

Raport Științific
privind implementarea proiectului în perioada octombrie – decembrie 2011

Proiect: PN-II-ID-PCE-2011-3-0152
Denumire proiect: Injecție de volume mari de solvenți nemiscibili cu faza mobilă în cromatografia de lichide de înaltă presiune.
Contract număr: 310/05.10.2011
Director Proiect: Prof. Dr. Andrei Medvedovici
Perioadă acoperită de raport: 05.10.2011 – 30.12.2011

Obiectivele planificate pentru această etapă sunt următoarele:

Obiectivul 1 / acțiunile 1-2; Obiectivul 8

Obiectivul 1: Studiul unor aspecte fundamentale privitoare la procesul de injecție de volume mari de probă dizolvată în solvenți nemiscibili cu faza mobilă în cromatografia de lichide.

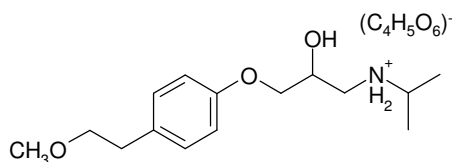
- acțiunea 1. efectul diverșilor solvenți utilizați la solubilizarea probei;
- acțiunea 2. evaluarea unor amestecuri de solvenți nemiscibili cu faza mobilă pentru injecția în cromatografia de lichide.

Obiectivul 8: Crearea unui web-site asociat proiectului.

Rezultate:

Condiții experimentale:

Analitul model considerat în studiul experimental a fost tartratul de metoprolol, cu structura chimică de mai jos:



Metoprolol base: CAS 51384-51-1
Formula moleculară: $C_{15}H_{25}NO_3$
Mw 267.364 g/mol
Log P exp. 1.88 (Hansch C. et al., 1995)
Log P calc. 1.69 (Fragment theory, KOWWIN, Episuite)

Metoprololul este un blocant al receptorilor β_1 utilizat în tratamentul diferitelor afecțiuni ale sistemului cardiovascular, în special hipertensiunea arterială. S-au preparat soluții echivalente la 1000 ppm metoprolol bază în fază mobilă și în metanol. Pentru obținerea soluțiilor în alți solvenți nemiscibili cu apa, o soluție apoasă echivalentă la 1000 ppm metoprolol bază a fost adusă la pH 12 cu o soluție de NaOH 1N, după care s-a procedat la extracția lichid-lichid, faza extractantă fiind reprezentată chiar de diluentul care urmează a fi studiat. Coloana cromatografică a fost întotdeauna încărcată cu echivalentul la 1 μ g metoprolol bază (în consecință, soluțiile folosite la injecția de volume crescătoare au fost diluate corespunzător cu solventul evaluat).

Diluenții nemiscibili cu faza mobilă care au făcut obiectul studiului au fost următorii:

- *acetatul de butil* ($C_6H_{12}O_2$; CAS: 123-86-4; Mw=116,16 g/mol; log $P_{exp.} = 1,78$; log $P_{calc.} = 1,85$; solubilitate în apă = 7 g/1000 mL la 25 °C; densitate 0,883 g/mL; vâscozitate 0,72 CP la 20 °C);

- *tetraclorura de carbon* (CCl_4 ; CAS: 56-23-5; $M_w=153,82$ g/mol; $\log P_{\text{exp.}} = 2,83$; $\log P_{\text{calc.}} = 2,44$; solubilitate în apă = $0,8$ g/1000 mL la 20°C ; densitate $1,594$ g/mL; vâscozitate $0,91$ CP la 27°C);
- *1-octanol* ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$; CAS: 111-87-5; $M_w=130,23$ g/mol; $\log P_{\text{exp.}} = 3,00$; $\log P_{\text{calc.}} = 2,81$; solubilitate în apă = $0,54$ g/1000 mL la 25°C , densitate $0,827$ g/mL; vâscozitate $10,6$ CP la 15°C);
- *ciclohexan* (C_6H_{12} ; CAS: 110-82-7; $M_w=84,16$ g/mol; $\log P_{\text{exp.}} = 3,44$; $\log P_{\text{calc.}} = 3,18$; solubilitate în apă = $0,06$ g/1000 mL la 25°C , densitate $0,778$ g/mL; vâscozitate $1,0$ CP la 20°C);
- *n-hexan* (C_6H_{14} ; CAS: 110-54-3; $M_w=86,18$ g/mol; $\log P_{\text{exp.}} = 3,90$; $\log P_{\text{calc.}} = 3,29$; solubilitate în apă = $0,013$ g/1000 mL la 20°C , densitate $0,655$ g/mL; vâscozitate $0,297$ CP la 20°C);

