

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE
ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN CHIMIE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Aspecte termodinamice ale separărilor prin cromatografia
de lichide de înaltă performanță în fază inversă**

Doctorand:

Andreia-Cristina Soare

Conducător doctorat:

Prof. Dr. Victor David

Comisia de doctorat:

Președinte: Profesor Dr. Camelia Bala

Conducător de doctorat: Profesor Dr. Victor David

Referenți oficiali:

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

Cuprins

1. PARTE TEORETICĂ	5
1.1. Mecanismul de separare în faza inversă - prezentare generală	5
1.1.1. Introducere	5
1.1.2. Faza mobilă în cromatografia de lichide în fază inversă	5
1.1.3. Faza staționară în cromatografia de lichide în fază inversă	6
1.1.4. Raportul volumelor de faze („phase ratio”)	10
1.1.4.1. Determinarea volumului liber/gol al unei coloane cromatografice	12
1.1.4.2. Teste utilizate în caracterizarea fazelor staționare în RP-HPLC	15
1.2. Modele de retenție ale mecanismului de separare în fază inversă	18
1.2.1. Modele empirice pentru predicția retenției cromatografice	18
1.2.2. Modele moleculare privind mecanismul de retenție	23
Modelul partiției	23
Modelul adsorbției	24
Partiție versus adsorbție	25
1.2.3. Teoria solvofobică în explicarea mecanismului de retenție în fază inversă	25
1.3. Aspecte privind teoria distribuției interfazice	30
1.3.1. Interacții intermoleculare implicate în retenția cromatografică	31
1.3.2. Balanța hidrofobicitate-hidrofilicitate	35
1.3.3. Informații de natură termodinamică și cinetică ale proceselor de distribuție interfazică	36
1.4. Termodinamica procesului de retenție în RP-HPLC	38
1.4.1. Ecuații de bază ale procesului de retenție	38
1.4.2. Relații liniare de energie liberă	41
1.4.2.1. Compensarea entalpie-entropie	42
1.5. Studii termodinamice raportate în literatura de specialitate bazate pe ecuația van't Hoff	45
2. CONTRIBUȚII ORIGINALE	52
2.1. Studiul comportării termodinamice în cromatografia de lichide în fază inversă cu respectarea dependenței van't Hoff	53
Problematica studiului	53
Condiții experimentale	54
2.1.1. Dependența van't Hoff pentru faze staționare de tip octil și octadecil silicagel la diverse compoziții de fază mobilă	60
Condiții experimentale	60
Prelucrarea datelor de retenție și interpretarea acestora	61
Concluziile studiului	76
2.1.2. Dependența van't Hoff pentru faze staționare de tip fenil silicagel la diverse compoziții de fază mobilă	77
Condiții experimentale	77
Prelucrarea datelor de retenție și interpretarea acestora	77
Concluziile studiului	89
2.1.3. Influența temperaturii asupra valorilor extrapolate ale retenției pentru faze mobile cu conținut total de apă	90
Condițiile experimentale	91
Prelucrarea datelor de retenție și interpretarea acestora	92

Concluziile studiului.....	99
2.2. Dependența de temperatură a parametrului „phase ratio” pentru coloane cu fază staționară de tip octadecil silicagel.....	100
Problematica studiului.....	100
Prelucrarea datelor de retenție și interpretarea acestora.....	101
2.2.1. Dependența $\log \Phi$ în funcție de T pentru faze mobile cu conținut de acetonitril.....	107
2.2.2. Dependența $\log \Phi$ în funcție de T pentru faze mobile cu conținut de metanol.....	110
2.2.3. Dependența constantei de echilibru a procesului de separare în funcție de T.....	113
Concluziile studiului.....	120
2.3. Studiul comportării termodinamice în cromatografia de lichide în fază inversă cu deviații de la dependența van't Hoff.....	121
Introducere privind alegerea compușilor studiați.....	121
Condiții experimentale.....	123
2.3.1. Influența temperaturii asupra retenției pentru faze mobile fără control de pH.....	125
Condițiile experimentale.....	125
Prelucrarea datelor de retenție și interpretarea acestora.....	127
Concluziile studiului.....	132
2.3.2. Influența pH-ului fazei mobile asupra retenției.....	133
Condițiile experimentale.....	133
Prelucrarea datelor de retenție și interpretarea acestora.....	135
Influența pH-ului asupra comportării cromatografice a papaverinei.....	168
Modelarea echilibrelor secundare în procesul de partitie RP-HPLC.....	173
Concluziile studiului.....	176
2.4. Concluzii generale.....	177
3. LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE.....	180
4. COMUNICĂRI ȘTIINȚIFICE.....	181
5. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE.....	182

Numerotarea figurilor, tabelor și a trimiterilor bibliografice este cea din teză.

2. CONTRIBUȚII ORIGINALE

În general temperatura joacă un rol important în HPLC, influențând retenția, rezoluția cromatografică, simetria și eficiența picurilor cromatografice, relația fundamentală ce descrie influența temperaturii asupra retenției cromatografice fiind dată de ecuația van't Hoff. Această ecuație a fost utilizată pe larg în literatura de specialitate în calcularea parametrilor termodinamici, ΔH° , ΔS° și ΔG° ce caracterizează transferul moleculelor de analit din faza mobilă în faza staționară. Majoritatea studiilor au la bază reprezentări grafice de tip van't Hoff, din ale căror pante și intercepții la ordonată sunt calculate mărimile termodinamice menționate anterior.

Există destul de multe situații, semnalate și de literatura de specialitate, în care dependența dintre $\ln k'$ și $1/T$ nu este una liniară [147, 161, 163]. S-au avansat deja câteva teorii privind această deviație de la liniaritate a ecuației van't Hoff, dintre care posibilitatea să aibă loc interacții multiple între analit și faza staționară. O altă explicație constă în variația raportului volumelor de faze din coloana cromatografică („phase ratio” - Φ) cu temperatura [20], care poate influența astfel liniaritatea ecuației van't Hoff. De aceea, lucrarea prezintă își propune să abordeze influența structurii compușilor asupra comportării din punct de vedere termodinamic în RP-HPLC, precum și posibilitatea variației parametrului Φ cu temperatura coloanei cromatografice care poate conduce la o deviație de la liniaritate a ecuației van't Hoff. Pentru aceste scopuri au fost selectate câteva clase de compuși chimici cu structuri complexe care se pot prezenta în mai multe forme în faza mobilă prin variația pH-ului componentei apoase. Aceste clase de compuși au fost studiate comparativ cu o clasă de hidrocarburi aromatice a căror structură nu este influențată de compoziția fazei mobile.

2.1. Studiul comportării termodinamice în cromatografia de lichide în fază inversă cu respectarea dependenței van't Hoff

Problematica studiului

Pentru început a fost studiat efectul temperaturii asupra retenției unor compuși a căror structură nu este modificată de pH-ul fazei mobile. În acest scop, s-au ales compuși simpli din punct de vedere funcțional, detectabili ușor prin UV și care au retenție cromatografică acceptabilă. În separările RP-HPLC, temperatura este un parametru esențial ce controlează retenția cromatografică și selectivitatea separărilor, iar dependența factorului de retenție al unui compus de temperatura coloanei cromatografice este descrisă de ecuația van't Hoff:

$$\ln k' = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \Phi \quad (2.1.1)$$

unde ΔH° și ΔS° reprezintă variația de entalpie standard și, respectiv, de entropie standard ce caracterizează procesul de transfer al analitului din faza mobilă în faza staționară, R este constanta universală a gazelor, T este temperatura în grade Kelvin, iar Φ reprezintă raportul de volume al celor două faze ($\Phi = V_{fs}/V_{fm}$, unde V_{fs} este volumul fazei staționare, iar V_{fm} este volumul gol sau liber al unei coloane cromatografice).

Pentru acest studiu s-a ales o serie de substanțe chimice simple de tip alchilfenil pentru care s-a urmărit influența temperaturii coloanei cromatografice precum și a compoziției fazei mobile asupra retenției acestora. Din datele de retenție obținute experimental s-au calculat parametrii termodinamici importanți ai procesului de retenție cromatografică. Astfel, a fost luată în lucru seria omologă benzen-propilbenzen, aceasta fiind aleasă din considerentele menționate, cel mai important fiind acela că acestea sunt specii chimice a căror structură nu suferă modificări pe parcursul desfășurării experimentelor cromatografice.

Experimentele au fost realizate folosind câteva coloane HPLC comerciale având drept fază staționară silicagel modificat cu grupări octil sau octadecil. Faza mobilă a fost alcătuită din două componente: componentă organică – acetonitril (ACN) sau metanol (MeOH) și componentă apoasă. Toate experimentele au avut loc în intervalul de temperatură 20°-50°C, debitul fazei mobile a fost de 1 mL/min, modul de lucru fiind izocratic. Cromatogramele au fost înregistrate prin măsurarea absorbanței la lungimea de undă de 254 nm.

După cum se poate observa din exemplul redat în figura de mai jos rezoluția separărilor este foarte mare, iar forma și eficiența picurilor sunt acceptabile, cromatogramele prezentând o separare clară a celor patru substanțe și o îmbunătățire a caracteristicilor de pic concomitentă cu creșterea temperaturii.

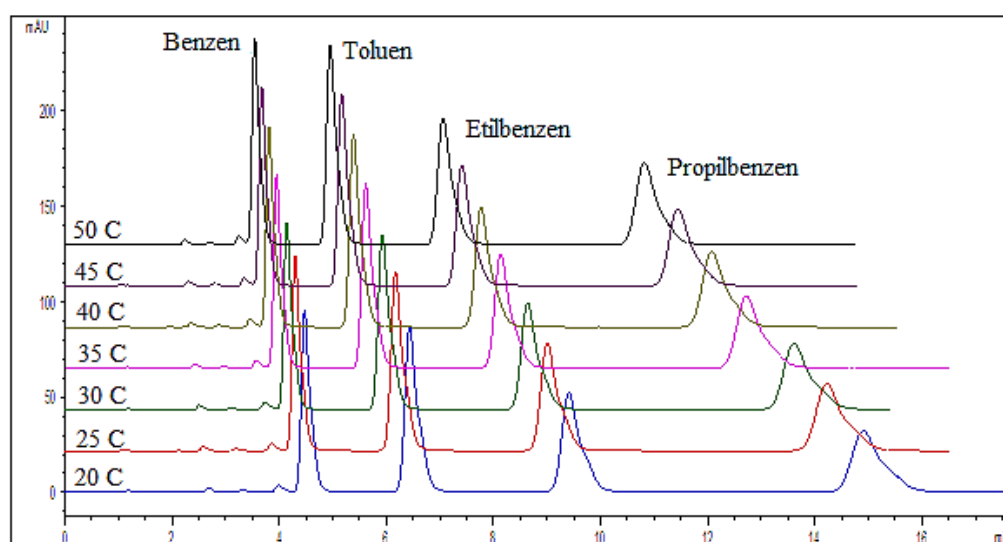


Figura 2.2. Cromatogramele suprapuse pentru cele patru hidrocarburi în intervalul de temperatură 20°-50°C obținute pe coloana Gemini C18 pentru faza mobilă 50% ACN (acetonitril) și 50% H₂O (v:v).

2.1.1. Dependența van't Hoff pentru faze staționare de tip octil și octadecil silicagel la diverse compoziții de fază mobilă

Prelucrarea datelor de retenție și interpretarea acestora

Influența temperaturii coloanei cromatografice asupra retenției celor patru hidrocarburi a fost studiată pe patru coloane cromatografice și la mai multe compoziții ale fazei mobile, pentru cei doi modificatori organici folosiți.

Studiul de comportare cromatografică al celor patru hidrocarburi în ceea ce privește influența temperaturii asupra procesului de retenție are aceeași concluzie indiferent de coloana utilizată sau de compoziția fazei mobile: valoarea timpului de retenție al celor patru hidrocarburi și deci, implicit și valoarea factorului de retenție scade cu creșterea temperaturii.

De asemenea, valoarea timpului de retenție și, respectiv, valoarea logaritmului natural al factorului de retenție scade cu creșterea procentului de modificador organic din faza mobilă, indiferent de modificadorul organic utilizat.

Valorile logaritmului natural al factorului de retenție calculate pentru toate hidrocarburile au fost reprezentate grafic în funcție de inversul valorii absolute a temperaturii coloanei cromatografice. Un exemplu ale acestor dependențe este prezentat în figura următoare pentru o coloană cu faza staționară de tip octadecil silicagel (figura 2.4).

