă/EtOH (7/3 v/v), urmată de înregistrarea cromatogramelor corespunzătoare.

În **Figura 39**, sunt prezentate cromatogramele corespunzătoare compușilor de interes, în ambele moduri de eluție, unde se poate observa că atunci când conținutul de PC/EtOH din faza mobilă se apropie de cel al ACN și comportamentul speciilor studiate devine asemănător.

S-a considerat că echivalența între cele 2 moduri de eluție, cel bazat pe ACN și cel alternativ, bazat pe PC, se obține când diferența dintre timpii de retenție corespunzători celor două moduri de eluție este minimă (relația 21)

$$\Delta t_R^{total} = \sum_{i=1}^n (t_R^{PC} - t_R^{ACN}) = \min \quad (21)$$

În continuare a fost studiată variația timpului de retenție, pentru acidul fenofibric, toluen și diltiazem în funcție de conținutul de modificator organic din faza mobilă $t_R = f(\% \text{ modif.})$

org.). Dependențele funcționale obținute au fost liniarizate prin dublă logaritmare și au fost obținute următoarele relații:

$$\log(t_{R_i}^{ACN}) = B_i \log(\%ACN) + A_i \quad (22)$$

$$\log(t_{R_i}^{Org}) = b_i \log(\%Org) + a_i \quad (23)$$

Ținând cont de faptul că

$$\%Org = 0,7 \times \%PC + 30 \quad (24)$$

și având ca scop egalizarea timpilor de retenție ($t_R^{ACN} = t_R^{Org}$), se obține pentru conținutul de PC următoarea relație

$$\%PC = \left[\frac{A_i - a_i}{(1/0,7) \times 10^{b_i}} \times \%ACN^{b_i} \right] - (30/0,7) = \left[1,43 \times 10^{b_i} \%ACN \right] - 42,78 \quad (25)$$

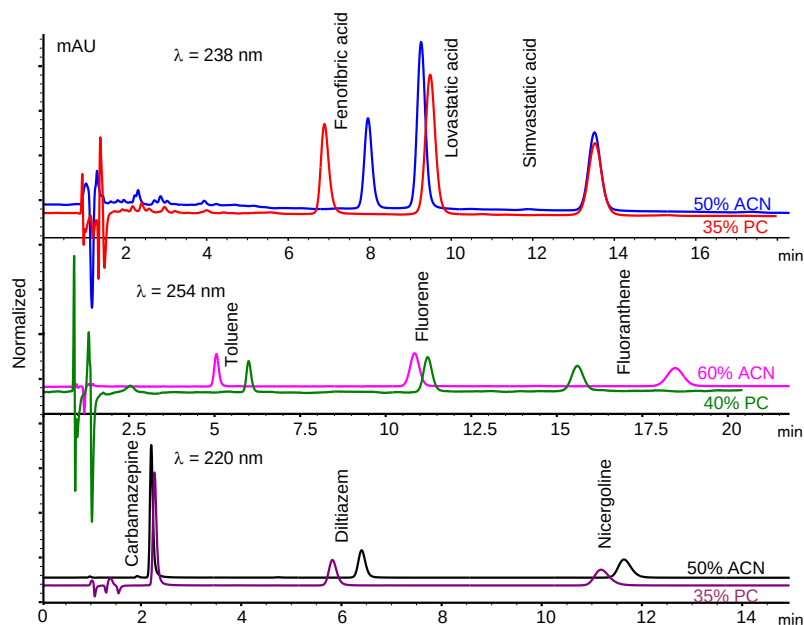


Figura 39. Cromatogramele obținute la înlocuirea ACN cu PC/EtOH în separarea unor compuși având caracter acid, neutru și bazic.

Conținutul echivalent de %PC s-a calculat pe baza relației (25), la un la un conținut de 30-80% ACN al fazei mobile, pentru cei 3 compuși studiați și se obține, indiferent de natura compusului, o relație generală de tipul:

$$\%PC = 1,37(\pm 0,06) \times \%ACN - 36,7(\pm 4,4) \quad (26)$$

În relația (26) numerele din paranteze reprezintă deviațiile standard ale pantei și respectiv interceptului.

Algoritmul prezentat pentru a stabili echivalența între conținutul de ACN și respectiv PC/EtOH din faza mobilă, necesar pentru a obține o retenție similară este verificat de cromatogramele prezentate în **Figura 39**.

4.2.4.4. Toleranța față de soluții tampon anorganice

Separarea compușilor cu caracter bazic, în ambele moduri de eluție, atât în cel bazat pe

ACN, cât și în cel bazat pe PC/EtOH s-a făcut printr-o metodă cromatografică în care componenta apoasă a fazei mobile a fost, în ambele cazuri, o soluție tampon borat de diverse concentrații (10, 25, 75 și 100 mM). Pentru fiecare nivel de concentrație al soluției tampon a fost monitorizat cum se modifică timpul de retenție, simetria picurilor cromatografice și eficiența separării cromatografice.

Odată cu creșterea concentrației soluției tampon nu s-au observat modificări ale solubilității în modul de eluție bazat pe PC/EtOH. Efectul de salting-out este mai pronunțat pentru compușii care au o retenție mai mare, în cazul fazei mobile a cărei componentă organică este PC/EtOH, comparativ cu ACN. La concentrații ale soluției tampon mai mari de 50 mM retenția se stabilizează (**Figura 41.**).

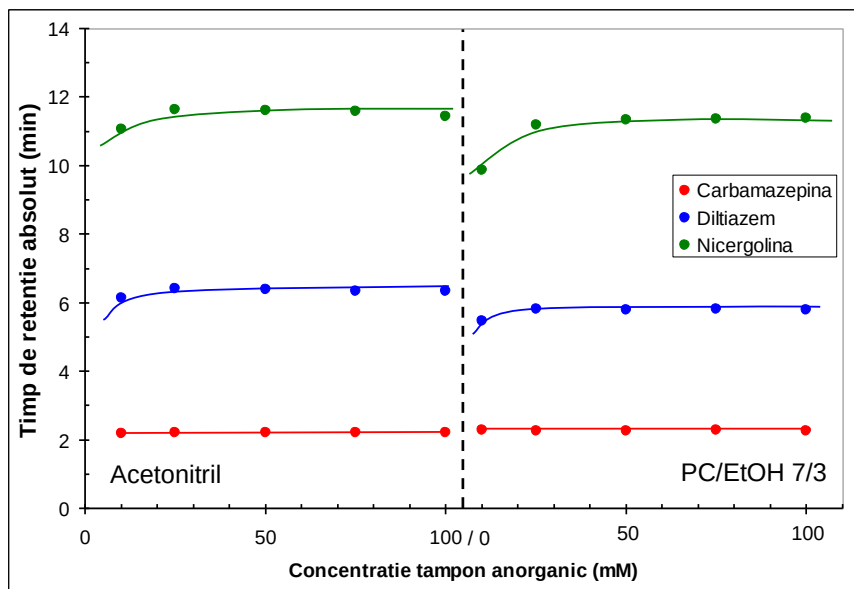


Figura 41. Modificarea timpului de retenție absolut în funcție de concentrația soluției tampon din faza mobilă

Eficiența separării cromatografice, așa cum se poate observa și în **Figura 43.**, în modul de eluție bazat pe ACN este superioară modului de eluție alternativ. Acesta poate fi un argument în favoarea unei difuzii scăzute a analiților în faza mobilă bazată pe PC/EtOH.