Au fost considerate 3 coloane cromatografice având riguros aceeași geometrie, în speță 15 cm lungime, $4,6$ mm diametru interior și $5\ \mu\text{m}$ diametrul particulelor de umplutură. Fazele staționare considerate au avut la bază silicagel modificat chimic având dimensiunile porilor de $100\ \text{\AA}$. Modificarea chimică a coloanei a fost reprezentată prin: coloana 1 – fază staționară octadecil silicagel inertizată chimic (Zorbax XDB C18 – puternic dezactivată pentru utilizare în mediu bazic); coloana 2 – fază staționară octil silicagel inertizată chimic (Zorbax XDB C8 – puternic dezactivată pentru utilizare în mediu bazic); coloana 3 – fază staționară octadecil silicagel cu linker hidrofil încorporat (grupare amidică, cu inertizare, indicator Zorbax Stable Bond AQ). Pentru toate cele 3 coloane activitatea grupărilor silanol reziduale de pe suprafața silicagelului a fost minimizată prin inertizare (end-capping).

Eluția s-a realizat în condiții izocratice, utilizând un raport volumetric de $9/1$ între componentele A și B ale fazei mobile. Componenta A este o soluție apoasă de 50 mM formată de amoniu și $0,2\%$ trietilamină adusă la pH $3,5$ cu acid formic. Componenta B a fazei mobile este acetonitrilul. Debitul ales al fazei mobile a fost de 1 mL/min, iar coloanele au fost termostate la 25°C . În cazul injecțiilor cu solvenți nemiscibili cu faza mobilă, după eluția picului analitului, a urmat un gradient de tip treaptă (100% acetonitril în $0,01$ min și menținerea în regim izocratic la această compoziție timp de 5 min.) Revenirea la compoziția inițială s-a efectuat în $0,1$ min. cu o perioadă de echilibrare de 3 min. Acest profil de compoziție a fazei mobile a fost necesar pentru eliminarea din coloană a "dopului" de solvent de injecție nemiscibil cu faza mobilă adsorbit în faza staționară. Detecția a fost spectrometrică (în domeniul UV, la o lungime de undă analitică de 280 nm).

Volumele de probă injectate au fost: 1 , 5 , 10 , 20 , 50 , 75 , respectiv $100\ \mu\text{L}$, păstrând constantă cantitatea de analit încărcată în coloană.

Modalitate de lucru:

Datele experimentale "brute" care au fost înregistrate sunt:

- timpul mort al coloanei cromatografice în condițiile de exploatare (t_0 , se determină prin observarea timpului absolut de retenție a azotatului de potasiu, soluție apoasă 1000 ppm, injecție monitorizată la 210 nm);
- timpul absolut corespunzător picului asociat picului de metoprol (t_R^M);
- factorul de retenție corespunzător picului de metoprolol ($k = (t_R^M - t_0)/t_0$);
- eficiența procesului cromatografic aferentă eluției metoprololului, măsurată prin numărul de talere teoretice asociate picului în cauză ($N = (t_R^M)^2/\sigma^2$); σ este abaterea standard asociată populației valorilor timpilor de retenție asociate picului cromatografic și se calculează prin măsurarea lărgimii picului cromatografic la

jumătate din înălțimea sa - $w_{1/2}$ ($s = w_{1/2}/2,355$);