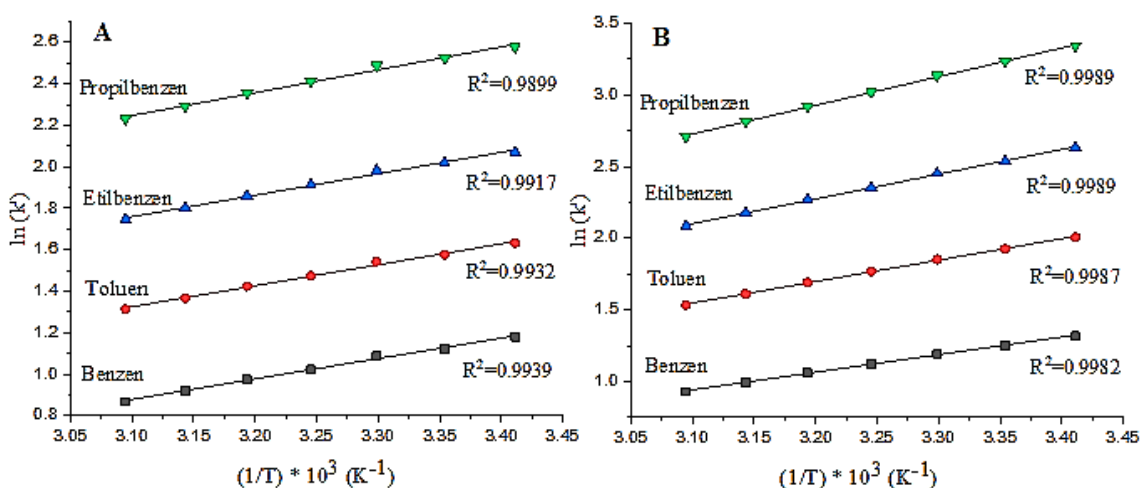


Figura 2.4. Dependența logaritmului factorului de retenție în funcție de inversul valorii temperaturii absolute a coloanei cromatografice pentru coloana Gemini C18 pentru cele patru hidrocarburi studiate: A – fază mobilă 50% CH₃CN / 50% H₂O; B – fază mobilă 55% CH₃OH / 45% H₂O (v/v).

Aceste dependențe pot fi modelate matematic de o funcție liniară, fiind fitate folosind o ecuație de gradul unu, de forma:

$$\ln k' = a + b \cdot (1/T) \quad (2.1.2)$$

în care a și b sunt parametrii de regresie liniară calculați cu ajutorul programului Origin.

Studii asupra procesului de retenție al acestor hidrocarburi pot fi întâlnite în literatură în diferite contexte: calcularea coeficientului de partiție octanol/apă, K_{ow} , [15] calcularea raportului dintre volumele celor două faze, Φ , [14] sau în studii de influență a temperaturii asupra valorilor extrapolate ale factorului de retenție pentru apă ca fază mobilă [172].

Valorile parametrilor de regresie liniară pot fi folosite pentru a calcula parametrii termodinamici asociați procesului de retenție cromatografică: variația entalpiei, respectiv variația entropiei asociate procesului de transfer al analitului din faza mobilă în faza staționară, precum și variația energiei libere Gibbs. Acești parametrii termodinamici au fost calculați în cadrul acestui studiu de comportare al procesului de retenție cu temperatura folosind următoarele ecuații:

$$\Delta H^o = -Rb \quad (2.1.3)$$

$$\Delta S^o = R(a - \ln \Phi) \quad (2.1.4)$$

$$\Delta G^o = \Delta H^o - T \cdot \Delta S^o \quad (2.1.5)$$

În calculul variației entropiei standard intervine valoarea logaritmului natural al raportului dintre volumul fazei staționare și volumul fazei mobile sau volumul gol (liber) al coloanei cromatografice. Se pot face unele aproximări pentru a calcula variația entropiei din reprezentările grafice de tip van't Hoff. Astfel, luând în considerare faptul că intervalul de temperatură utilizat în acest studiu este mic, o aproximare corectă [13, 14, 173] a valorii raportului volumelor celor două faze ar putea fi considerată în intervalul 0,20-0,25. În acest studiu a fost utilizată cea mai mare valoare a lui Φ , adică 0,25.

Valorile corespunzătoare variației entalpiei standard urmează aceeași tendință, acestea crescând de la benzen la propilbenzen, indiferent de modificatorul organic folosit sau de coloana cromatografică pe care s-a realizat experimentul. Totodată, se observă o scădere a valorii variației entalpiei standard la creșterea procentului de modificador organic în faza mobilă. Din punct de vedere termodinamic valorile negative ale variației entalpiei standard pentru transferul analiților din faza mobilă în faza staționară se corelează cu un proces exoterm, deci cu o eliberare de energie în sistemul cromatografic atunci când acest transfer se realizează. Atunci când temperatura coloanei cromatografice crește procesul de retenție este descurajat și astfel are loc scăderea timpului de retenție, comportament de tip van't Hoff.

Valorile corespunzătoare variației entropiei standard urmează aceeași tendință cu cele corespunzătoare variației entalpiei standard atunci când modificatorul organic este metanolul,

acestea crescând de la benzen la propilbenzen în concordanță cu creșterea caracterului hidrofob al hidrocarburilor și înregistrându-se o scădere a valorii variației entropiei standard la creșterea procentului de metanol în faza mobilă. Acest lucru denotă faptul că interacțiile devin mai puternice între hidrocarburi și faza staționară de tip alchil silicagel de la benzen la propilbenzen deoarece crește caracterul hidrofob al acestora, lanțul alifatic contribuind la interacțiile hidrofobe ce au loc în sistemul cromatografic.

În cazul utilizării acetonitrilului drept modificator organic variația entropiei standard nu urmează o tendință anume, deși în unele cazuri aceasta este inversă variației entalpiei standard, scăzând de la benzen la propilbenzen. O altă diferență este aceea că în cazul utilizării metanolului drept modificator organic valorile variației entropiei standard sunt negative indiferent de coloana utilizată sau de procentul de metanol din faza mobilă, în timp ce în cazul utilizării acetonitrilului drept modificator organic în faza mobilă unele valori ale variației entropiei standard sunt pozitive. O valoare negativă a ΔS° se corelează cu faptul că retenția analitului în faza staționară are drept consecință o ordonare a sistemului fiind realizată printr-o interacție puternică a acestuia cu faza staționară.

Prin prismă termodinamică între cei doi parametri există mereu un fenomen de compensare, în acest caz procesul de retenție fiind dictat de parametrul entalpic, pentru care se obțin valori mult mai importante din calculele aferente.

Valorile corespunzătoare variației energiei libere Gibbs la 25°C urmează aceeași tendință indiferent de modificatorul organic utilizat sau de coloana cromatografică folosită, acestea crescând de la benzen la propilbenzen în concordanță cu caracterul hidrofob al hidrocarburilor și suferind o ușoară scădere cu creșterea procentului de modificator organic în faza mobilă. Valorile variației energiei libere Gibbs sunt negative indiferent de modificatorul organic folosit sau de procentul acestuia în faza mobilă, ceea ce denotă faptul că procesul de transfer al hidrocarburilor între cele două faze cromatografice este unul spontan, interacția analiților fiind mai puternică cu faza staționară decât cu faza mobilă.

Concluziile studiului

Valorile obținute pentru variația entalpiei standard și variația entropiei standard pentru cele patru hidrocarburi se încadrează în intervalele [-10,3; -5,8] kJ/mol pentru benzen, [-12,5; -7,3;] kJ/mol pentru toluen, [-14,4; -7,5] kJ/mol pentru etilbenzen și [-16,7; -8,1] kJ/mol pentru propilbenzen (valorile pentru ΔH°), respectiv în intervalele [-13,2; -2,9] J/mol·K pentru benzen, [-14,9; 0,1] J/mol·K pentru toluen, [-16,2; 2,9] J/mol·K pentru etilbenzen și [-18,7; 5] J/mol·K pentru propilbenzen (valorile pentru ΔS°). Aceste valori sunt în concordanță

și cu unele dintre datele de literatură din studiile HPLC prezentate în partea teoretică a tezei în tabelul 1.5 [149, 151, 153, 154].

2.1.2. Dependența van't Hoff pentru faze staționare de tip fenil silicagel la diverse compoziții de fază mobilă

Prelucrarea datelor de retenție și interpretarea acestora

Studiul de față își propune analiza influenței modificatorului organic prezent în faza mobilă, acetonitril versus metanol, asupra retenției celor patru hidrocarburi studiate anterior (benzen, toluen, etilbenzen, propilbenzen) folosind drept fază staționară o coloană cromatografică de tip Eclipse XDB-Phenyl (Zorbax) (silice modificată cu grupări fenil). De data aceasta, pe lângă interacțiile van der Waals dintre moleculele de analit și lanțurile hidrocarbonate din faza staționară, intervin și interacții de tip π - π . Influența modificatorului organic va fi analizată prin calcularea și compararea valorilor unor parametrii termodinamici specifici procesului de retenție cromatografică. Au fost studiate câte trei compoziții de fază mobilă pentru acetonitril sau metanol. Datele de retenție pentru cele patru hidrocarburi au fost înregistrate pe același domeniu de temperatură, 20°-50°C. Valorile logaritmului natural al factorului de retenție calculate pentru toate hidrocarburile au fost reprezentate grafic în funcție de inversul valorii absolute a coloanei cromatografice (reprezentări de tip van't Hoff). Exemple ale acestor dependențe, pentru două compoziții de fază mobilă, sunt prezentate în figura următoare (figura 2.6).

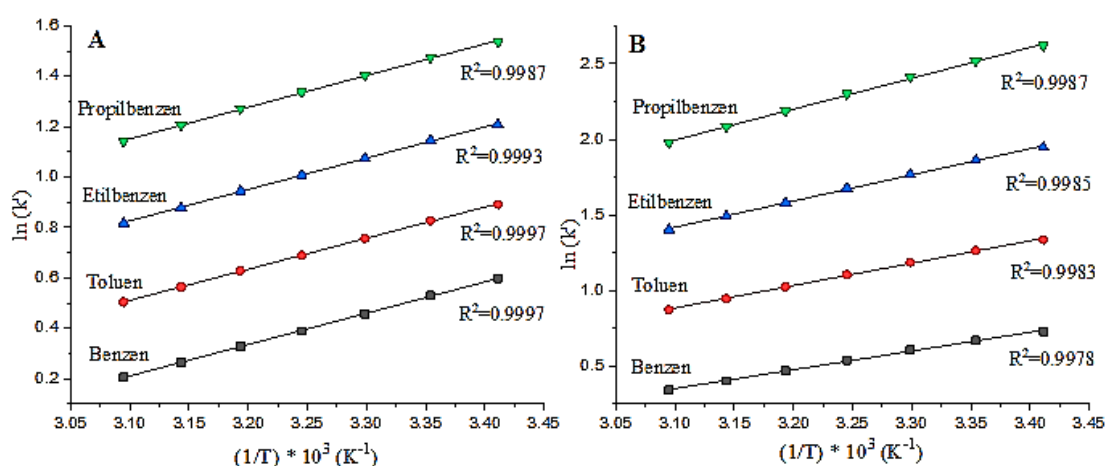


Figura 2.6. Dependența logaritmului factorului de retenție în funcție de inversul valorii temperaturii absolute a coloanei cromatografice pentru coloana Eclipse XDB-Phenyl pentru cele patru hidrocarburi studiate: A – fază mobilă 50% CH_3CN / 50% H_2O ; B – fază mobilă 50% CH_3OH / 50% H_2O (v/v).

Aceste dependențe pot fi modelate matematic de o funcție liniară, parametrii de regresie liniară pentru cei patru compuși studiați, pentru diferitele faze mobile, fiind

prezentați în tabelul 2.17. Literatura de specialitate raportează un studiu asemănător efectuat în alte condiții de separare cromatografică, utilizat pentru compararea datelor termodinamice calculate [175].

Conform metodologiei curente, valorile pantelor pentru cele patru hidrocarburi studiate din cele șase compoziții ale fazei mobile au fost folosite pentru a calcula variația entalpiei standard asociată procesului de transfer al analitului din faza mobilă în faza staționară, în timp ce valorile interceptelor au fost folosite pentru a calcula variația entropiei standard, ținând seama de aproximațiile menționate anterior [13, 14, 173] pentru valoarea lui Φ și utilizând ecuațiile (2.1.3) și (2.1.4) prezentate anterior.