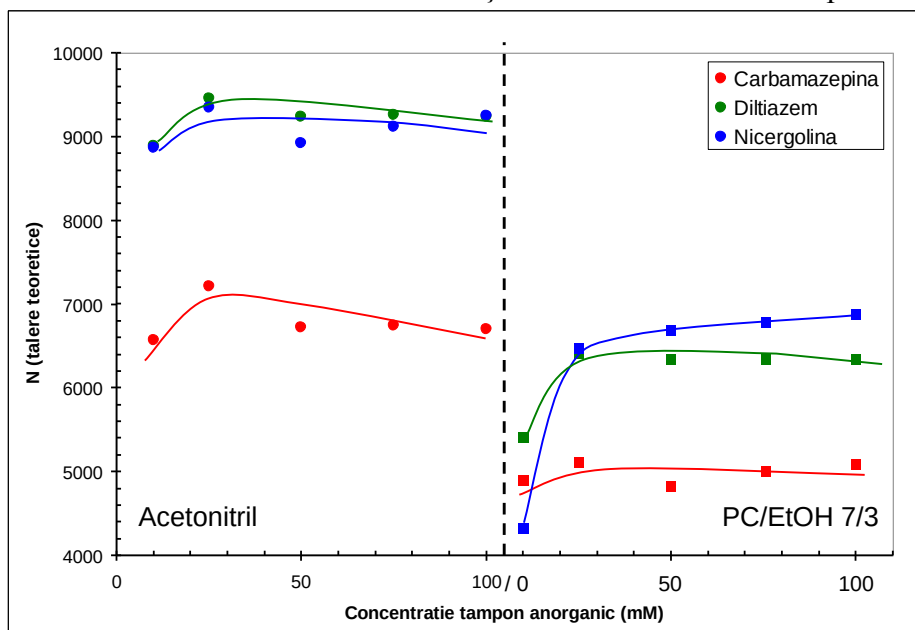


Figura 43. Dependența eficienței separării cromatografice de concentrația soluției tampon din faza mobilă

4.2.4.5. Curbele van Deemter

Curbele van Deemter ce redau dependența eficienței, exprimată în termeni de HETP, de viteza medie a fazei mobile au fost trasate pentru fluoranten și acidul simvastatic, în ambele moduri de eluție.

Studiul de retenție s-a făcut pe coloana Purospher STAR RP-18e (75 mm L x 4 mm i.d. x 3 μ m d.p., termostată la 25°C.

Debitul fazei mobile a variat, în intervalul 0,1-1 mL/min, în cazul PC și în intervalul 0,3-1,2 mL/min în cazul ACN, în pași de 0,1 mL/min, în ambele moduri de eluție.

În **Figura 44.**, sunt redate curbele van Deemter, pentru cei 2 compusi studiați, în ambele moduri de eluție. Se poate observa că în cazul ACN (dependențe funcționale figurate în culoarea albastră) valorile de minim (eficiență maximă) se obțin la viteze mai mari de deplasare a fazei mobile decât în cazul PC (dependențe funcționale figurate în culoarea roșie). Partea din dreapta a dependenței funcționale van Deemter, cea care ilustrează rezistența la transferul de masă în faza mobilă și respectiv staționară, cunoaște o creștere mai semnificativă cu creșterea vitezei fazei mobile, în cazul PC.

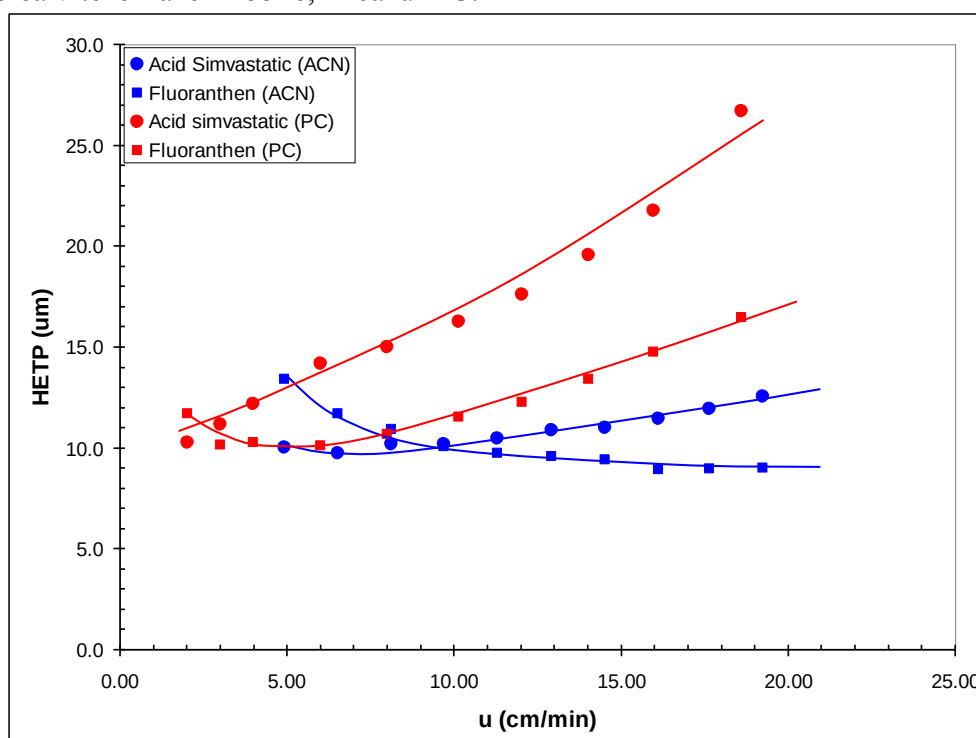


Figura 44. Dependente funcționale van Deemter pentru acidul simvastatic și fluoranten, în ambele moduri de eluție (ACN vs. PC).

Această observație nu face decât să susțină afirmația teoretică expusă anterior în acest capitol, referitoare la faptul că, datorită densității și vâscozității mari a PC (comparativ cu ACN) este de așteptat ca difuzia analiților să se realizeze mai anevoios, ceea ce atrage după sine o creștere a rezistenței la transferul de masă a analitului în faza mobilă.

4.2.4.6. Aspecte termodinamice

Înlocuirea ACN cu PC a fost evaluată din punct de vedere termodinamic. Studiul de retenție s-a făcut pe aceeași coloană, descrisă în paragraful 4.2.4.3., termostată într-un interval de temperatură cuprins între 15 și 45 °C, modificată în pași de 5 °C. Curbele van't Hoff $\ln k = f(1/T)$ au fost trasate pentru acidul fenofibric, toluen, acidul simvastatic, flouren și fluoranten.