- factorul de asimetrie asociat picului cromatografic, măsurat la 0,1 din înălțimea sa ($FA=b/a$, unde b este măsurat pe o paralelă la linia de bază trasată la 0,1 din înălțimea picului cromatografic și este determinat ca fiind segmentul la intersecția înălțimii coborâte din vârful picului pe această paralelă și latura descrescătoare a picului, iar a este măsurat pe o paralelă la linia de bază trasată la 0,1 din înălțimea picului cromatografic și este determinat ca fiind segmentul dintre latura crescătoare a picului cromatografic și intersecția înălțimii coborâte din vârful picului pe aceasta);
- factorul de trenă USP, notat TF ($TF = (a+b)/2 \times a$, unde a și b au semnificațiile sus-amintite, cu singura diferență că se vor măsura la 0,05 din înălțimea picului cromatografic);
- asimetria picului (skewness) notată cu sk ; sk poate căpăta valori negative dacă picul cromatografic înregistrează un fenomen de "fronting", sau pozitive dacă picul cromatografic înregistrează un fenomen de "tailing". O valoare sk nulă indică o distribuție oarecum egală în raport cu media, aceasta neimplicând însă o simetrie perfectă. sk -ul unei variabile aleatoare X reprezintă cel de-al treilea moment standardizat, notat cu γ și definit ca $\gamma = E[(X-\mu)^3/\sigma]$, unde μ este media, σ este abaterea standard, iar E este operatorul de estimare a unei variabile aleatoare (ca medie ponderată a tuturor valorilor posibile a variabilei, $E[X] = \sum_{i=1}^{\infty} (x_i \times p_i)$, p_i reprezentând ponderile valorilor concrete x_i).

Rezultatele experimentale ar trebui să conducă la următoarele observații (așa cum rezultă și din studiile efectuate de echipa noastră publicate anterior în reviste de specialitate [1,2]):

- să se înregistreze o reducere liniară a factorului de retenție cu volumul injectat de probă atunci când diluentul nu este miscibil cu faza mobilă;
- distorsiunea picului cromatografic trebuie să fie semnificativă în condițiile în care analitul prezintă un caracter hidrofob mai accentuat decât diluentul;
- eficiența să descrească liniar cu volumul injectat;
- toți indicatorii de simetrie ai picului cromatografic trebuie să se modifice în condițiile creșterii volumului de injecție în solvenți nemiscibili cu faza mobilă.

Determinarea valorilor primare în condițiile injecției de volume crescătoare de probă dizolvată în faza mobilă indică domeniul normal de variație pentru parametrii în cauză.

Injecția de volume crescătoare de probă dizolvată în metanol ($\log P_{exp.} = -0,77$; $\log P_{calc.} = -0,63$) trebuie să indice volumul maxim dincolo de care distorsiunea picului cromatografic devine inacceptabilă în cazul unor determinări analitice orientate în sensul dozării compusului în cauză din diferite matrici.

Discuții:

Corelațiile dintre factorii de retenție corespunzători picului de metoprolol în condițiile injecției de volume crescătoare de probă în diverși solvenți, respectiv pe diverse faze staționare sunt prezentate în Tabelul 1. Pentru ilustrare, Figura 1 indică maniera în care factorul de retenție variază cu volumul de injecție în cazul fazei staționare XDB C18.