O reprezentare grafică a valorilor ΔH° în funcție de procentul de modificator organic din faza mobilă este prezentată în figura 2.7.

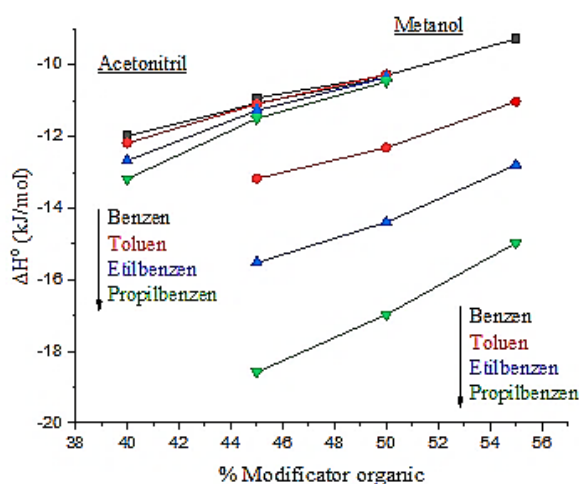


Figura 2.7. Dependenta variației entalpiei standard (ΔH°) corespunzătoare transferului hidrocarburilor aromatice din faza mobilă în faza staționară cu conținutul fazei mobile în modificator organic (acetonitril versus metanol).

Principala observație din figura 2.7 este diferența mică a valorii ΔH° pentru cele patru hidrocarburi aromatice studiate în cazul utilizării acetonitrilului drept modificator organic în compoziția fazei mobile. Această influență a acetonitrilului asupra valorilor ΔH° poate fi atribuită efectului de suprimare a interacțiilor π - π dintre hidrocarburile aromatice și inelele fenilenice atașate pe suprafața silicagelului. Metanolul și apa pot fi implicate doar în legături de hidrogen slabe cu structurile aromatice [177] și nu pot suprima forțele van de Waals dintre solut și faza staționară. Schimbarea fazei staționare la fenil silicagel de la octadecil sau octil silicagel nu are influențe în ceea ce privește comportarea sistemului, procesul de retenție fiind tot unul exoterm, guvernat de parametrul entalpic.

În mod contrar variației entalpiei standard, valorile corespunzătoare variației entropiei standard scad odată cu creșterea caracterului hidrofob, respectiv cu creșterea lanțului alifatic atașat de ciclul benzenic atunci când modificatorul organic folosit este acetonitrilul și cresc odată cu creșterea caracterului hidrofob al hidrocarburilor când modificatorul organic utilizat este metanolul, urmând aceeași tendință precum variația de entalpie standard (figura 2.8).

Valorile lui ΔG° pentru tot intervalul de temperatură (20°-50°C) au fost luând în considerare parametrul raportului volumelor celor două faze utilizat pentru estimarea contribuției entropice la procesul de partiție. Valoarea lui ΔG° crește de la benzen la propilbenzen pentru fiecare compoziție a fazei mobile. Pe de altă parte, valoarea ΔG° este influențată de compoziția fazei mobile, aceasta scăzând odată cu creșterea conținutului modificatorului organic. Acest lucru este în conformitate cu alte studii termodinamice anterioare ale procesului de retenție în RP-HPLC, în condiții de eluție similare [17, 178-181].

Concluziile studiului

Studiul cromatografic prezentat a avut drept scop determinarea influenței modificatorului organic asupra procesului de retenție a unui amestec de hidrocarburi (seria benzen-propilbenzen) în cromatografia de lichide în fază inversă pentru o coloană cromatografică cu faza staționară de tip fenil silicagel.

Acest studiu experimental a arătat faptul că hidrocarburile studiate prezintă o comportare de tip van't Hoff indiferent de faza mobilă utilizată, dependențele de tip van't Hoff obținute fiind liniare și caracterizate de coeficienți de determinare foarte buni, fiind calculați și parametrii termodinamici asociați procesului de transfer al analiților din faza mobilă în faza staționară (ΔH° , ΔS° și ΔG°), precum și un alt parametru important al procesului de retenție: selectivitatea de separare.

2.1.3. Influența temperaturii asupra valorilor extrapolate ale retenției pentru faze mobile cu conținut total de apă

Pe lângă temperatură, retenția în RP-HPLC este influențată de compoziția fazei mobile. O dependență general observată în RP-HPLC pentru variația factorului de retenție (k') de concentrația modificatorului organic, φ , este dată de ecuația empirică dintre logaritmul factorului de retenție k' și φ [10, 185, 186]:

$$\log k' = a + b \cdot \varphi \quad (2.1.16)$$

Această dependență poate fi studiată pentru orice compus care prezintă retenție față de o fază staționară C8, C18 sau fenil pentru un anumit domeniu al concentrației modificatorului

organic [187-190]. Regresii liniare bazate pe ecuația (2.1.16) pot fi dezvoltate folosind setul de valori experimentale (k' , φ) și utilizate în caracterizarea comportamentului de retenție al analiților studiați pe o fază staționară utilizată [191-193]. Această dependență este explicată de teoria solvofobică și poate fi utilizată în prezicerea comportamentului de retenție al compușilor organici nepolari sau slab polari prin mecanism de fază inversă [79, 86].

Pentru $\varphi = 0$, valoarea $\log k'$ corespunde unei faze mobile care constă doar în apă și, de obicei, aceasta este desemnată drept valoarea extrapolată a logaritmului zecimal al factorului de retenție, $\log k'_w$. Din ecuația (2.1.16) rezultă că $\log k'_w = a$. Pe de altă parte, valoarea extrapolată a factorului de retenție este corelată cu constanta de partiție ($K_{w/s}$) a solutului distribuit între faza mobilă (apă) și faza staționară hidrofobă, după formula cunoscută:

$$k'_w = \Phi \cdot K_{w/s} \quad (2.1.17)$$

Studiul a urmărit pe lângă determinarea parametrului k'_w din dependențele (2.1.16) aplicate valorilor experimentale (k' , φ), posibilitatea ca la rândul lor aceste valori extrapolate k'_w să depindă de temperatura coloanei. În acest caz, ecuația van't Hoff poate fi scrisă în forma:

$$\log k'_w = -\frac{\Delta H^o}{2,303RT} + \frac{\Delta S^o}{2,303R} + \log \Phi \quad (2.1.18)$$

O astfel de posibilitate ar putea oferi ocazia determinării parametrilor termodinamici ce ar caracteriza partiția hidrocarburilor studiate între o fază mobilă total apoasă și faza staționară hidrofobă. Totodată, existența acestei relații ar fi o demonstrație a corectitudinii experimentelor efectuate, afectate de erori mici sistematice sau întâmplătoare.

Prelucrarea datelor de retenție și interpretarea acestora

Influența compoziției fazei mobile asupra retenției a fost studiată pe intervalul de temperatură 25°-50°C la cinci procente diferite ale modificatorului organic folosit, acetonitril și metanol. În cazul utilizării acetonitrilului procente ale acestuia în faza mobilă au fost: 45%, 47,5%, 50%, 52,5% și 55%. În cazul utilizării metanolului drept modificator organic procente ale acestuia în faza mobilă au fost: 50%, 52,5%, 55%, 57,5% și 60%. În ambele cazuri faza mobilă este bicomponentă: modificator organic-apă. Acest studiu a fost realizat pe două coloane cromatografice: Gemini C18 (Phenomenex) și BDS Hypersil C18 (Thermo Scientific).

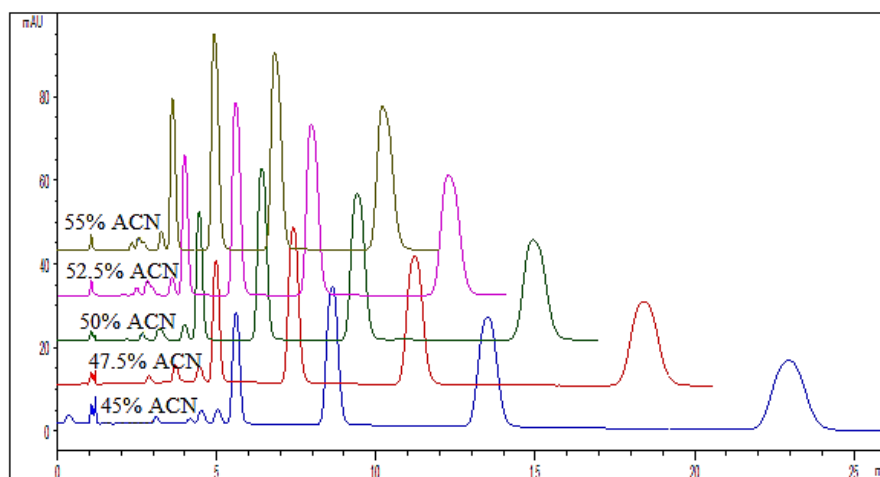


Figura 2.10. Cromatogramele suprapuse pentru cele patru hidrocarburi (ordine de eluție: benzen, toluen, etilbenzen, propilbenzen) obținute la temperatura de 25°C pe coloana Gemini C18 la diferitele compoziții de fază mobilă (45-55% acetonitril).

Factorul de retenție (k') pentru cele patru hidrocarburi aromatice a fost măsurat folosind diferitele compoziții ale fazei mobile menționate anterior, pentru ambele coloane cromatografice, regresii liniare aplicate dependențelor $\log k'$ versus ϕ conducând la parametri de regresie a și b . Valorile extrapolate ale $\log k'$ pentru faza mobilă care constă doar în apă și anume $\log k'_w$, depind de temperatura coloanei conform ecuației van't Hoff, cu parametri de regresie notați de această dată a' și b' . Indiferent de modificatorul organic folosit diferențele dintre parametri de regresie obținuți pentru cele două coloane cromatografice sunt foarte mici.

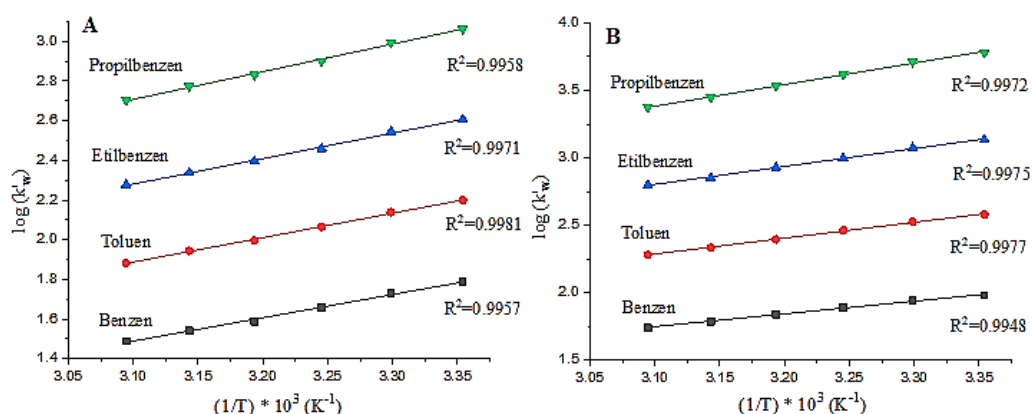


Figura 2.12. Dependența valorilor extrapolate ale $\log k'_w$ versus $1/T$ pentru hidrocarburile aromatice studiate obținută pe coloana BDS Hypersil C18 pentru modificator organic acetonitril (A), respectiv metanol (B).

Folosind ecuațiile (2.1.3) și (2.1.4), au fost calculate valorile pentru ΔH° și ΔS° , valori corespunzătoare unei partiții ipotetice a hidrocarburilor studiate între apă ca fază mobilă și faza staționară de tip silicagel modificat cu grupări C18 (tabel 2.26 și tabel 2.27).

Aceste valori sunt de aceeași mărime cu valorile raportate pentru alți compuși hidrofobi și pentru faze mobile constând în amestecuri diferite de modificator organic (acetonitril) și apă [7, 178, 194]. O concluzie care poate fi trasă din valorile enumerate în tabelele 2.26 și 2.27 este legată de caracterul hidrofob al hidrocarburilor studiate: cu cât caracterul compusului studiat este mai hidrofob cu atât valoarea variației entalpiei standard pentru transferul compusului din faza mobilă în faza staționară este mai mare. Conform datelor din tabelul 2.26 variația entropiei standard cu caracterul hidrofob al hidrocarburilor aromatice este inversă variației entalpiei standard, iar conform datelor din tabelul 2.27 valorile variației entropiei standard cresc de la benzen la propilbenzen.