În modul de eluție bazat pe ACN, faza mobilă a fost de tipul ACN/soluție apoasă de acid formic 0,1% (6/4 v/v), iar în modul de eluție alternativ, de forma PC combinat cu un

amestec de acid formic 0,1% în apă și EtOH (7/3 v/v), în raport de 4/6 v/v. Curbele van't Hoff au fost liniare, pe tot domeniul de temperatură studiat cu coeficienți de corelație mai mari de 0,99, cu excepția acidului simvastatic, în ambele moduri de eluție și în cel bazat pe PC, în special. Liniaritatea curbelor van't Hoff indică faptul că mecanismul de separare nu se modifică cu variația temperaturii.

4.2.4.7. Detecția UV

Trecerea de la modul de eluție bazat pe ACN la cel bazat pe PC/EtOH poate influența detecția UV datorită lungimii de undă de cut-off diferite a PC față de ACN. Această diferență între lungimile de undă de cut-off poate duce, în cazul detecției UV la o scădere a sensibilității datorită creșterii zgomotului de fond. În acest sens au fost făcute o serie de determinări ale lungimii de undă de cut-off pentru diverse concentrații ale amestecului PC-EtOH/apă. Compararea s-a făcut cu un amestec de ACN/apă aditivată cu acid formic 0,1%. Rezultatele sunt prezentate în **Tabelul 16.**, de unde se poate observa că nu sunt modificări semnificative care să conducă la o pierdere de sensibilitate.

Tabelul 16. Lungimile de undă de cut-off pentru diferite proporții volumetrice ale amestecurilor PC/EtOH/apă și ACN/ acid formic 0,1% .

Solvent A	Solvent B	Compoziția fazei mobile (A/B v/v)	Lungimea de undă de cut-off * (nm)
PC/EtOH (7/3 v/v)	Apă	9/1	214
		4/1	212
		7/3	211
		3/2	210
		1/1	209
		2/3	207
		3/7	205
		1/4	203
		1/9	200
PC	Apă/EtOH (7/3 v/v)	9/1	216
		4/1	214
		7/3	213
		3/2	212
		1/1	211
		2/3	209
		3/7	208
		1/4	206
		1/9	202
ACN	acid formic 0,1% aq.	9/1	190
		4/1	191
		7/3	191
		3/2	191
		1/1	191
		2/3	192
		3/7	192
		1/4	213
		1/9	213

**măsurătorile au fost făcute cu un spectrometru cu rețea de diode Specord S600 (Analytic Jena, Germany).*

4.2.4.8. Aplicații cromatografice bazate pe diferite mecanisme de separare

O metodă propusă pentru un astfel de studiu a fost cea bazată pe mecanismul de interacție hidrofilă (HILIC).

Acest mecanism de separare este oarecum opus celui de fază inversă, în sensul că acest mecanism se adresează compușilor cu caracter polar, faza staționară având la rândul ei un caracter polar. Separarea, prin acest mecanism are loc prin partiția anliților între o fază mobilă cu un conținut ridicat de solvent organic și un strat de molecule de apă imobilizate la

suprafața fazei staționare prin intermediul legăturilor de hidrogen.

Metoda a fost propusă pentru separarea nicotinamidei, piridoxinei și a tiaminei, pe coloana Luna 3u HILIC, termostată la 25 °C. Cromatogramele suprapuse, pentru ambele moduri de eluție sunt redată în **Figura 49**. În modul de eluție bazat pe ACN simetria este mai bună, comparativ cu cea din modul de eluție alternativ. Când PC este modificatorul organic al fazei mobile, selectivitatea și rezoluția sunt superioare însă modulului de eluție bazat pe ACN.

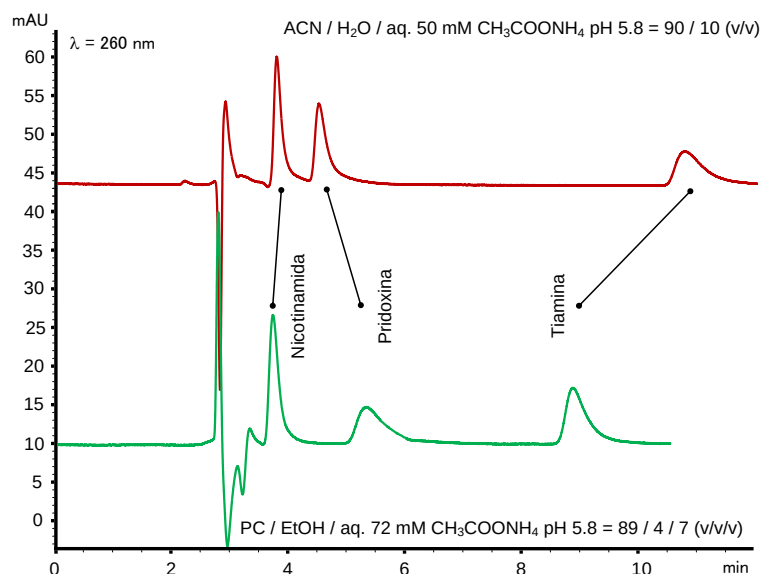


Figura 49. Cromatogramele obținute în urma separărilor realizate cu mecanismul de interacție hidrofilă, în ambele moduri de eluție (ACN respectiv PC/EtOH).

4.2.4.9. Concluzii

Înlocuirea ACN cu PC, ca atare sau în amestec cu EtOH se poate face într-un mod relativ simplu și direct. Pentru ambele moduri de eluție toleranța la soluții tampon anorganice este similară. Datorită vâscozității crescute a PC, rezistența la transferul de masă al analiților în faza mobilă, este mai mare în comparație cu fazele mobile conținând ACN și astfel debitele permise în modul de eluție alternativ sunt mai mici.

Înlocuirea ACN cu PC/EtOH este fezabilă și poate reprezenta un pas spre o chimie analitică verde, fără a compromite criteriile de performanță specifice unei separări cromatografice.

4.3. Studiu de retenție al unor compuși din clasa hidrocarburilor aromatice policiclice cu scopul de a evalua etil-lactatul ca un posibil modificator organic, verde al fazei mobile în separările cromatografice.

4.3.1. Introducere

Esterii organici sunt o clasă importantă de substanțe chimice ce-și găsesc aplicații în diverse ramuri ale industriei chimice cum ar fi cea a parfumurilor, a produselor farmaceutice, a maselor plastice sau a solvenților. În cadrul acestora etil-lactatul (EL), cu denumirea IUPAC de 2-etilhidroxipropanoat este o alternativă viabilă, nu numai din punct de vedere economic, cât și din punctul de vedere al comportamentului în mediul înconjurător.

Argumentele care pledează pentru aceste afirmații ar fi:

- Este prezent în mod natural, în cantități mici în anumite fructe, în carnea de pui sau în vinuri, fiind chiar aprobat de FDA pentru a fi utilizat ca aditiv în industria alimentară;
- Nu este teratogenic și este ușor metabolizat sub acțiunea enzimatică a esterazelor, la etanol și acid lactic, acest ultim compus fiind un produs al metabolismului uman;

- În mediul înconjurător este complet și rapid biodegradabil și nu constituie o amenințare la adresa stratului de ozon;
- EL se obține prin reacția de esterificare dintre acidul lactic și alcool etilic. Acești reactivi pot fi obținuți din surse complet regenerabile cum sunt carbohidrații generați ca parte a biomasei. Prelucrarea biomasei se face industrial în ceea ce se numesc biorafinării, care se bazează pe un concept similar celor ce prelucrează petrolul. [83, 84]. Etil-lactatul și-a găsit deja întrebuințări într-o serie de procese, cum ar fi cele de extracție [85], ca solvent de dispersie în procesele de producție a benzilor magnetice [86], ca solvent în sintezele organice [87, 88] sau în obținerea emulsiilor fără solvenți [89].