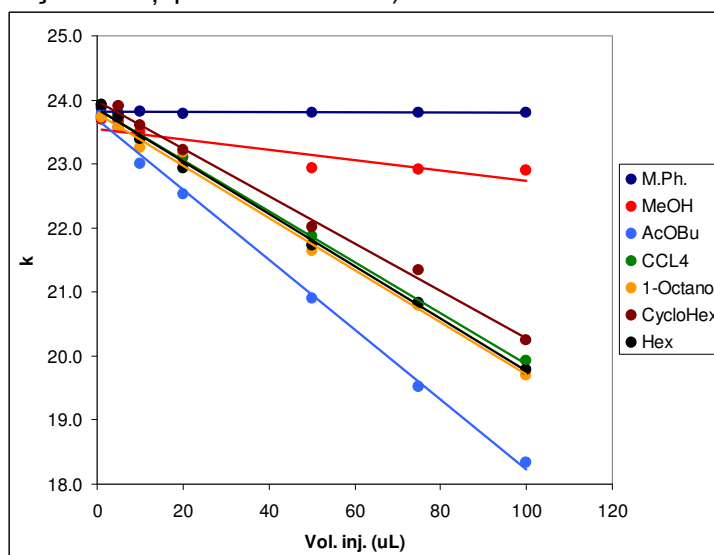
Valoarea $V_{inj}^{(k=0)}$ reprezintă volumul de injecție extrapolat la retenție nulă și corespunde, din punct de vedere fenomenologic, cu volumul de diluent care saturează întreaga fază staționară din coloana cromatografică. Acest parametru este cu atât mai mare cu cât diluentul

are o mai mare capacitate de adsorbție multistrat, deci "consumă" un volum mai mic de fază staționară. Acest parametru ar trebui să fie independent de natura analitului folosit ca marker de retenție, și ar trebui să fie determinat doar de natura diluentului, a tipului de fază staționară și de compoziția fazei mobile. Independența parametrului $V_{inj}^{(k=0)}$ în raport cu natura analitului va trebui verificată în experimente ulterioare.

Tabel 1. Parametrii de regresie liniară pentru variația factorului de retenție în raport cu volumul de probă injectat.

Coloană	Diluent	Pantă	Intercept	Coef. de corelație (r_{xy})	$V_{inj}^{(k=0)}$ (μ L)
C18	Fază mobilă	-0.0002	23.814	0.2668	-
	MeOH	-0.0081	23.543	0.8623	-
	AcOBu	-0.0547	23.699	0.9984	433
	CCl ₄	-0.0397	23.851	0.9986	601
	1-Octanol	-0.0407	23.782	0.9976	584
	Ciclohexan	-0.0370	23.983	0.9979	648
	Hexan	-0.0410	23.864	0.9987	582
C18 AQ	Fază mobilă	0.0004	14.418	0.7438	-
	MeOH	-0,0072	14,412	0,8021	-
	AcOBu	-0.0238	14.410	0.9970	606
	CCl ₄	-0.0185	14.401	0.9965	778
	1-Octanol	-0.0182	14.439	0.9992	793
	Ciclohexan	-0.0183	14.415	0.9989	788
	Hexan	-0.0198	14.332	0.9984	724
C8	Fază mobilă	0.0010	20.222	0.7595	-
	MeOH	-0,0062	20,189	0,8324	-
	AcOBu	-0.0464	20.142	0.9991	434
	CCl ₄	-0.0306	20.277	0.9997	663
	1-Octanol	-0.0331	20.378	0.9994	616
	Ciclohexan	-0.0305	20.292	0.9986	665
	Hexan	-0.0313	20.302	0.9981	649

Figura 1. Variația factorului de retenție cu volumul injectat (diverși diluenți pe coloana C18).



Intervalele normale de variație pentru parametrii calculați ai separărilor cromatografice, așa cum rezultă acestea din injecțiile de volume crescătoare de probă dizolvată în faza mobilă, sunt prezentate în **Tabelul 2**.

Tabelul 2. Intervale normale de variație pentru factorul de retenție, eficiență și descriptori de asimetrie a picului cromatografic, așa cum rezultă ele din injecția de volume crescătoare de probă dizolvată în faza mobilă.