Concluziile studiului

Valorile obținute pentru parametrii ΔH° și ΔS° în cadrul acestui studiu sunt semnificativ mai mari decât cele obținute pe aceleași coloane în cadrul studiului prezentat în subcapitolul 2.1.1, pentru ambii modificatori organici. Astfel, valorile ΔH° obținute pentru partiția ipotetică a hidrocarburilor studiate între apă și silicagelul modificat cu grupări C18 se încadrează în intervalul [-30,7; -18] kJ/mol pentru coloana BDS Hypersil și în intervalul [-36,2; -16,7] kJ/mol pentru coloana Gemini comparativ cu intervalele [-16,6; -8,2] kJ/mol pentru coloana Gemini și [-13,6; -7,4] kJ/mol pentru coloana BDS Hypersil. Acest lucru se corelează cu un efect exoterm mai pronunțat asociat transferului analiților atunci când faza mobilă este alcătuită în mod teoretic doar din apă.

De asemenea, contribuția entropică este semnificativ mai mare, de la intervalele de valori [-13,7; -0,7] J/mol·K pentru coloana BDS Hypersil și [-17,4; 1,8] J/mol·K pentru coloana Gemini, valori obținute în cadrul studiului prezentat în subcapitolul 2.1.1, la intervalele de valori [-29,5; -10,8] J/mol·K pentru coloana BDS Hypersil și respectiv [-35,1; 2,6] J/mol·K pentru coloana Gemini obținute în cadrul acestui studiu.

2.2. Dependența de temperatură a parametrului „phase ratio” pentru coloane cu fază staționară de tip octadecil silicagel

Problematica studiului

Raportul volumelor de faze, Φ , definit ca raportul dintre volumul fazei staționare, V_{fs} și volumul gol sau liber al coloanei, V_{fm} , este un parametru fundamental în modelarea retenției cromatografice. Împreună cu constanta de echilibru K a procesului de separare, acesta face parte din factorul de retenție k' prin relația de bază în HPLC:

$$k' = K \cdot \Phi \quad (2.2.1)$$

Recent, folosind conceptele teoriei solvofobice discutate în subcapitolul 1.2.3 s-a demonstrat că raportul volumelor de faze Φ poate fi estimat cu ajutorul acestui model [12, 13, 196]. Această procedură se bazează, într-o bună aproximație, pe dependența dintre factorul de retenție k' și constanta de partiție octanol/apă K_{ow} pentru o serie omologă de compuși test, cum ar fi seria unor hidrocarburi aromatice mononucleare. Această dependență poate fi exprimată prin relația următoare:

$$\log k' = a \log K_{ow} + \log \Phi \quad (2.2.2)$$

O altă posibilitate [14, 15], care rezultă din ecuația (2.2.2), se bazează pe studiul retenției a doi dintre compușii seriei, notați cu A și B, care eluează în ordinea $t_{r,A} < t_{r,B}$, iar relația de mai sus conduce la formula următoare de calcul a parametrului $\log \Phi$, conform relației:

$$\log \Phi = \frac{\log k'_B \log K_{ow,A} - \log k'_A \log K_{ow,B}}{\log K_{ow,A} - \log K_{ow,B}} \quad (2.2.3)$$

Această relație este puternic afectată de erori, astfel că cea mai corectă procedură este cea de utilizare a unei serii omologe de compuși și aplicarea regresii liniare descrise de ecuația (2.2.2). Această procedură a fost utilizată în studiile efectuate în cadrul acestei teze, dedicate variației cu temperatura a parametrului Φ . Pentru a investiga dependența parametrului Φ cu temperatura sunt necesare valorile $\log k'$ și $\log K_{ow}$ la diverse temperaturi. Aceste valori introduse în relații de regresie liniară, descrise de ecuația (2.2.2), vor conduce la parametri de regresie ce vor depinde de temperatura la care sunt exprimate valorile $\log k'$ și $\log K_{ow}$. Valoarea $\log k'$ poate fi măsurată experimental, din studii de retenție cromatografică, efectuate la o temperatură aleasă. În schimb, valoarea parametrului $\log K_{ow}$ trebuie estimată la temperatura la care a fost măsurat factorul de retenție k' . Aceste date sunt deja raportate pentru compușii studiați [197] și au fost utilizate în cadrul acestui studiu.

În această parte a studiului a fost investigată variația potențială a valorii parametrului Φ cu schimbarea temperaturii. Datele de retenție au fost obținute pentru trei coloane diferite care conțin fază staționară de tip silicagel modificat cu grupări C18, aceste coloane fiind Gemini C18 (Phenomenex), Ultisil XB-C18 (Welch) și BDS Hypersil C18 (Thermo Scientific). S-au utilizat două compoziții de fază mobilă apă/acetonitril sau apă/metanol pentru studierea comportamentului de retenție al analiților în intervalul de temperatură 20°-50°C.

Prelucrarea datelor de retenție și interpretarea acestora

Au fost obținute reprezentări grafice ale valorilor logaritmului factorului de retenție în funcție de $\log K_{ow}$ la temperatura corespunzătoare, dependența liniară între $\log k'$ și $\log K_{ow}$ fiind verificată pentru toate cele trei coloane și șapte valori de temperatură.

Reprezentările grafice de tip van't Hoff ale acestor valori ($\log K_{ow}$ versus $1/T$) sunt redată în figura 2.14. După cum se poate observa aceste tendințe sunt caracterizate de o funcție polinomială de gradul doi, cu R^2 acceptabile, cu un punct de maxim situat pe intervalul de temperatură utilizat.

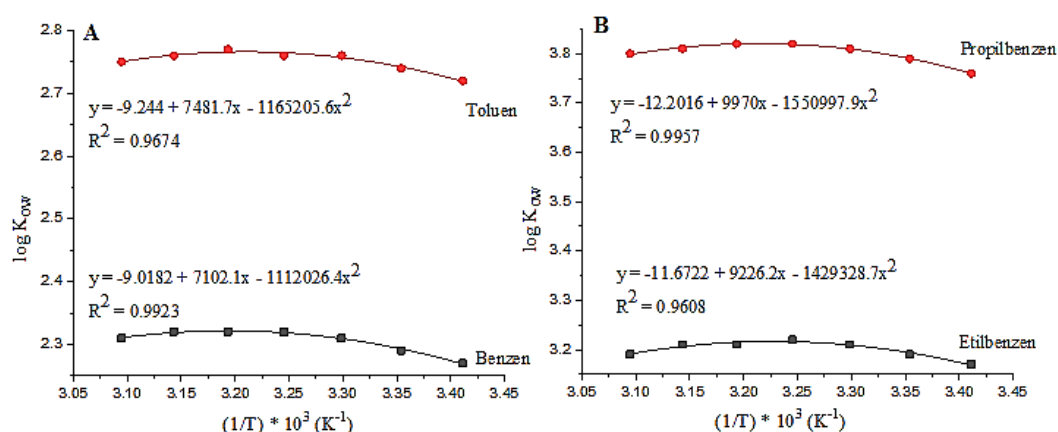


Figura 2.14. Grafice de tip van't Hoff pentru dependențele $\log K_{ow}$ versus $1/T$ pentru hidrocarburile analizate pe intervalul de temperatură studiat: A – comparativ benzen și toluen; B – comparativ etilbenzen și propilbenzen.

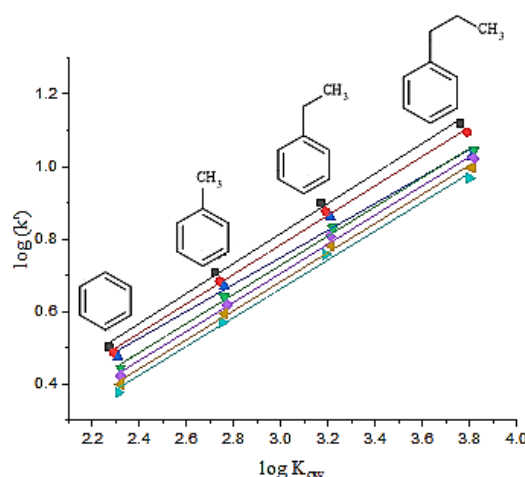


Figura 2.15. Reprezentarea grafică a valorilor $\log k'$ în funcție de $\log K_{ow}$ la diferite temperaturi (20°C-50°C) pentru coloana Gemini C18 cu faza mobilă 50% H_2O / 50% CH_3CN .

În continuare a fost studiată dependența $\log k'$ în funcție de $\log K_{ow}$, la diverse temperaturi ale coloanei cromatografice. Graficele obținute arată clar o dependență liniară a

acestor mărimi. Ca un exemplu, graficul corespunzător dependenței $\log k'$ în funcție de $\log K_{ow}$ la diferite temperaturi pentru coloana Gemini C18 cu faza mobilă 50% H_2O / 50% CH_3CN este prezentat în figura 2.15.

2.2.1. Dependența $\log \Phi$ în funcție de T pentru faze mobile cu conținut de acetonitril

Conform formulei (2.2.2) prezentată anterior, interceptul acestor regresii liniare reprezintă valorile corespunzătoare pentru $\log \Phi$, calculate la diferite temperaturi (tabel 2.32). Această procedură este aplicată pentru toate coloanele și compozițiile de fază mobilă evaluate în acest studiu.

Rezultatele din tabelul 2.32 indică faptul că valoarea raportului volumelor de faze scade odată cu temperatura. Această constatare este în acord cu rezultatele care indică faptul că adsorbția acetonitrilului în faza staționară scade odată cu creșterea temperaturii [18, 19]. O constatare suplimentară este că pentru gama restrânsă de componente apoase/organice în faza mobilă evaluată în acest studiu, creșterea componentei organice în faza mobilă scade valoarea Φ . Influența compoziției fazelor mobile asupra valorii Φ pentru intervale mai largi de componente apoase/organice a fost evaluată anterior [13-15] și s-a raportat că raportul volumelor de faze poate crește sau scade odată cu creșterea componentei organice, în funcție de solvent și intervalul de concentrație.

În continuare s-au obținut reprezentările grafice de tip van't Hoff pentru parametrul Φ , pentru toate fazele mobile studiate și pentru cele trei coloane cromatografice utilizate în cadrul acestui studiu.

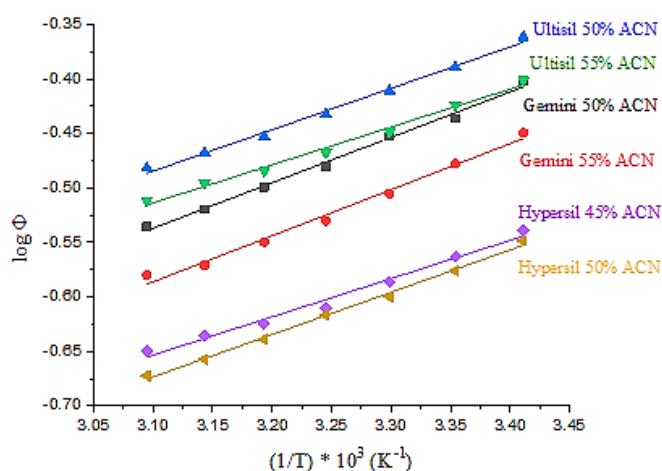


Figura 2.17. Reprezentarea grafică a dependenței $\log \Phi$ în funcție de $1/T$ pentru cele trei coloane cromatografice utilizate când modificatorul organic folosit este acetonitrilul.

Pentru faza mobilă 50% CH₃CN / 50% H₂O (v/v) am putut realiza o corelație între valoarea parametrului Φ și procentul de carbon corespunzător fiecărei coloane cromatografice utilizate, pe întreg domeniul de temperatură studiat. Această corelație este transpusă sub forma unei reprezentări grafice și este prezentată în figura 2.18.