Date fiind proprietățile diferite ale EL față de cele ale ACN (vezi **Tabelul 19.**) a fost necesar să se evalueze comparativ rezistența hidrodinamică a coloanelor la deplasarea fazelor mobile conținând ACN respectiv EL precum și valorile de lungime de undă de cut-off pentru diverse compoziții EL/apă.

S-a urmărit, de asemenea, echivalența dintre conținutul de EL și cel de ACN necesar pentru a produce o retenție similară. Au mai fost comparate și aspectele termodinamice ce apar în urma înlocuirii ACN cu EL. Nu în ultimul rând, s-au stabilit o serie de corelații între datele de retenție cromatografică și diverși descriptori moleculari ai compușilor studiați.

4.3.2. Reactivi și echipamente

Studiul de retenție s-a făcut pe un set de 16 compuși din clasa hidrocarburilor aromatice policiclice (PAH). Compușii considerați în studiul de retenție au fost notați astfel: naftalină - A, acenaftilenă - B, fluoren - C, acenaften - D, fenantren - E, antracen - F, fluoranthen - G, piren - H, crisen - I, benzo(a)antracen - J, benzo(b)fluoranten - K, benzo(k)fluoranten - L, benzo(a)piren - M, dibenzo(a,h)antracen - N, benzo(g,h,i)perilen - O, indenol(1,2,3-c,d)piren - P. Lungimile de undă de cut-off, pentru diverse compoziții ale amestecului EL/apă au fost determinate cu un spectrometru UV-Vis Varian 100 Bio Cary.

4.3.3. Metoda cromatografică

Pentru studiul de retenție s-a folosit o coloană de tip Zorbax Eclipse XDB C18 termostată la 25°C. Modul de eluție a fost unul izocratic, la debitul de 0,3 mL/min. Acest debit a fost stabilit pe baza dependențelor funcționale van Deemter, trasate pentru compusul E (fenantren), la o compoziție a fazei mobile ACN/apă=70/30 v/v și respectiv EL/apă=50/50 v/v. Aceste dependențe funcționale sunt prezentate în **Figura 50.**

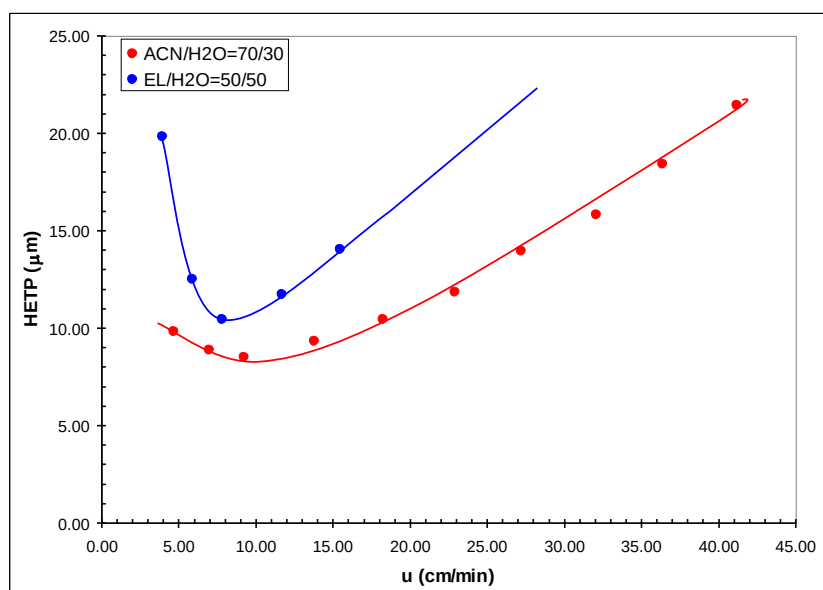


Figura 50. Dependente funcționale van Deemter obținute pentru fenantren în sistemele de eluție cu ACN respectiv EL.

4.3.3.4. Rezultate și discuții

Scopul prezentului studiu nu a fost acela de a separa un amestec de PAH. Acest subiect a fost dezbătut pe larg în literatura de specialitate. Scopul acestui studiu a fost, în schimb, acela de a avea o imagine cât mai amplă asupra posibilității de înlocuire a ACN cu EL, ca modifikator organic în fazele mobile utilizate în RPLC.

4.3.3.5. Rezistența hidrodinamică la deplasarea fazei mobile

Din caracteristicile comparative ale celor 2 solvenți se pot observa diferențele semnificative de vâscozitate și de densitate între EL și ACN, diferențe ce vor determina o rezistență în coloanele cromatografice.

Așa cum se poate vedea în **Figura 51.**, rapoartele dintre valorile de cădere de presiune, în situația utilizării EL ca modifikator organic, ca înlocuitor al ACN, s-au situat în intervalul 2-10, pentru un domeniu de concentrații ale modifikatorului organic situat între 40 -100%.

De menționat este faptul că, la toate compozițiile folosite pentru EL, în studiul de față, limita de 400 bar nu a fost depășită.