Coloană	Caracteristică	Parametru				
		k	N	FA	TF	sk
C18	σ	0,027	197	0,035	0,019	0,029
	RSD (%)	0,11	1,7	2,1	1,5	6,8
	Interval Normal variație	$\pm 0,06$	± 400	$\pm 0,07$	$\pm 0,04$	$\pm 0,06$
C18 AQ	σ	0,021	178	0,039	0,016	0,026
	RSD (%)	0,10	1,6	2,6	1,3	7,1
	Interval Normal variație	$\pm 0,04$	± 360	$\pm 0,08$	$\pm 0,04$	$\pm 0,06$
C8	σ	0,050	277	0,069	0,038	0,039
	RSD (%)	0,26	2,3	4,5	2,9	10,5
	Interval Normal variație	$\pm 0,1$	± 560	$\pm 0,14$	$\pm 0,08$	$\pm 0,08$

Se poate lesne observa că factorul de retenție este parametrul cel mai sensibil, el rămânând practic constant odată cu variația volumului de injecție, atunci când solventul probei este chiar faza mobilă (abatere relativă standard sub 0,25%). Variații ale numărului de talere teoretice în intervalul de ± 500 nu indică de fapt o modificare semnificativă a eficienței globale a separării (abaterea relativă standard situându-se sub 2,5%). Dintre toți indicatorii de simetrie pentru picul cromatografic, factorul de trenă USP pare să fie cel mai puțin afectat de erorile experimentale, variind cu cel mult o unitate la prima zecimală semnificativă, corespunzător unei abateri relative standard sub 3%.

Spre deosebire de rezultatele experimentale comunicate anterior în [2], obținute pentru analiți mai polari, în cazul metoprololului, pentru toate cele trei faze staționare și toți diluenții studiați, eficiența scade în mod exponențial cu volumul injectat, după o relație generală de forma $y = A_0 + A_1 \times \exp[-(x-B_0)/B_1]$. Coeficienții de corelație determinați pentru regresile neliniare (exponențiale descrescătoare) se încadrează în intervalul 0,9232 – 0,9978. Pentru exemplificare, în **Figura 2** sunt ilustrate variațiile eficienței în raport cu volumul injectat pe coloana XDB C18 și pentru diluenții utilizați în studiu.

În ceea ce privește variația descriptorilor de simetrie a picului cromatografic, dependențele funcționale sunt mai complexe. Considerând factorul de asimetrie la 0,1 din înălțimea picului cromatografic, pentru fazele staționare de tip silicagel funcționalizat cu radicali alchil (XDB C8 și XDB C18), octanolul folosit ca diluent generează o tendință de fronting, pe când ciclohexanul și hexanul o tendință de tailing (în această ordine descrescătoare). Singura diferență este indusă de acetatul de butil, care în cazul fazei staționare XDB C18 produce o tendință de tailing odată cu creșterea volumului injectat, pe când în cazul XDB C8, tendința este de fronting. În ambele cazuri, tetraclorura de carbon nu produce modificări ale simetriei picului odată cu creșterea volumului injectat. În cazul fazei staționare de tip C18 AQ, ciclohexanul este cel care nu produce modificări de simetrie la creșterea volumului injectat. În acest caz octanolul, hexanul și acetatul de butil (în această ordine descrescătoare) generează fronting pe când tetraclorura de carbon generează tailing. Explicația efectului de fronting în cazul octanolului (pe toate fazele staționare) poate fi legată de fenomenul de canelare vâscoasă [3,4], având în vedere diferența foarte mare între

vâscozitatea "dopului" de solvent și faza mobilă. În virtutea aceleiași logici, tetraclorura de carbon și ciclohexanul, cu vâscozități cvasiidentice cu faza mobilă, ar trebui să nu contribuie în mod semnificativ la deformarea picului cromatografic, cel puțin din punctul de vedere al contribuției prin canelare vâscoasă. Procesul de deformare a picului cromatografic este determinat, fără îndoială, nu numai de contribuția efectului de canelare vâscoasă (care apare preferențial în zona de gradient descrescător de vâscozitate între frontul de diluent și faza mobilă) dar și de solubilitatea diluenților în faza mobilă. Pentru exemplificare, în **Figura 3** este prezentată variația factorului de asimetrie cu volumul injectat în cazul coloanei de tip C18 AQ.

Figura 2. Variația eficienței cu volumul injectat pentru coloana XDB C18 și diluenții considerați în studiu.