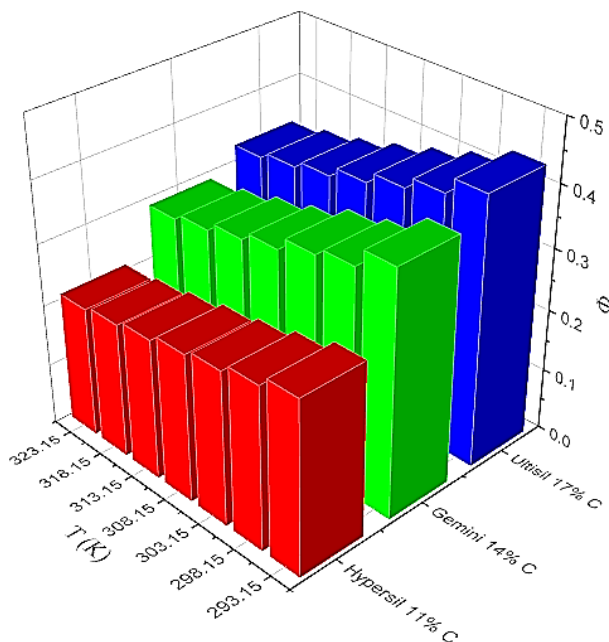


Figura 2.18. Corelația între procentul de carbon corespunzător fiecărei coloane cromatografice utilizate și valoarea parametrului Φ .

Conform acestei reprezentări grafice valoarea parametrului Φ crește concomitent cu creșterea procentului de carbon corespunzător fazei staționare ceea ce se corelează cu o densitate mai mare a grupărilor alchil grefate pe suprafața silicagelului și scade cu creșterea temperaturii, comportament absolut logic având în vedere faptul că odată cu creșterea temperaturii procesul de desorbție al moleculelor de modifier organic adsorbite pe suprafața grupărilor alchil grefate este încurajat.

2.2.2. Dependența $\log \Phi$ în funcție de T pentru faze mobile cu conținut de metanol

Pentru cazul fazelor mobile în care modifierul organic este metanolul se lucrează într-un mod identic cu cel prezentat în secțiunea 2.2.1. Astfel, conform ecuației (2.2.2) interceptul regresiei liniare va reprezenta valorile corespunzătoare pentru $\log \Phi$, calculate la temperaturile aferente. Această procedură este aplicată pentru toate coloanele și compozițiile de fază mobilă evaluate în acest studiu, valorile pentru $\log \Phi$ și, respectiv, pentru parametrul Φ fiind prezentate în tabelul 2.34 atunci când faza mobilă este de tip apă-metanol.

Spre deosebire de valorile obținute pentru parametrul „phase ratio” atunci când modifierul organic din faza mobilă a fost acetonitrilul, acestea prezentând o scădere a

valorii parametrului cu creșterea temperaturii, valorile obținute pentru acest parametru în cazul utilizării metanolului drept modificator organic în compoziția fazei mobile nu pot fi încadrate ca având o anumită tendință, fie ea crescătoare sau descrescătoare, cu creșterea valorii temperaturii. Acest lucru se poate explica probabil prin prisma diferențelor existente între acetonitril și metanol, însă studii mai aprofundate sunt necesare în acest sens.

Într-un mod identic de lucru cu cel pentru fazele mobile de tip apă-acetonitril s-au obținut reprezentările grafice de tip van't Hoff pentru parametrul Φ și pentru fazele mobile de tip apă-metanol, aceste reprezentări grafice fiind prezentate în figura 2.19 sub forma unor regresii liniare.

În cazul utilizării metanolului drept modificator organic rezultatele obținute nu pot fi fitate folosind în toate cazurile o funcție liniară, în cazul coloanei Ultisil o fitare folosind o funcție polinomială de gradul doi fiind mai pretabilă pentru această dependență.

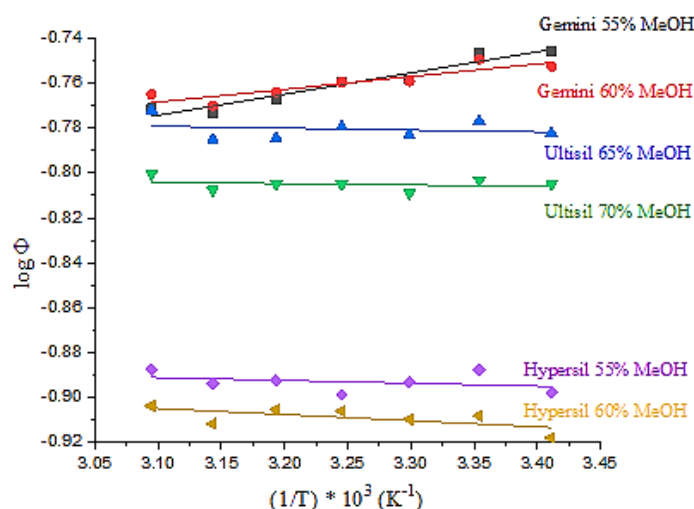


Figura 2.19. Reprezentarea grafică a dependenței $\log \Phi$ în funcție de $1/T$ pentru cele trei coloane cromatografice utilizate atunci când modificatorul organic folosit este metanolul.

2.2.3. Dependența constantei de echilibru a procesului de separare în funcție de T

Pe lângă evaluarea Φ , rezultatele obținute din graficul $\log k'$ în funcție de $\log K_{ow}$ permit calcularea lui K , constanta de echilibru a procesului de separare (ecuațiile (2.2.2) și (2.2.1)). Astfel, s-au obținut pentru cele trei coloane și, respectiv, cele două compoziții de fază mobilă apă-acetonitril și apă-metanol valorile constantei de echilibru a procesului de separare.

Așa cum era de așteptat, K ($\log K$) depinde, de asemenea, de temperatură, valoarea acesteia urmând o tendință descrescătoare atunci când temperatura crește în cazul fazelor mobile alcătuite din apă și metanol, în timp ce pentru fazele mobile de tip apă-acetonitril nu se păstrează același comportament, singura observație comună ce se poate atribui fiecărei

coloane cromatografice utilizate în acest studiu este faptul că valoarea $\log K$ este mai mare atunci când faza mobilă conține mai multă apă. Exemple ale dependenței $\log K$ în funcție de $1/T$ sunt prezentate în figura următoare.

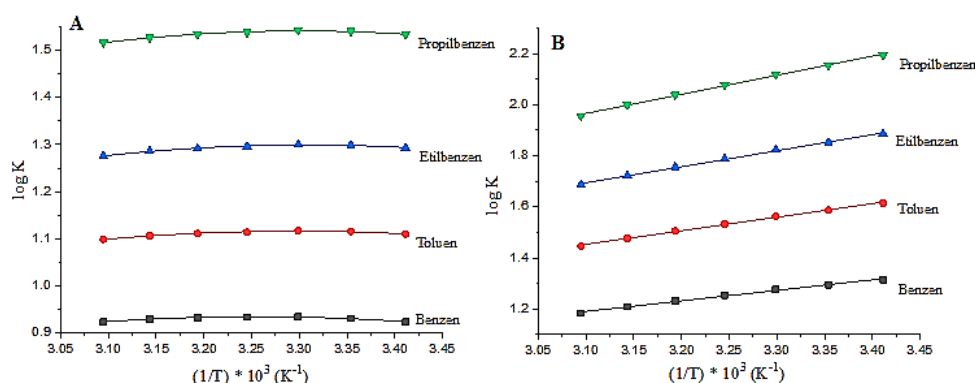


Figura 2.21. Reprezentarea dependenței $\log K$ în funcție de $1/T$ pentru seria de hidrocarburi benzen-propilbenzen studiate pe coloana Gemini cu faza mobilă apă-acetonitril 50% H_2O / 50% CH_3CN (A) și cu faza mobilă apă-metanol 45% H_2O / 55% CH_3OH (B).

Concluziile studiului

În acest studiu au fost calculate valorile parametrului „phase ratio” Φ și ale constantei corespunzătoare echilibrului de partiție K pentru trei coloane cromatografice cu faza staționară de tip silicagel modificat cu grupări octadecil și faze mobile binare de tip apă-modificator organic (acetonitril și metanol) și s-a investigat influența temperaturii asupra parametrilor Φ și K .

Valorile parametrului Φ obținute utilizând conceptele teoriei solvofobe scad odată cu creșterea temperaturii, ceea ce se corelează cu intensificarea fenomenului de desorbție al moleculelor de modificator organic adsorbite pe suprafața grupărilor alchil grefate care este încurajat de creșterea temperaturii.

S-au obținut valori mai mari ale parametrului Φ atunci când în faza mobilă drept modificator organic este folosit acetonitrilul comparativ cu cele obținute pentru metanol, această observație fiind explicată de comportamentul diferit al celor doi solvenți în ceea ce privește interacția acestora cu faza staționară. Având în vedere că acetonitrilul realizează până la cinci straturi de adsorbție la suprafața lanțurilor hidrocarbonate grefate ale fazei staționare comparativ cu monostratul realizat de metanol, atunci putem presupune un volum mai mare al fazei staționare care se obține în cazul utilizării acetonitrilului și, deci, o valoare mai mare a raportului de faze în acest caz.

Dependența parametrului Φ în funcție de $1/T$ nu poate fi fitată utilizând aceeași funcție pentru ambii modificatori organici folosiți: în cazul utilizării metanolului drept solvent organic rezultatele obținute nu pot fi fitate folosind în toate cazurile o funcție liniară,

în cazul coloanei Ultisil o fitare folosind o funcție polinomială de gradul doi fiind mai pretabilă pentru această dependență, în timp ce în cazul utilizării acetonitrilului toate datele obținute pot fi fitate folosind o funcție liniară.

Valorile constantei de echilibru a procesului de partiție depind, de asemenea, de temperatură: atunci când solventul organic este metanolul acestea prezintă o tendință descrescătoare odată cu creșterea temperaturii, iar când acetonitrilul este utilizat drept modifier organic valorile nu pot fi încadrate într-o anumită tendință.

2.3. Studiul comportării termodinamice în cromatografia de lichide în fază inversă cu deviații de la dependența van't Hoff

Introducere privind alegerea compușilor studiați

Acest studiu s-a realizat în vederea observării comportamentului unor substanțe chimice policiclice care fac parte din clasa de principii active denumite inhibitori ai fosfodiesterazei de tip 5, acestea având acțiune vasodilatatoare [204]. S-a urmărit influența anumitor parametri precum temperatura sau pH-ul fazei mobile asupra retenției substanțelor investigate și s-au calculat parametri importanți ai procesului de retenție cromatografică.

Substanțele ce au fost luate în lucru sunt sildenafilul (patentat sub numele Viagra de către Pfizer), vardenafilul (patentat sub numele Levitra de către Bayer) și tadalafilul (patentat sub numele Cialis de către Eli Lilly) [205], dintre acestea cel mai utilizat și cunoscut fiind sildenafilul. Aceste formulații farmaceutice sunt utilizate în principal pentru tratamentul disfuncției erectile la persoanele de sex masculin, sildenafilul fiind recomandat și în hipertensiunea arterială pulmonară (patentat sub numele Revatio de către Pfizer) [206], sau în răul de altitudine având efect asupra edemului pulmonar de altitudine [207, 208]. De asemenea, sildenafilul este subiectul mai multor grupuri de cercetare care au drept principal obiectiv verificarea potențialului acestuia, în mod singular sau în amestec, în tratarea diferitelor tipuri de cancer și a diabetului de tip 2 sau insulino-independent [206]. Structurile chimice ale celor trei substanțe investigate sunt redată în figura 2.22.

Aceste substanțe sunt specii chimice de interes, fiind unele dintre cele mai contrafăcute și alterate principii active farmaceutice la nivel mondial, valoarea de piață pentru segmentul corespunzător medicamentelor ce au drept scop tratarea disfuncției erectile ajungând la o sumă de aproximativ 3-4 miliarde de dolari la momentul actual [209]. Din acest motiv s-a creat o sferă de interes având drept subiect principal determinarea acestora, în mod singular sau în amestec cu alte substanțe, folosind diverse tehnici printre care tehnici electrochimice [210, 211], tehnici spectroscopice și spectrofotometrice [205, 212-218],

tehnici de analiză termică [219], cromatografia de lichide cuplată sau nu cu detecție de masă [205, 220-223], combinația de extracție în fază solidă și cromatografie de lichide cuplată cu detecție de masă [224, 225].

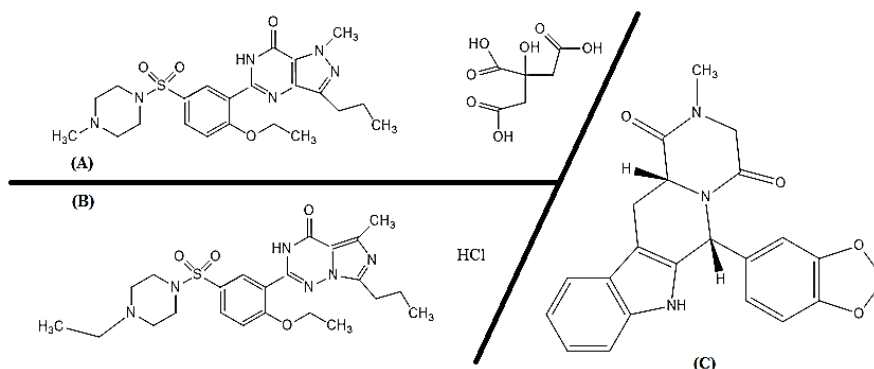


Figura 2.22. Structura chimică a substanțelor chimice utilizate: (A) sildenafil citrat; (B) vardenafil clorhidrat; (C) tadalafil.