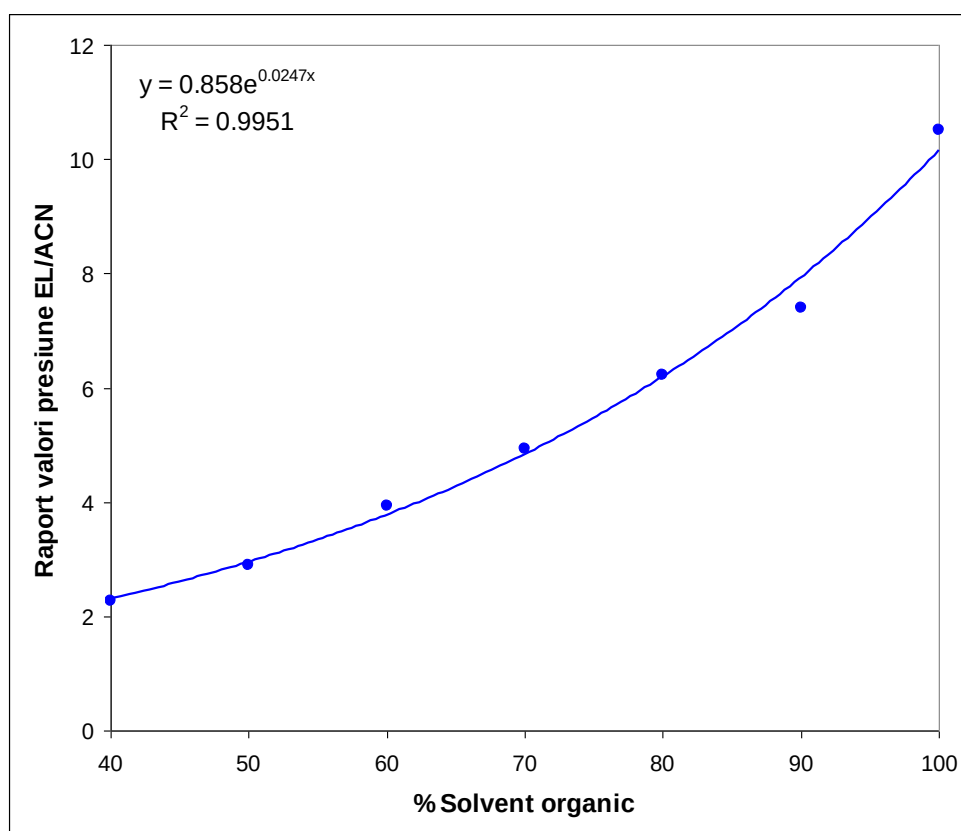


Figura 51. Rapoarte dintre valorile de presiune înregistrate în sistem în condițiile utilizării EL și ACN ca modifikatori organici în faza mobilă, la diferite rapoarte volumetrice de amestecare.

4.3.3.6. Lungimea de undă de cut-off

Trecerea de la modul de eluție bazat pe ACN la cel bazat pe EL poate influența detecția UV datorită lungimii de undă de cut-off diferite a EL față de ACN. Este de așteptat ca lungimea de undă de cut-off a EL să fie mai mare decât cea a ACN, datorită grupărilor cromofore, pe de o parte, și datorită posibilelor impurități existente în solvent (EL folosit în acest studiu nu este solvent de puritate cromatografică).

Lungimile de undă de cut-off, pentru diferite compoziții EL/apă sunt prezentate în **Figura 52.**, unde se poate observa cum odată cu creșterea procentului de EL din faza mobilă crește și absorbția acestuia.

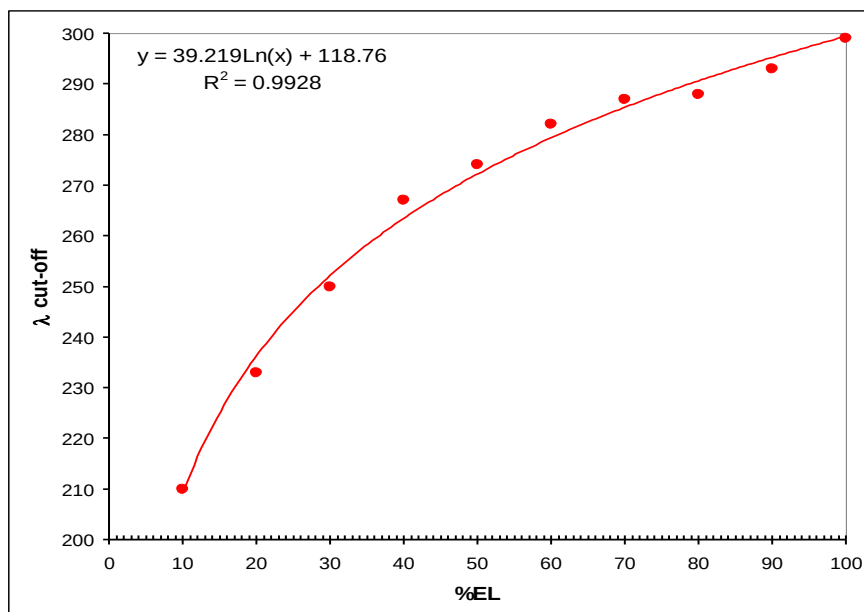
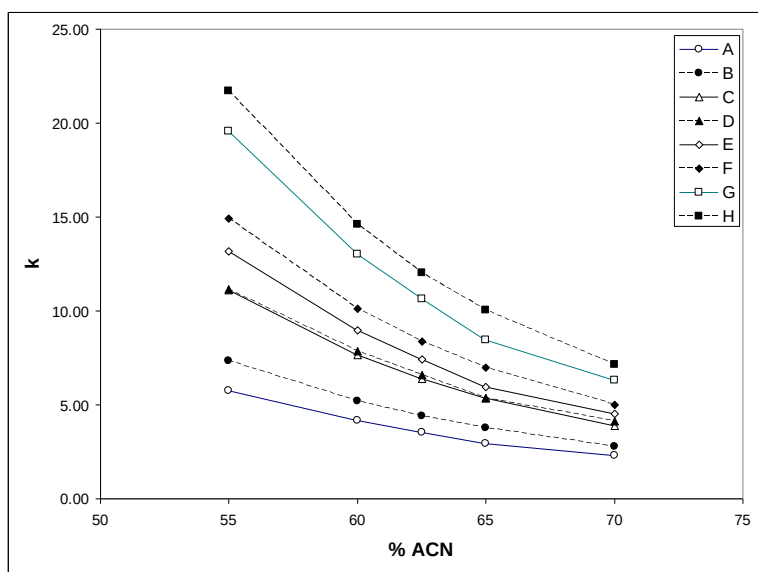


Figura 52. Valori ale lungimilor de undă de cut-off măsurate pentru diferite rapoarte volumetrice de amestecare EL/apă.

4.3.3.7. Echivalența între conținutul de ACN și EL din faza mobilă necesar pentru a produce o retenție similară

Determinarea conținutului de EL al fazei mobile, pentru care retenția analiților este similară cu cea obținută când ACN este modificatorul organic al fazei mobile s-a realizat pentru întreg setul de compuși. Pentru determinarea factorului de retenție (k) s-au folosit compozițiile de 55/45, 60/40, 62,5/37,5, 65/35 și 70/30 v/v (pentru ACN/apă) și compozițiile de 40/60, 45/55, 47,5/52,5, 50/50, 55/45 și 60/40 v/v (pentru EL/apă).

Dependențele funcționale dintre factorii de retenție și procentul de modificator organic din faza mobilă sunt reprezentate în **Figura 53.**