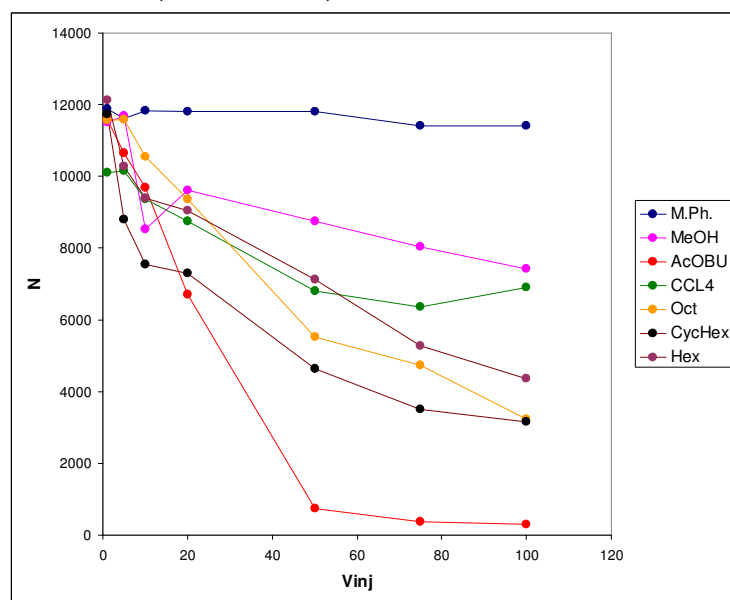
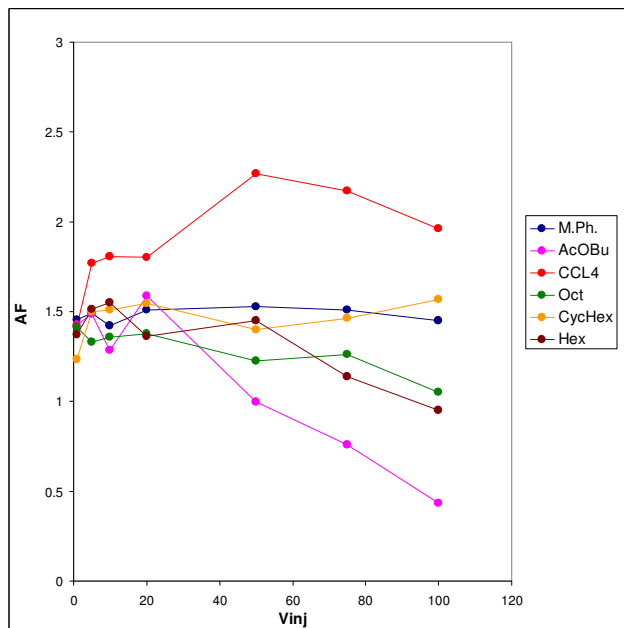
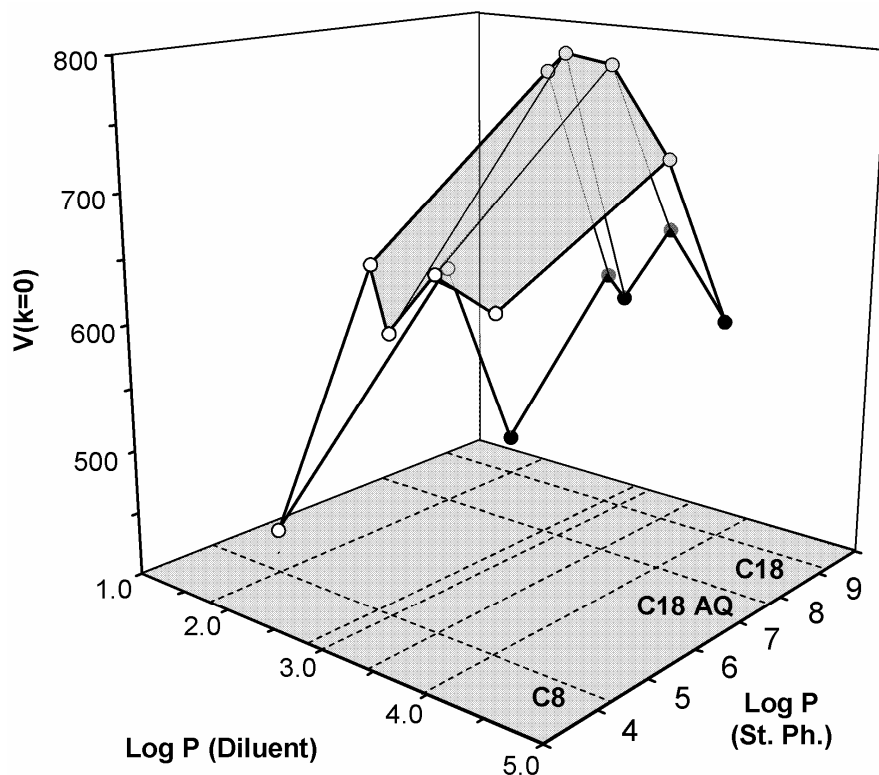