2.3.1. Influența temperaturii asupra retenției pentru faze mobile fără control de pH

Prelucrarea datelor de retenție și interpretarea acestora

Au fost obținute valorile pentru logaritmul natural al factorului de retenție k' ($k' = (t_r - t_o)/t_o$) pentru fiecare substanță investigată la o temperatură specifică și pentru o anumită compoziție de fază mobilă binară. Valorile calculate ale logaritmului natural al factorului de retenție au fost reprezentate grafic în funcție de inversul valorii absolute a temperaturii coloanei cromatografice.

Sildenafilul citrat și vardenafilul clorhidrat prezintă o comportare asemănătoare: atunci când modificatorul organic folosit este acetonitrilul cele două principii active au o comportare de tip anti van't Hoff, valoarea timpului de retenție și, respectiv, a logaritmului natural al factorului de retenție crescând concomitent cu creșterea valorii temperaturii coloanei cromatografice, în timp ce atunci când metanolul este utilizat drept modificador organic cele două substanțe au o comportare de tip van't Hoff care se descrie ca o scădere a timpului de retenție cu creșterea valorii temperaturii. O notă discordantă o face tadalafilul care este caracterizat de o comportare de tip van't Hoff indiferent de modificadorul organic utilizat în compoziția fazei mobile.

Valorile coeficienților regresiei polinomiale pot fi folosite pentru a calcula parametrii termodinamici asociați procesului de retenție cromatografică: variația entalpiei, respectiv variația entropiei asociate procesului de transfer al analitului din faza mobilă în faza staționară, precum și variația energiei libere Gibbs. Acești parametrii termodinamici au fost

calculați în cadrul acestui studiu de comportare al procesului de retenție cu temperatura folosind următoarele ecuații:

$$\Delta H = -R \cdot \left(b + \frac{2c}{T} \right) \quad (2.3.2)$$

$$\Delta S = R \cdot \left(a - \ln \Phi - \frac{c}{T^2} \right) \quad (2.3.3)$$

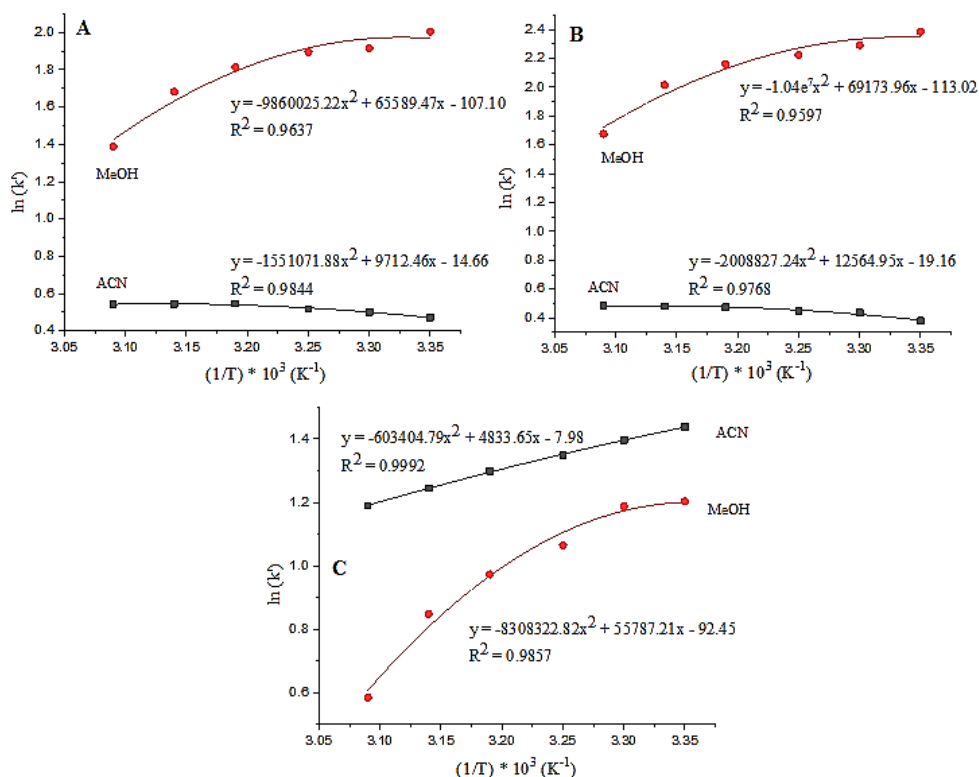


Figura 2.26. Reprezentarea grafică a dependenței logaritmului natural al factorului de retenție în funcție de $1/T$ pentru cele trei substanțe investigate și cei doi modificatori organici folosiți în faza mobilă: A-sildenafil citrat; B-vardenafil clorhidrat; C-tadalafil.

Parametrii termodinamici corespunzători sildenafilului citrat și vardenafilului clorhidrat urmează aceeași tendință. Astfel că, deși în cazul folosirii acetonitrilului drept modificador organic se poate vedea că valorile pentru întreg intervalul de temperatură pentru variația entalpiei și, respectiv, a entropiei sunt pozitive, procesul de transfer al analitului din faza mobilă în faza staționară are loc, mărturie stă valoarea din ce în ce mai negativă a energiei libere Gibbs. În cazul utilizării metanolului drept modificador organic valoarea variației de entalpie este negativă pentru întreg intervalul de, iar valoarea variației de entropie este pozitivă pentru primele două valori din intervalul de temperatură utilizat, apoi devenind din ce în ce mai negativă. Și de această dată procesul de transfer al analitului are loc, valoarea energiei libere Gibbs fiind negativă pe întreg intervalul de temperatură.

Și de această dată tadalafulul face notă discordantă comparativ cu celelalte două substanțe analizate: pentru ambii modificatori organici valorile obținute pentru variația entalpiei și, respectiv, variația entropiei sunt negative pe întreg intervalul de temperatură studiat. Aceeași afirmație este valabilă și în cazul valorilor energiei libere Gibbs corespunzătoare transferului analitului din faza mobilă în faza staționară, cu creșterea valorii temperaturii valoarea energiei libere Gibbs scăzând în valoare absolută.

Concluziile studiului

Acest studiu experimental a arătat faptul că principiile active studiate prezintă o comportare diferită deși fac parte din aceeași clasă de substanțe, astfel că tadalafulul are o comportare de tip van't Hoff indiferent de faza mobilă utilizată în procesul de retenție, în timp ce în cazul sildenafilului citrat și vardenafilului clorhidrat comportarea depinde de modificatorul organic prezent în compoziția fazei mobile. Pentru toate cele trei substanțe dependența logaritmului natural al factorului de retenție în funcție de inversul valorii absolute a temperaturii coloanei cromatografice prezintă abateri de la liniaritate.

S-au calculat parametrii termodinamici asociați procesului de transfer al analiților din faza mobilă în faza staționară: variația entalpiei, variația entropiei și, respectiv, variația energiei libere Gibbs.

2.3.2. Influența pH-ului fazei mobile asupra retenției

Structura compușilor cu grupări ionizabile este influențată de valoarea pH-ului fazei mobile prin componenta sa apoasă. Este posibil ca la anumite valori ale pH-ului compușii care participă la procesul de eluție cromatografică să fie prezenți în mai multe forme, care vor avea constante diferite de partiție între faza mobilă și faza staționară. Cum acest proces de partiție interfazică este caracterizat de mărimi termodinamice specifice fiecărei specii, este posibil ca per global liniaritatea dependenței van't Hoff să fie afectată. Această remarcă face obiectul acestui studiu, folosind compușii menționați pentru care s-a studiat comportarea cromatografică la diverse compoziții ale fazei mobile și temperaturi ale coloanei cromatografice.

Prelucrarea datelor de retenție și interpretarea acestora

Au fost calculate valorile logaritmului natural al factorului de retenție corespunzătoare celor trei principii farmaceutice active în intervalul de temperatură studiat pentru cele trei coloane, pentru toate valorile de pH și cei doi modificatori organici folosiți. Aceste valori ale

logaritmului natural al factorului de retenție au fost apoi reprezentate grafic în funcție de inversul valorii temperaturii absolute a coloanei cromatografice (exemplu figura 2.30).

Așa cum se poate observa sildenafilul citrat nu are o comportare universală pentru toate valorile de pH ale fazei mobile, în special atunci când modificatorul organic este acetonitrilul.

Pentru faza mobilă cu componenta apoasă având pH 2,5 sildenafilul are o comportare de tip van't Hoff cu abatere de la liniaritate, dependențele $\ln k'$ versus $1/T$ fiind caracterizate de funcții de gradul doi, pentru toate coloanele cromatografice utilizate și cei doi modificatori organici exceptând cazul coloanei Ultisil XB-C18, coloană cu faza staționară de tip „end-capped”, acesta prezintă o comportare de tip anti van't Hoff atunci când modificatorul organic din faza mobilă este acetonitrilul.

Pentru faza mobilă cu componenta apoasă având pH 5,3 sildenafilul se comportă diferit în funcție de coloanele utilizate, acesta având o anumită comportare cromatografică pe coloanele cu faza staționară de tip silicagel modificat cu grupări octadecil și o altă comportare cromatografică pe coloana cu faza staționară de tip silicagel modificat cu grupări octil. Astfel, pe coloanele de tip C18 sildenafilul are o comportare de tip anti van't Hoff atunci când modificatorul organic folosit este acetonitrilul și o comportare de tip van't Hoff în cazul utilizării metanolului, în timp ce pentru coloana de tip C8 în cazul utilizării acetonitrilului dependența $\ln k'$ în funcție de $1/T$ are o alură convexă, valoarea timpului de retenție scăzând în prima jumătate a intervalului de temperatură și apoi crescând pentru restul intervalului, iar în cazul utilizării metanolului dependența $\ln k'$ în funcție de $1/T$ are o alură concavă, valoarea timpului de retenție crescând în prima jumătate a intervalului de temperatură și apoi prezentând o scădere pentru restul intervalului de temperatură studiat.

Atunci când pH-ul componentei apoase din faza mobilă are valoarea 6,3 sildenafilul are o comportare de tip anti van't Hoff care prezintă abateri de la liniaritate pentru acetonitril utilizat drept modificador organic în faza mobilă existând însă mici discrepanțe între cele trei coloane (în cazul coloanelor Ultisil și Luna valoarea timpului de retenție crescând pe intervalul de temperatură 25°-40°C și apoi scăzând, în timp ce în cazul coloanei Gemini valoarea timpului de retenție crescând pe întreg intervalul de temperatură studiat), respectiv o comportare de tip van't Hoff când modificatorul organic este metanolul.

Pentru faza mobilă cu componenta apoasă având valoarea pH-ului 7,5 sildenafilul prezintă o comportare diferită pentru fiecare coloană folosită în cazul utilizării acetonitrilului drept modificador organic. Astfel, prezintă o comportare de tip van't Hoff pe coloana Gemini C18, prezintă o comportare identică pe coloana Ultisil C18 ca și în cazul valorii de pH 6,3

fiind caracterizat de o dependență cu alură concavă, iar în cazul coloanei Luna C8 dependența are o alură convexă, valoarea timpului de retenție scăzând în prima jumătate a intervalului de temperatură și apoi crescând pentru restul intervalului. Pentru metanol drept modificator organic comportarea sildenafilului citrat este identică pentru toate coloanele utilizate, aceasta fiind de tip van't Hoff.

Discrepanțele de comportare cromatografică ale sildenafilului citrat la diferitele valori de pH ale fazei mobile pot fi puse pe seama unui mecanism complex de retenție, bazat pe mai multe tipuri de interacții sau pot fi puse pe seama unor schimbări conformaționale ale fazei staționare sau ale substanței care prezintă comportamente de retenție diferite așa cum este sugerat și în literatura de specialitate [147, 194]. În figura care urmează sunt prezentate posibile forme ale sildenafilului citrat în funcție de valoarea pH-ului.