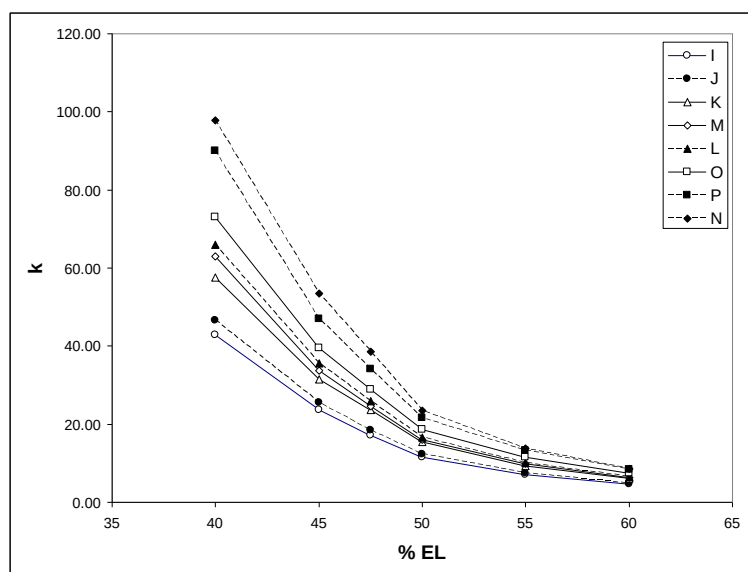
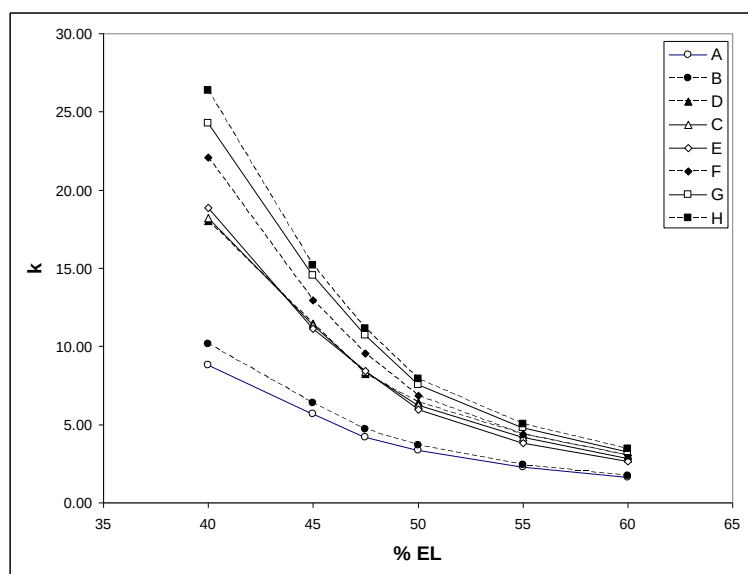
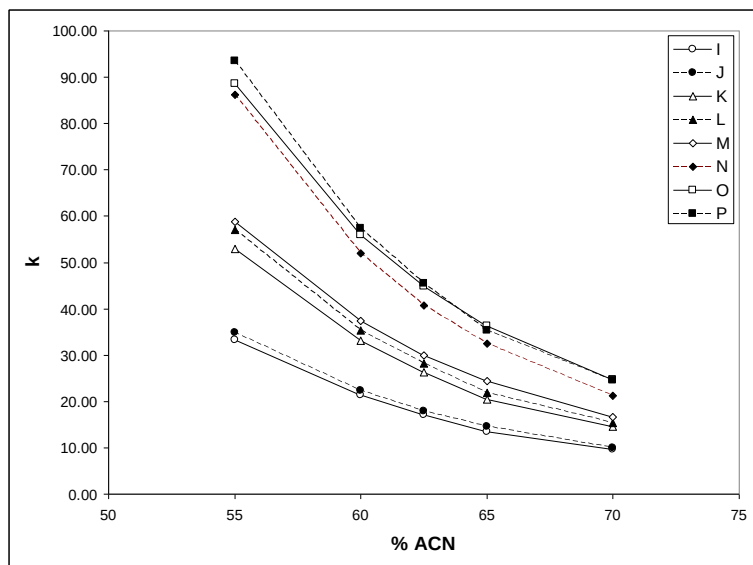


Figura 53. Dependențele funcționale reprezentând variația factorului de retenție cu procentul de modificador organic din faza mobilă, în ambele moduri de eluție.

Liniarizarea dependențelor funcționale s-a făcut prin dublă logaritmizare și s-au obținut următoarele relații:

$$\log k^{ACN} = B^{ACN} \times \log(\%ACN) + A^{ACN} \quad (29)$$

$$\log k^{EL} = B^{EL} \times \log(\%EL) + A^{EL} \quad (30)$$

După ce se egalează relațiile (29) și (30) se obține conținutul echivalent de EL:

$$(\%EL) = (\%ACN)^{B^{ACN}/B^{EL}} \times 10^{(A^{ACN}-A^{EL})/B^{EL}} \quad (31)$$

Conținutul echivalent de EL, necesar pentru a produce o retenție similară cu cea generată de ACN, conform relației (31) este prezentat în **Tabelul 21**. Considerând valorile medii ale procentelor echivalente ale celor 2 solvenți necesare pentru a produce o retenție similară, pentru toți compușii, pe întreg domeniul de compoziții ale fazei mobile, se obține o relație generală de tipul:

$$\%EL = 0,7 \times \%ACN + 3,6 \quad (32)$$

Tabelul 21. Echivalența între conținutul de EL și cel de ACN din faza mobilă necesară pentru a asigura o retenție similară a anliților de interes

Compus	% EL				
% ACN	70	65	62.5	60	55
A	55.1	51.5	49.7	47.9	44.3
B	53.5	50.1	48.3	46.6	43.1
C	56.0	52.2	50.3	48.4	44.7
D	56.0	52.2	50.3	48.4	44.6
E	53.8	50.2	48.5	46.7	43.1
F	53.8	50.4	48.6	46.8	43.3
G	52.7	49.1	47.3	45.6	42.0
H	51.6	48.3	46.6	45.0	41.6
I	52.5	49.0	47.2	45.5	42.0
J	52.6	49.2	47.4	45.7	42.2
K	51.4	47.9	46.1	44.3	40.8
L	51.7	48.2	46.4	44.7	41.2
M	50.5	47.2	45.5	43.9	40.5
N	51.6	48.2	46.4	44.7	41.2
O	48.4	45.2	43.6	42.0	38.8
P	49.9	46.6	44.9	43.2	39.8
Media	52.6	49.1	47.3	45.6	42.1
SD	2.10	1.96	1.90	1.83	1.70

Cromatogramele corespunzătoare pentru tot setul de compuși, în ambele moduri de eluție sunt prezentate în **Figura 55**.

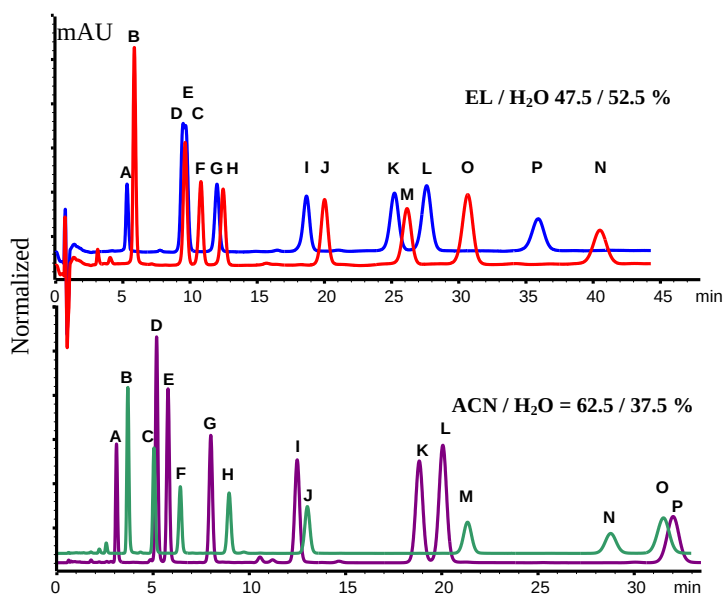


Figura 55. Cromatogramele obținute prin aplicarea ambelor moduri de eluție.