Figura 3. Variația factorului de asimetrie cu volumul injectat pentru faza staționară C18 AQ (pentru diluenții considerați în studiu).



Privitor la modul în care variază $V_{inj}^{(k=0)}$ în raport cu hidrofobicitatea diluentului (exprimată ca $\log P$) și hidrofobicitatea fazei staționare (aproximată prin $\log P$ echivalent al radicalului care funcționează silicagelul), se obține variația tridimensională din **Figura 4**.

Figura 4. Variația $V_{inj}^{(k=0)}$ prin raportare la hidrofobicitatea diluentului și a fazei staționare.



Rezultatele experimentale pot părea la prima vedere discutabile, atâta vreme cât formarea multistratului de adsorbție a diluentului la nivelul suprafeței fazei staționare se observă cu precădere în cazul fazei C18 AQ (asta chiar și în cazul diluenților puternic hidrofoți). O posibilă explicație a acestui fenomen aduc în discuție efectele sterice.

Experimentele au fost toate realizate în condițiile utilizării unei faze mobile foarte bogată în componentă apoasă (90%) tocmai pentru a forța adsorbția diluentului în faza staționară. În aceste condiții, radicalii alchil legați de suprafața silicagelului (la rândul-i inertizată) au tendința de colapsare sterică datorită efectului de tensiune superficială. În cazul fazei staționare cu linker hidrofil tendința de colapsare practic nu se manifestă tocmai datorită grupării amidice, care leagă radicalul alchil de silicagel. În acest mod centrii de adsorbție sunt mai bine expuși interacțiilor cu moleculele diluentului (oricare ar fi acesta, cu pronunțat caracter apolar, sau oarecum polar), ceea ce crește probabilitatea formării multistratului.

Concluzii:

1. Injecția de volume mari de probă dizolvată în solvenți nemiscibili cu faza mobilă este posibilă doar în cazul în care diluentul are afinitate mai mare pentru faza staționară prin raportare la analitul de interes. Din acest motiv, injecțiile în acetat de butil au aproape aceleași limitări ca și injecția în metanol pur (max. 20 μL). Faza

staționară C18 AQ este cea mai permisivă, acceptând un volum de injecție în acetat de butil de 50 μ L.