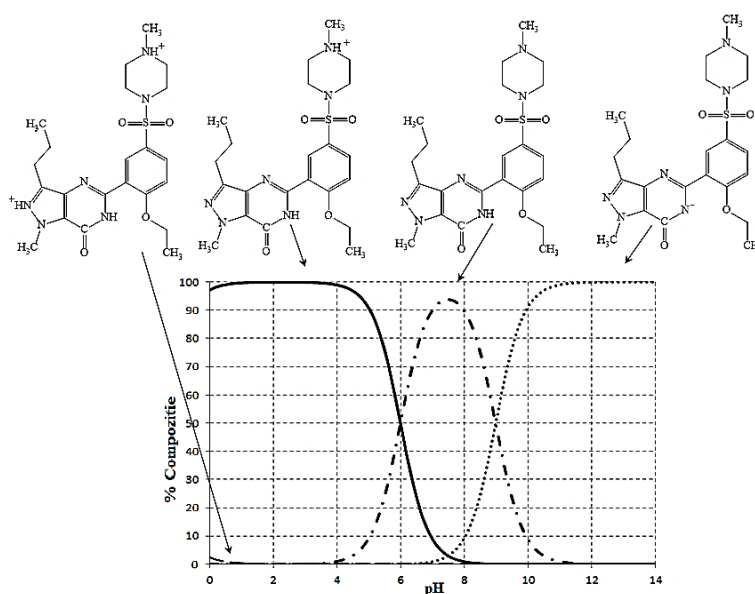


Figura 2.31. Variația cu pH-ul a diferitelor forme pentru molecula de sildenafil în soluție apoasă. Adaptare referință [201].

Așa cum am mai precizat, sildenafilul poate adopta mai multe forme în funcție de pH-ul fazei mobile, forme care interacționează diferit cu cele două faze aflate în contact, iar parametrii termodinamici calculați în acest caz sunt o rezultantă a acestor interacții diferite. Un exemplu al acestor afirmații se regăsește în figura figura 2.32.

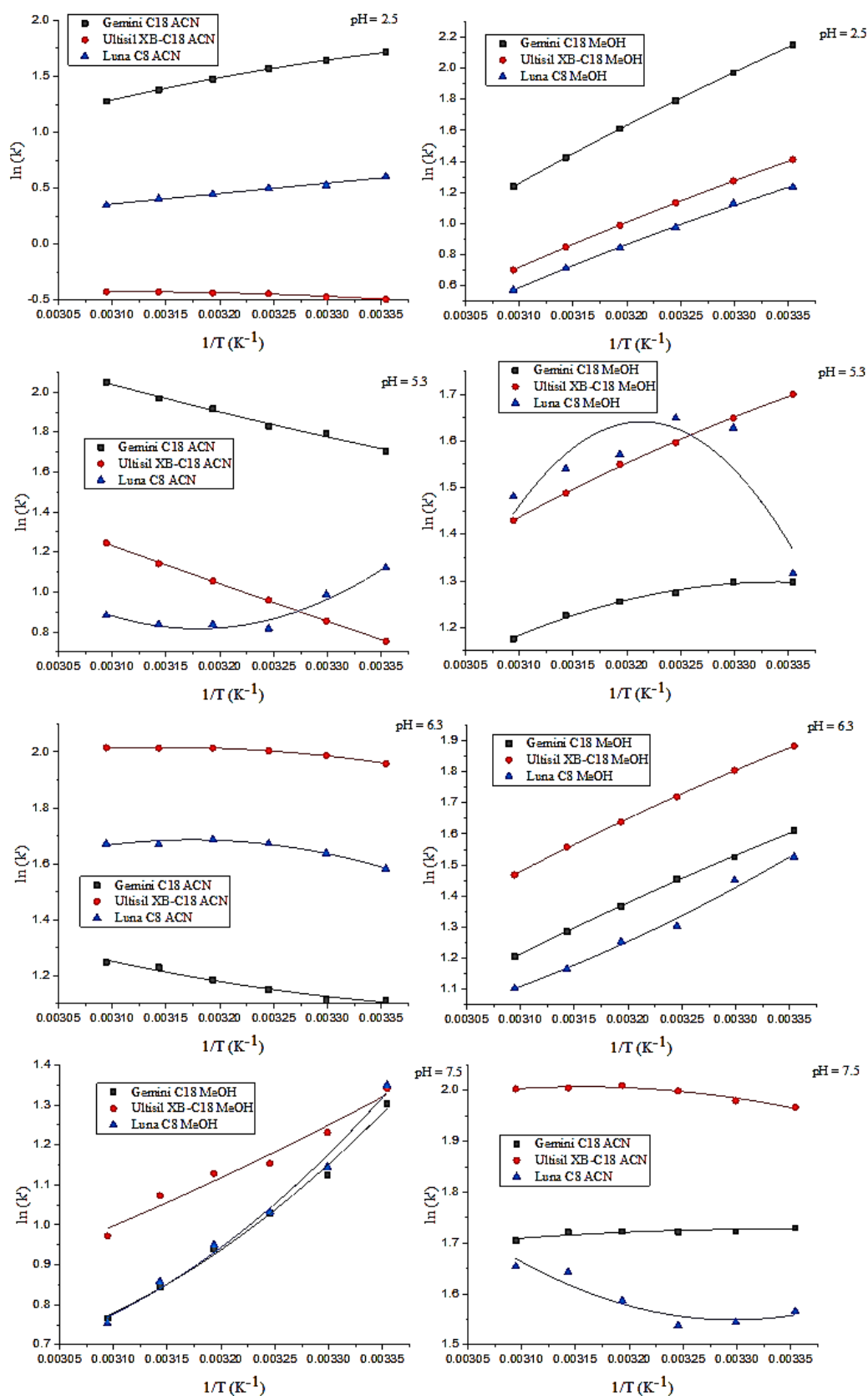


Figura 2.30. Dependențele $\ln k'$ versus $1/T$ pentru sildenafil citrat obținute pe cele trei coloane cromatografice utilizate și pentru toate valorile de pH ale fazelor mobile studiate.

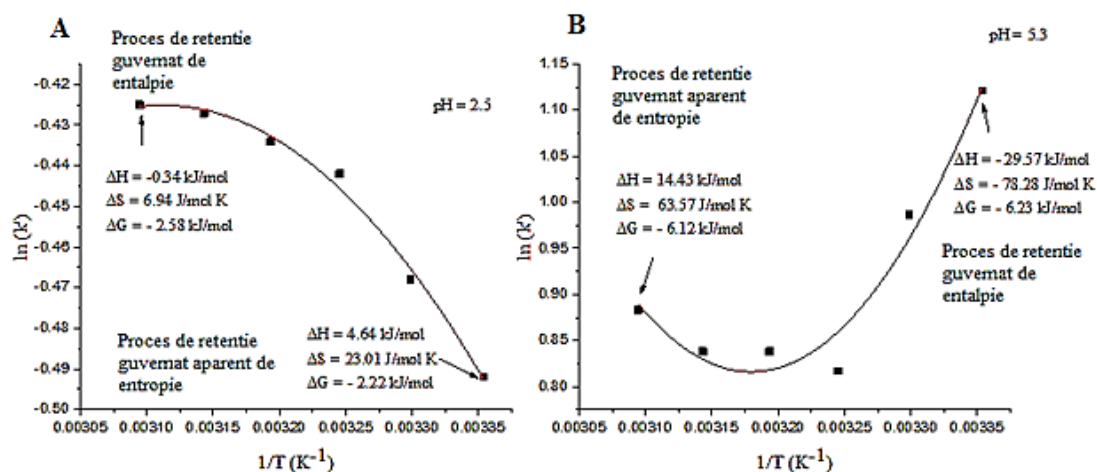


Figura 2.32. Exemple de deviații de la comportarea de tip van't Hoff pe coloana Ultisil XB-C18 (A) și pe coloana Luna C8 (B) când modificatorul organic este acetonitrilul.

De asemenea, sildenafilul poate prezenta mai multe forme tautomere (figura 2.34) care la rândul lor interacționează într-un mod specific cu cele două faze și care pot fi asociate cu motivul deviației de la o comportare de tip van't Hoff și, respectiv, cu prezența a unor mecanisme multiple de retenție.

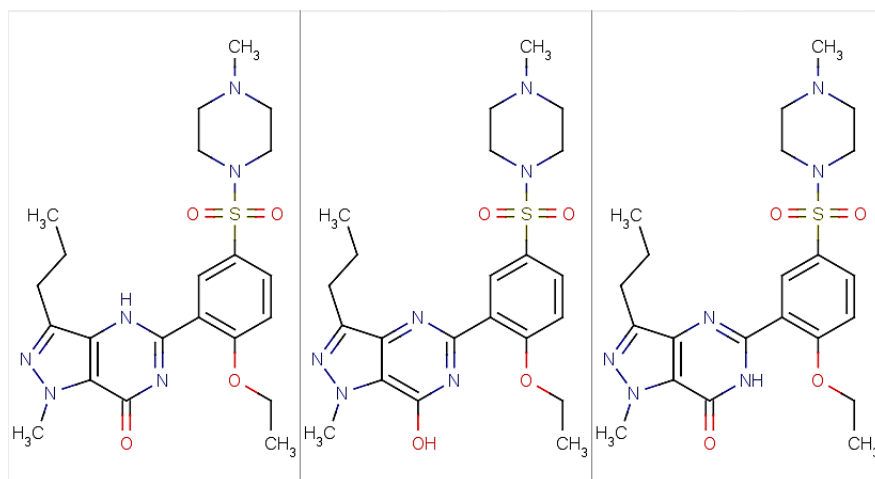


Figura 2.34. Forme tautomere ale sildenafilului conform programului ChemAxon 5.4.0.0.

Studii asemănătoare s-au realizat și pentru celelalte principii active din clasa inhibitorilor fosfodiesterazei: vardenafil clorhidrat, tadalafil și papaverină.

Concluziile studiului

Acest studiu experimental a arătat faptul că principiile active studiate prezintă o comportare diferită deși fac parte din aceeași clasă de substanțe, astfel că tadalafilul are o comportare de tip van't Hoff indiferent de pH-ul fazei mobile utilizate în procesul de retenție sau de modificatorul organic, în timp ce în cazul sildenafilului citrat și vardenafilului

clorhidrat comportarea depinde atât de modificatorul organic prezent în compoziția fazei mobile, cât și de valoarea pH-ului componentei apoase.

Pentru toate cele trei substanțe dependența logaritmului natural al factorului de retenție în funcție de inversul valorii absolute a temperaturii coloanei cromatografice prezintă abateri de la liniaritate, aceste dependențe fiind prelucrate cu ajutorul unor funcții polinomiale ale căror variabile au fost folosite în calculul parametrilor termodinamici asociați procesului de transfer al analiților din faza mobilă în faza staționară (variația entalpiei, variația entropiei și, respectiv, variația energiei libere Gibbs).

În literatura de specialitate identificarea cauzelor deviației de la comportarea de tip van't Hoff a substanțelor reprezintă un subiect încă neelucidat, existând diferite teorii care încearcă să explice acest comportament prin prezența unor echilibre secundare, a unor interconversii tautomerice sau a prezenței unor mecanisme multiple de retenție [147, 161, 194, 201, 231-238].

2.4. Concluzii generale

Partiția cromatografică în HPLC prin mecanism de fază inversă este, în general, influențată de temperatură, variația factorului de retenție măsurat experimental în funcție de temperatura coloanei fiind descrisă de ecuația van't Hoff. Aceasta arată o dependență liniară între $\ln k'$ pentru un analit și inversul temperaturii absolute a coloanei cromatografice ($1/T$), această dependență liniară observându-se în majoritatea situațiilor în care mecanismul de partiție este unic și nu au loc alte echilibre secundare cum ar fi disocieri sau izomerizări.

Studiul comportării cromatografice a unei serii de hidrocarburi aromatice de la benzen la propilbenzen au arătat că liniaritatea van't Hoff este respectată indiferent de fazele mobile sau staționare utilizate. Din reprezentările de tip van't Hoff s-au putut calcula mărimile termodinamice fundamentale ce caracterizează partiția cromatografică a compușilor menționați, estimându-se totodată un interval de variație de $[-16,7; -5,8]$ kJ/mol pentru valorile entalpiei standard ΔH° și de $[-18,7; 5]$ J/mol·K pentru cele ale entropiei standard ΔS° . Aceste valori sunt în concordanță cu datele de literatură din studiile HPLC pentru compuși analizați, de asemenea, fiind concordante cu valorile considerate normale pentru interacțiile van der Waals între două lanțuri hidrocarbonate ale proteinelor.