4.3.3.8. Aspecte termodinamice

Înlocuirea ACN cu PC a fost evaluată din punct de vedere termodinamic. Studiul de retenție s-a făcut în condițiile unei faze mobile cu compoziția ACN/apă 70/30 și EL/apă 45/55. Aceste compoziții ale fazei mobile corespund unei selectivități echivalente. Intervalul de temperatură studiat a fost cuprins între 15-50°C, modificat în pași de 5°C. Curbele van't Hoff $\ln k = f(1/T)$ au fost liniare, pentru toți compușii cu coeficienți de corelație mari ($r > 0,98$), ceea ce denotă faptul că mecanismul de separare nu se modifică cu variația temperaturii.

4.3.3.9. Corelația datelor de retenție cromatografică cu diferiți descriptori moleculari ai analiților de interes

În cromatografia de lichide, corelarea factorului de retenție (k) cu diferitele proprietăți fizico-chimice, topologice sau geometrice ale analiților de interes, exprimate prin intermediul unor mărimi cunoscute sub denumirea de descriptori reprezintă o oportunitate de a avea o imagine asupra acelor proprietăți ale analiților care controlează retenția.

Cei mai cunoscuți și utilizați descriptori fizico-chimici sunt masa moleculară (M_w), solubilitatea în apă (S) și coeficientul de partiție octanol-apă, care este o măsură a hidrofobicității ($\log P$). În cazul PAH, cei mai cunoscuți descriptori geometrice sunt volumul van der Waals (V_w) și aria suprafeței van der Waals (A_w).

Alți descriptori se referă la forma moleculară (raportul lungime-lățime-L/B) sau la topologia moleculară (indicele de conectivitate χ). Prin reprezentarea grafică a retenției în funcție de acești descriptori, în funcție de coeficienții de corelație obținuți se pot determina cei mai importanți descriptori ce guvernează retenția [94].

În prezentul studiu s-au comparat coeficienții de corelație între diverși descriptori moleculari (**Tabelul 23.**) și comportamentul PAH, din punct de vedere al retenției, în ambele moduri de eluție.

În cazul în care aceste corelații nu diferă semnificativ se poate considera că trecerea de la modul de eluție bazat pe ACN la cel bazat pe EL nu modifică modul de interacție al analiților cu faza staționară. Rezultatele corelațiilor sunt prezentate în **Tabelul 24.**

Coeficienții de corelație sunt mai mari de 0,9 pentru toți descriptorii, cu excepția L/B. Valorile coeficienților de corelație sunt, în toate cazurile, mai mari în cazul ACN decât în cazul EL.

Tabelul 23. Valori ale descriptorilor moleculari pentru analiții considerați în studiu.

Analit	Acronim	M_w	V_w	Log P	S mg/L	χ	L/B
Naftalină	A	128	73.96	3.18	31.70000	3.405	1.24
Acenaftilenă	B	152	83.44	3.48	16.10000	4.149	1.08
Fluoren	C	166	93.67	4.01	1.90000	4.612	1.57
Acenaften	D	154	87.44	3.82	3.93000	4.445	1.06
Fenantren	E	178	99.56	4.2	1.10000	4.815	1.46
Antracen	F	178	99.56	4.2	0.06200	4.809	1.57
Fluoranten	G	202	109.04	4.5	0.26500	5.565	1.22
Piren	H	202	109.04	4.5	0.01320	5.559	1.27
Crisen	I	228	125.16	5.22	0.00190	6.226	1.72
Benzo(a)antracen	J	228	125.16	5.22	0.01460	6.220	1.58
Benzo(b)fluoranten	K	252	134.64	5.52	0.00150	6.976	1.40
Benzo(k)fluoranten	L	252	134.64	5.52	0.00081	6.970	1.48
Benzo(a)piren	M	252	134.64	5.52	0.00162	6.970	1.50
Dibenzo(a,h)antracen	N	278	150.76	6.24	0.00056	7.631	1.79
Benzo(g,h,i)perilen	O	276	-	6.22	0.00026	7.720	1.12
Indeno(1,2,3-c,d)piren	P	276	-	6.22	0.00019	7.720	1.40

Tabelul 24. Caracteristicile corelațiilor funcționale dintre descriptorii moleculari și datele de retenție experimentale, în ambele moduri de eluție.

Modificator organic	Descriptor	M_w	V_w	$\log P$	S	χ	L/B
	Funcția	$M_w=f(\log k)$	$V_w=f(\log k)$	$\log P=f(\log k)$	$\log S=f(\log k)$	$\chi=f(\log k)$	$L/B=f(\log k)$
ACN	Media r_{xy}	0.9941	0.9918	0.9937	-0.9701	0.9964	0.3540
	s	0.0010	0.0017	0.0009	0.0007	0.0006	0.0111
EL	Media r_{xy}	0.9800	0.9852	0.9865	-0.9584	0.9832	0.4367
	s	0.0040	0.0043	0.0024	0.0048	0.0021	0.0156

4.3.3.10. Concluzii

Există posibilitatea practică de a înlocui ACN cu EL, ca modificator organic al fazei mobile în RP-LC. Această alternativă la ACN poate fi utilă în contextul actual când tendința este de a se practica o cromatografie mai verde. EL este miscibil cu apa în orice proporție iar rezistența hidrodinamică a coloanelor la deplasarea fazelor mobile conținând EL, la compozițiile testate în cadrul studiului nostru este compatibilă cu limita maximă de operare acceptată de majoritatea sistemelor cromatografice prezente în laboratoare (400 bar).

Lungimea de undă de cut-off mare a EL constituie un dezavantaj important pentru detecția UV. Dacă analiții de interes nu au grupări cromofore și dacă concentrația modificatorului organic în faza mobilă este mare, detecția UV poate fi serios îngreunată.

5. Concluziile tezei

Scopul acestei teze a fost acela de a evalua două direcții principale prin care cromatografia de lichide poate contribui la tendința de a deveni ”verde”, tot mai prezentă în ultimii ani.

Prima direcție a fost aceea de estimare a unor indici de hidrofobicitate din date de retenție cromatografică. Această metodă de estimare a hidrofobității reprezintă o alternativă la practicile clasice, ce implică un consum mare de solvenți, timp de realizare experimentală mare și care sunt destul de laborioase. Metodele cromatografice au avantajul de a fi mai rapide, necesită cantități mici de probă, determinările se fac într-un timp mai scurt.

Indicii de hidrofobicitate propuși se corelează acceptabil, la nivel statistic cu cei calculați cu ajutorul unor software-uri dedicate. Unii dintre indicii nou propuși se corelează chiar mai bine cu indicii calculați, comparativ cu cei estimați prin extrapoalare, în mecanismul de fază inversă.

Utilitatea unor astfel de indici de hidrofobicitate, estimați din date de retenție cromatografică, pe o coloană ce funcționează bimodal poate fi regasită în elaborarea unor scale de hidrofobicitate pentru compuși ce prezintă anumite particularități structurale și pentru care abordarea bazată pe un singur mecanism de separare poate fi dificilă sau neconcludentă.