2. Întotdeauna injecția de volume mari în diluenți nemiscibili cu faza mobilă produce o scădere exponențială a eficienței asociate picului cromatografic. Acest efect nedorit poate fi compensat prin aplicarea unui profil de eluție în gradient liniar (plecând de la o compoziție a fazei mobile bogată în component apos și ajungând la final la o compoziție mai bogată în solvent organic). Profilul în gradient este absolut necesar pentru eliminarea diluentului adsorbit în faza staționară, deci o astfel de abordare rezolvă simultan ambele aspecte.
3. În funcție de vâscozitatea și solubilitatea în apă a diluentului, la injecția de volume mari se pot observa efecte de deformare a picului cromatografic. Aceste corelații funcționale complexe trebuie analizate de la caz la caz. Atunci când diluentul prezintă o vâscozitate asemănătoare cu a fazei mobile (la începutul separării) și solubilitatea sa în aceasta este redusă, există șanse semnificative ca volumele mari de injecție să nu inducă deformări ale picului cromatografic. Diluenții cu vâscozitate mare în raport cu cea a fazei mobile pot fi folosiți cu succes în cazul analiților care au tendința de a genera un ușor tailing în condițiile normale de eluție, deoarece prin efectele de canelare vâscoasă, efectul de fronting contrabalansează tendința inițială.
4. Datorită stereochemiei centrilor de adsorbție de la suprafața fazei staționare (în condițiile utilizării unor faze mobile foarte bogate în componentă apoasă), încărcarea cea mai mare cu diluent nemiscibil se poate realiza în cazul utilizării linkerilor hidrofilii (cu favorizarea adsorbției multistrat).
5. Injecția de volume mari în diluenți nemiscibili cu faza mobilă este un procedeu accesibil în cazul utilizării mecanismului de separare în fază inversă, care poate fi optimizat ușor și rapid.

Referințe bibliografice:

- [1] Medvedovici A., David Vasile, David Victor, Georgita C. *Retention phenomena induced by large volume injection of solvents non-miscible with the mobile phase in reversed phase liquid chromatography*, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 30, 199-213 (2007).
- [2] Udrescu S., Medvedovici A., David V., *Effect of large volume injection of hydrophobic solvents on the retention of less hydrophobic pharmaceutical solutes in RP-LC*, J. Sep. Sci., 31, 2939-2945 (2008).
- [3] Keunchkarian S., Reta M., Romero L., Castells C.B. *Effect of sample solvent on the chromatographic peak shape of analytes eluted under reversed-phase liquid chromatographic conditions*, J. Chromatogr. A, 1119(1/2), 20-28 (2006).
- [4] Castells C.B., Castells R.C. *Peak distortion in reversed-phase liquid chromatography as a consequence of viscosity differences between sample solvent and mobile phase*, J. Chromatogr. A, 805(1/2), 55-61 (1998).

Web site-ul asociat proiectului a fost realizat și poate fi consultat la adresa:

<http://www.chimie.unibuc.ro/cercetare/analitica/web%20Med.pdf>

În baza prezentării domeniului de cercetare prin conferința plenară susținută de directorul de proiect în cadrul celui de-al XVII-lea Simpozion Internațional de Științe ale Separării desfășurat la Cluj-Napoca, România, în perioada 5-9 Septembrie 2011 (respectiv al rezumatului publicat în volumul simpozionului) a fost solicitată indexarea proiectului în baza

internațională de date IndustryGateWay. În consecință, informații preliminare asupra proiectului pot fi găsite și la adresa:

<http://industrygateway.org/db/viewProject.do?projectID=5319&source=1&action=fetch>
sub codul 004175. Certificatul înregistrării în baza internațională de date se atasează în copie prezentului raport științific (vezi **Anexa 1**).

Deoarece a existat oportunitatea obținerii unor probe reale provenite dintr-un studiu clinic de bioechivalență între două formulări farmaceutice pentru administrare orală conținând simvastatin și metabolitul său asociat acidul simvastatic (prin bunăvoința S.C. Labormed Pharma S.A.) a putut fi dezvoltat și Obiectivul 4 (programat pentru anul 2012) legat de identificarea și utilizarea unor solvenți "verzi" în tehnicile bioanalitice care să permită aplicarea principiului injecției de volume mari de diluenți nemiscibili cu faza mobilă. Rezultatele experimentale obținute s-au constituit într-un manuscris care a fost deja înaintat pentru publicare.

Director de proiect,
Profesor Dr. Andrei Valentin Medvedovici,



Departamentul de Chimie Analitică
Facultatea de Chimie
Universitatea din București
Șos. Panduri nr. 90-92, București-050663, România
E-mail: avmedved@yahoo.com
Fax: 021 4102279
Tel.: 072 3330423