De asemenea, folosind aceeași serie de hidrocarburi s-a determinat influența compoziției fazei mobile asupra retenției, obținându-se regresii liniare folosind setul de valori experimentale (k' , ϕ) și respectiv valorile extrapolate ale $\log k'$ pentru faza mobilă care constă doar în apă și anume $\log k'_w$. Și aceste valori extrapolate depind de temperatura

coloanei conform ecuației van't Hoff, valorile corespunzătoare parametrilor termodinamici ΔH° și ΔS° obținute pentru partiția ipotetică a hidrocarburilor studiate între apă și silicagelul modificat cu grupări octadecil fiind semnificativ mai mari decât cele obținute pe aceleași coloane în cadrul studiilor anterioare.

O întrebare fundamentală la care s-a încercat să se răspundă în cadrul acestei teze este dacă raportul volumelor de faze (cunoscut în literatură sub denumirea de „phase ratio”, Φ) ce caracterizează o coloană cromatografică depinde de temperatura acesteia. Până în prezent literatura de specialitate nu raportează studii privind dependența de temperatură a parametrului „phase ratio”, ci doar estimări ale acestui parametru pentru diverse compoziții de fază mobilă. În general, majoritatea studiilor termodinamice privind partiția în HPLC prin mecanism în fază inversă iau în considerare un Φ constant, indiferent de temperatura la care are loc separarea.

Studiul de față arată că această dependență poate fi stabilită pentru modificatori organici uzuali ai fazei mobile, cum ar fi metanolul și acetonitrilul. Pentru aceasta s-au utilizat aceeași compuși cu structură stabilă și date de literatură privind dependența de temperatură a constantei de partiție apă-octanol K_{ow} utilizată în modelarea distribuției cromatografice a unui compus între faza mobilă hidrofilă și faza staționară hidrofobă.

În ultima parte a tezei s-au studiat câteva situații de comportare cromatografică în care variația dintre $\ln k'$ și $1/T$ prezintă deviații de la liniaritatea van't Hoff. Compușii model aleși au fost sildenafilul, vardenafilul, tadalafilul și papaverina, principii active farmaceutice de interes, care pot fi implicați în echilibre secundare de disociere sau izomerizare care complică procesul global de partiție, echilibre prezentate prin diagramele ce descriu dependența structurilor de pH-ul mediului solvatant. Studiul acestor variații de la liniaritate a fost efectuat în diverse condiții de eluție, variind pH-ul componentei apoase utilizate în compoziția fazei mobile. S-au observat atât deviații de la liniaritate, cât și o comportare anormală, prin creșterea retenției cromatografice cu creșterea temperaturii. Studiul a arătat că pentru situații de liniaritate sau neliniaritate retenția este controlată de entalpia procesului, iar în situații în care comportarea este anormală retenția este controlată aparent de entropie.

3. LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

1. The influence of column temperature on the extrapolated values of the retention factor in reversed-phase liquid chromatography for water as mobile phase, **Andreia-Cristina SOARE**, Toma GALAON, Serban C. MOLDOVEANU, Victor DAVID, *Revue Roumaine de Chimie*, 64(8), 2019, 727-731, DOI: 10.3224/rch.2019.64.8.09
2. Thermodynamic study of the retention of aromatic hydrocarbons on phenylsilicagel based stationary phase under reversed-phase liquid chromatographic mechanism, **Andreia-Cristina**

SOARE, Viorica MELTZER, Mihaela CHEREGI, Victor DAVID, *Revue Roumaine de Chimie*, 64(12), 2019, 1083-1089, DOI: 10.33224/rch.2019.64.12.08

3. Sources of nonlinear van't Hoff temperature dependence in high-performance liquid chromatography, Maria TANASE, **Andreia SOARE**, Victor DAVID, Serban C. MOLDOVEANU, *ACS Omega*, 4, 2019, 19808–19817, DOI: 10.1021/acsomega.9b02689

4. Does phase ratio in reversed phase high performance liquid chromatography vary with temperature?, **Andreia-Cristina SOARE**, Victor DAVID, Serban C. MOLDOVEANU, *Journal of Chromatography A*, 1620, 2020, 461023, DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461023

5. Variation with temperature of phase ratio in reversed phase HPLC for a methanol/water mobile phase, **Andreia-Cristina SOARE**, Victor DAVID, Serban C. MOLDOVEANU, *Chromatographia*, 84, 2021, 581–587, DOI: 10.1007/s10337-021-04038-7

4. COMUNICĂRI ȘTIINȚIFICE

1. Thermodynamic parameters obtained for the retention of aromatic hydrocarbons on phenylsilica stationary phase in reversed-phase liquid chromatography, **Andreia-Cristina SOARE**, Mihaela Carmen CHEREGI, Victor DAVID, *9th International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries (ICOSECS9), «Chemistry a Nature Challenger»*, 2019 – **Poster**

2. The temperature effect on the retention of sildenafil under reversed-phase liquid chromatography, **Andreia-Cristina SOARE**, Viorica MELTZER, Mihaela Carmen CHEREGI, Victor DAVID, „Prioritățile Chimiei pentru o dezvoltare durabilă – PRIOCHEM”, ediția a XV-a, 2019 – **Poster**

3. Comparative thermodynamic study of retention on various stationary phases in reversed-phase liquid chromatography, **Andreia-Cristina SOARE**, Elena PINCU, Mihaela-Carmen CHEREGI, Victor DAVID, International Conference CHIMIA 2020 <<New Trends in Applied Chemistry>>, 2021 – **Poster**

4. Temperature dependence of the phase ratio parameter in reversed phase high performance liquid chromatography, **Andreia-Cristina SOARE**, Victor DAVID, Sesiunea de Comunicări Științifice Studentești, Facultatea de Chimie, Universitatea din București, 2021 – **Prezentare orală**

5. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

[7] Moldoveanu, S. C., David, V., *Essentials in modern HPLC separations*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2013.

[12] Moldoveanu, S. C., David, V., Dependence of distribution constant in liquid-liquid partition equilibria on van der Waals molecular surface area, *J. Sep. Sci.*, 36, 2013, 2963–2978.

[13] Moldoveanu, S. C., David, V., Estimation of phase ratio in reversed-phase high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1381, 2015, 194–201.

[14] Caiali, E., David, V., Aboul-Enein, H. Y., Moldoveanu, S. C., Evaluation of the phase ratio for three C18 high performance liquid chromatographic columns, *J. Chromatogr. A*, 1435, 2016, 85–91.

[16] Vailaya, A., Fundamentals of reversed phase chromatography: thermodynamic and exothermodynamic treatment, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 28, 2005, 965–1054.

[17] Bocian, S., Soukup, J., Jandera, P., Buszewski, B., Thermodynamics study of solvent adsorption on octadecyl-modified silica, *Chromatographia*, 78, 2015, 21–30.

[18] Buszewski, B., Bocian, S., Zera, R., Influence of temperature and pressure on the preferential adsorption of component of hydroorganic mobile phase in liquid chromatography, *Adsorption*, 16, 2010, 437–445.

[19] Buszewski, B., Bocian, S., Rychlicki, G., Vajda, P., Felinger, A., Study of solvent adsorption on chemically bonded stationary phases by microcalorimetry and liquid chromatography, *J. Colloid Interface Sci.*, 349, 2010, 620–625.

[20] Chester, T. L., Coym, J. W., Effect of phase ratio on van't Hoff analysis in reversed-phase liquid chromatography, and phase-ratio-independent estimation of transfer enthalpy, *J. Chromatogr. A*, 1003, 2003, 101–111.

[147] Galaon, T., David, V., Deviation from van't Hoff dependence in RP-LC induced by tautomeric interconversion observed for four compounds, *J. Sep. Sci.*, 24, 2011, 1423–1428.

[152] Flieger, J., Trebacz, H., Pizon, M., Plazinska, A., Plazinski, W., Kowalska, A., Szczesna, A., Plech, T., Thermodynamic study of new antiepileptic compounds by combining chromatography

- on the phosphatidylcholine biomimetic stationary phase and differential scanning calorimetry, *J. Sep. Sci.*, 42, 2019, 2628-2639.
- [153] Limsavarn, L., Dorsey, J. G., Influence of stationary phase solvation on shape selectivity and retention in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1102, 2006, 143-153.
- [154] Tache, F., Udrescu, S., Albu, F., Micale, F., Medvedovici, A., Greening pharmaceutical applications of liquid chromatography through using propylene carbonate–ethanol mixtures instead of acetonitrile as organic modifier in the mobile phases, *J. Pharma. Biomed. Anal.*, 75, 2013, 230–238.
- [161] Galaon, T., Anghel, D. -F., David, V., Aboul-Enein, H. Y., Unusual temperature-retention dependences observed for several benzodiazepines in RP-HPLC using different mobile phase compositions, *Chromatographia*, 76, 2013, 1623–1630.
- [163] Tanase, M., Bacalum, E., David, V., Variability of temperature dependences of the retention of strongly polar compounds under Zic-Hilic liquid chromatographic mechanism, *Sep. Sci. Plus*, 2(1), 2019, 12-17.
- [172] Soare, A. -C., Galaon, T., Moldoveanu, S. C., David, V., The influence of column temperature on the extrapolated values of the retention factor in reversed-phase liquid chromatography for water as mobile phase, *Rev. Roum. Chim.*, 64, 2019, 727-731.
- [173] Rybka, J., Holtzel, A., Steinhoff, A., Tallarek, U., Molecular dynamics study of the relation between analyte retention and surface diffusion in reversed-phase liquid chromatography, *J. Phys. Chem. C*, 123, 2019, 3672-3681.
- [175] Caiali, E., David, V., Retention behavior of aromatic hydrocarbons in reversed-phase HPLC based on phenyl-silica stationary phase, *Rev. Roum. Chim.*, 64, 2019, 367-372.
- [178] Guillarme, D., Heinisch S., Rocca, J. L., Effect of temperature in reversed phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1052, 2004, 39-51.
- [181] Heinisch, S., Rocca, J. L., Sense and nonsense of high-temperature liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1216, 2009, 642-658.
- [186] David, V., Medvedovici, A., Structure-retention correlation in liquid chromatography for pharmaceutical applications, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 30, 2007, 761-789.
- [187] Atapattu, S. N., Poole, C. F., Praseuth, M. B., Insights into the retention mechanism for small neutral compounds on silica-based phenyl phases in reversed-phase liquid chromatography, *Chromatographia*, 81, 2018, 225-238.
- [188] Heinisch, S., Rocca, J. L., Effect of mobile phase composition, pH and buffer type on the retention of ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatography: application to method development, *J. Chromatogr. A*, 1048, 2004, 183-193.
- [192] Poole, C. F., Influence of solvent effects on retention of small molecules in reversed-phase liquid chromatography, *Chromatographia*, 82, 2019, 49-64.
- [194] Galaon, T., Mihailciuc, C., Medvedovici, A., David, V., The influence of mobile-phase flow-rate in RP-LC on thermodynamic parameters studied for polar compounds, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 34, 2011, 521-536.
- [195] Petre, J., Iancu, V., David, V., Thermodynamic study of the liquid chromatography retention process for some pesticides on C8 and C18 silica-based stationary phases, *Rev. Roum. Chim.*, 58, 2013, 425-432.
- [196] Moldoveanu, S. C., Caiali, E., David, V., Phase ratio and equilibrium constant in RP-HPLC obtained from octanol/water partition constant through solvophobic theory, *Chromatographia*, 80, 2017, 1491-1500.
- [197] David, V., Moldoveanu, S. C., Variation with temperature of octanol/water partition coefficient for the homologous series from benzene to propylbenzene, *Sep. Sci. Plus*, 2, 2019, 457-464.
- [201] Tanase, M., Soare, A., David, V., Moldoveanu, S. C., Sources of nonlinear van't Hoff temperature dependence in high-performance liquid chromatography, *ACS Omega*, 4, 2019, 19808–19817.
- [224] Er, E. Ö., Akkaya, E., Özbek, B., Bakırdere, S., A powerful combination of quadruple isotope dilution strategy with dispersive magnetic solid phase extraction for the accurate and precise multi-analyte determination of tadalafil, sildenafil, avanafil and vardenafil in human plasma and urine samples using LC-ESI-Tandem MS, *Microchem. J.*, 152, 2020, 104302.