A doua direcție a fost evaluarea unor solvenți mai verzi ca posibili înlocuitori ai acetonitrilului (ACN).

Primul solvent evaluat a fost propilen-carbonatul (PC).

Teza de față a adus în plus o evaluare mai în detaliu a unor aspecte ce țin de o astfel de înlocuire. Aceste aspecte s-au referit la condițiile necesare pentru ca PC să fie miscibil cu apa în orice proporție, la aditivii necesari și proporția lor pentru o miscibilitate completă, la rezistența hidrodinamică dezvoltată de coloane la deplasarea fazei mobile, la echivalența dintre conținutul de ACN și PC din faza mobilă, necesar pentru a se obține o retenție similară și debitul optim. A fost testat, de asemenea modul cum PC se comportă în condițiile aditivării fazei mobile cu soluții tampon anorganice, necesare pentru separarea compușilor cu caracter bazic.

Al doilea solvent evaluat ca o posibilă alternativă verde la ACN a fost etil-lactatul (EL).

În cadrul tezei contribuțiile aduse în plus au fost, la fel ca în cazul PC, pe lângă evaluarea în detaliu a o serie de aspecte ce țin de înlocuirea ACN cu EL.

Date fiind vîscozitățile și densitățile mai mari decât ale ACN, în cazul ambilor solvenți este de menționat că pe domeniul de concentrații studiat limita de presiune de 400 bar, specifică majorității sistemelor HPLC nu a fost depășită.

Înlocuirea ACN cu PC sau EL poate fi fezabilă. Dincolo de avantajul înlocuirii ACN cu solvenți, considerați mai verzi există și anumite detalii, cum ar fi lungimea de undă de cut-off a EL, ce pot constitui, în funcție de aplicațiile specifice în care este utilizat, un dezavantaj substanțial.

Bibliografie selectivă:

1. P. Anastas, N. Eghbali, Green Chemistry: Principles and Practice, Chem. Soc. Rev., 2010, 39, 301
2. J. Curyło, W. Wardencki, J. Namieśnik, Green Aspects of Sample Preparation – a Need for Solvent Reduction, Polish J. of Environ. Stud., 2007, 16, 5;
3. M. Kaljurand, M. Koel, Recent Advancements on Greening Analytical Separation, Crit. Rev. Anal. Chem., 2011, 41, 2;
4. U. D. Neue, HPLC columns: theory, technology, and practice, Wiley-VCH, New York, 1997;
5. S. Fekete, K. Ganzler, J. Fekete, Efficiency of the new sub-2 μ m core-shell (Kinetex) column in practice, applied for small and large molecule separation, J. Pharm. Biomed. Anal., 2011, 54, 482;
6. D. T.-T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J. Veuthey, Chromatographic behaviour and comparison of column packed with sub-2 μ m stationary phases in liquid chromatography, J. Chromatogr., A, 2006, 1128, 105;
7. R. E. Majors, Fast and ultrafast HPLC on sub-2- μ m porous particles—where do we go from here?, LCGC North Am., 2005, 23, 8;
8. A. D. Jerkovich, J. S. Mellors, J. W. Jorgenson, The use of micrometer-sized particles in ultrahigh pressure liquid chromatography, LCGC North Am., 2003, 21, 600;
9. J. R. Mazzeo, U. D. Neue, M. Kele, R. S. Plumb, Advancing LC performance with smaller particles and higher pressure, Anal. Chem., 2005, 77, 460A;
10. T. H. Walter, R. W. Andrews, Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation, Trends Anal. Chem., 2014, 63, 14;
11. I. Ali, V. D. Gaitonde, A. Grahn, Halo Columns: New Generation Technology for High Speed Liquid Chromatography, J. Chromatogr. Sci., 2010, 48, 386;
12. V. Gonzalez-Ruiz, A. I. Olives, M. A. Martin, Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography, Trends Anal. Chem., 64, 2015, 17;
13. G. Guiochon, F. Gritti, Shell particles, trials, tribulations and triumphs, J. Chromatogr., A, 1218, 2011, 1915;
14. F. Gritti, G. Guiochon, Facts and legends about columns packed with sub-3 μ m core-shell particles, LCGC North Am., 2012, 30, 586;
15. S. Heinisch, J. L. Rocca, Sense and nonsense of high-temperature liquid chromatography, J. Chromatogr. A, 2009, 1216, 642;
16. L. T. Taylor, Supercritical fluid chromatography for the 21st century, J. Supercrit. Fluid., 2009, 47, 566;
17. C. West, E. Lesellier, A unified classification of stationary phases for packed column supercritical fluid chromatography, J. Chromatogr. A, 2008, 1191, 21;
18. H. Kataoka, Recent Advances in Solid-Phase Microextraction and Related Techniques for Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Curr. Pharm. Anal., 2005, 1, 65;
19. F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho, Liquid-phase microextraction techniques within the framework of green chemistry, Trends Anal. Chem., 2010, 29, 617;
20. S. K. Poole, C. F. Poole, Separation methods for estimating octanol–water partition

- coefficients, J. chromatogr., B, 2003, 797, 3;
21. G. Mercey, T. Verdet, J. Renou, M. Kliachyna, R. Baati, F. Nachon, L. Jean, P.-Y. Renard, Reactivators of Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphorus Nerve Agents, Acc. Chem. Res., 2012, 45, 756.

Lucrări publicate în domeniul tezei de doctorat:

1. F. Tache, Ș. Udrescu, F. Albu, F. Micăle, A. Medvedovici Greening pharmaceutical applications of liquid chromatography through using propylene carbonate–ethanol mixtures instead of acetonitrile as organic modifier in the mobile phases, J. Pharm. Biomed. Anal., 2013, 75, 230-238, F.I. (2013) = 2,829, F.I. (2020) = 3,209

2. V. Voicu, C. Sârbu, F. Tache, F. Micăle, Ș. F. Rădulescu, K. Sakurada, H. Ohta, A. Medvedovici, Lipophilicity indices derived from the liquid chromatographic behavior observed under bimodal retention conditions (reversed phase/hydrophilic interaction): Application to a representative set of pyridinium oximes, Talanta, 2014, 122, 172-179, F.I. (2014) = 3,545, F.I. (2020) = 5,339

3. F. Micăle, F. Albu, E. E. Iorgulescu, A. Medvedovici, F. Tache, Ethyl lactate as a greener alternative to acetonitrile in RPLC: a realistic appraisal, J. Chromatogr. Sci., 2015, 53, 1701–1707, F.I. (2015) = 1,320, F.I. (2020) = 1,280

Participări la manifestări științifice:

1. F. Micăle, Log P descriptors from bimodal chromatographic behavior, Simpozionul aniversar Facultatea de Chimie – “150 de ani de tradiție”, 2014, București, prezentare orală

2. A. Medvedovici, F. Micăle, F. Tache, Green chromatographic assay of PAH in dietary supplements and food staff, International workshop - “Food Chemistry & Engineering”, 2015, Constanța, prezentare orală