

Raport Științific
privind implementarea proiectului în perioada Noiembrie 2013 – Decembrie 2014

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: 01.11.2013 – 30.12.2014

Datorită re-eșalonării proiectului inițial pe o perioadă extinsă (până în luna Septembrie a anului 2015), prezentul raport se referă la Obiective și Activități consemnate în programarea inițială pentru perioadele 2013 și 2014.

Aspecte teoretice (modelarea procesului)

Conform aspectelor comentate în raportul coroborat pentru perioada 2011-2013 (întocmit în luna Octombrie 2013), echipa proiectului propusese o nouă modelare a procesului de injecție a volumelor mari de probă dizolvată în solvenți nemiscibili cu faza mobilă. Noul model propus și susținut de date experimentale reconsideră procesul ca o cuplare on-line între extracția lichid-lichid cu fază extrasă imobilizată în pat solid (RP-SLE) și cromatografia de lichide cu mecanism în fază inversă (RPLC).

Procesul poate fi sumar descris prin următoarele etape: **I.** transportul "dopului" de diluent în capul coloanei cromatografice; **Ila.** procesul de formare a canalelor de curgere a fazei mobile prin "dopul" de diluent, simultan cu procesul de extindere spațială a acestuia în capul coloanei cromatografice; **Ilb.** extracția analiților din diluent în faza mobilă (faza extrasă este diluentul, faza extractantă este faza mobilă; faza extrasă este imobilizată la suprafața fazei staționare din coloana cromatografică); **IIa.** continuarea procesului de extracție lichid-lichid a analiților între diluent și faza mobilă și "re-injecția" analiților în faza staționară liberă existentă imediat după zona ocupată de diluent, ajunsă la extensia maximă; **IIlb.** migrarea fronturilor analiților în coloana cromatografică rămasă liberă și realizarea separării cromatografice propriu-zise.

Pentru modelul prezentat, următoarele condiții simplificatoare au fost asumate: **1.** diluentul (D) înlocuie complet faza mobilă (FM) în capul coloanei cromatografice, imediat după injecție; **2.** "dopul" de diluent rămâne imobil după transferul său în capul coloanei cromatografice și după extinderea sa spațială maximă; **3.** solubilitățile reciproce ale diluentului și fazei mobile sunt considerate neglijabile; **4.** caracterul hidrofoab al diluentului este semnificativ similar cu cel al fazei staționare (FS); **5.** modelul nu ia în considerare transferul de masă longitudinal/axial și radial/transversal având ca efect lărgirea frontului analitului; transferul de masă radial/transversal este considerat instantaneu, pe când difuzia longitudinală/axială este considerată nulă; **6.** numărul de canale prin care FM penetrează "dopul" de diluent este semnificativ similar cu numărul de canale de curgere ale FM prin umplutura coloanei cromatografice; **7.** contribuția FS la distribuția analitului în zona ocupată de diluent este neglijabilă, cu alte cuvinte contribuția FS la diluția analitului în zona cu diluent este minimă; **8.** fenomenul de digitație viscoasă (viscous fingering) la interfețele dintre lichidele nemiscibile este neglijabil.

Neglijarea fenomenului de digitație viscoasă nu este întâmplătoare. La interfața dintre diluent și faza mobilă, fenomenul de digitație viscoasă este anulat prin extinderea zonei de

diluent (etapa **Ila.**). La cealaltă interfață fază mobilă/diluent, difuzia viscoasă este practic anulată de formarea canalelor de curgere ale FM prin "dopul" de diluent.

În urma aplicării unui algoritm de calcul (prezentat în raportul anterior, dar și îmbunătățit din punctul de vedere a formalismului matematic) se ajunge la următoarea expresie a factorului de retenție aparent (k_{app}) pentru un analit injectat în coloana cromatografică într-un volum mare de diluent nemiscibil cu faza mobilă

$$k_{app} = \frac{\alpha K}{2} + k(1 - \alpha) = \alpha \left(\frac{K}{2} - \alpha k \right) + k \quad [1]$$

unde $\alpha = V_{inj}/V_0$ este volumul de injecție redus (V_0 fiind volumul mort al coloanei),

K reprezintă constanta de distribuție a analitului A între FM și diluent,

α este factorul de extensie a zonei ocupate de diluent, $\alpha = S_0/(S_0 - S_1)$, unde S_0 este secțiunea efectivă de curgere a FM prin coloana cromatografică iar S_1 este secțiunea efectivă de curgere a FM prin zona ocupată de diluent (după extensia sa spațială finală),

k este factorul de retenție al analitului în cauză, determinat în urma injectării unui volum mic de probă dizolvată în fază mobilă.

Dacă relația [1] descrie observațiile experimentale (mai precis scăderea liniară a factorului de retenție aparent odată cu creșterea volumului injectat), panta relației liniare ($K/2 - \alpha k$) ar trebui să fie negativă, ceea ce ar fi echivalent cu situația în care $K < 2 \cdot K_0 \cdot S/S_2$, unde K_0 este constanta de repartiție cromatografică a analitului în coloană, S este secțiunea efectivă a fazei staționare în coloană, iar S_2 este secțiunea efectivă a diluentului dispus în faza staționară după extinderea la maxim a "dopului" de diluent.

Din datele experimentale ce urmează a fi detaliate, se observă că factorul de retenție aparent k_{app} depinde mai puțin de valoarea K , dependența sa funcțională în raport cu α fiind datorată termenului αk . În consecință, se poate considera că variația k_{app} cu α ($\partial k_{app} / \partial \alpha$) este preponderent influențată de factorul de extensie α al diluentului. Factorul de extensie al D este un parametru geometric și nu trebuie corelat cu nici un fenomen de repartiție cromatografică. El va depinde doar de forțele care intervin la interfața D/FS respectiv D/FM. Stabilizarea unui film de diluent de o anumită grosime la suprafața FS poate fi interpretată prin intermediul forțelor care apar la interfețe între filme subțiri (disjoining forces).

Date experimentale

S-a studiat efectul diluentului la injecția unui amestec multicomponent constituit din analiți caracterizați prin valori log P diferite. Studiul s-a efectuat pe o singură fază staționară, în condiții de debit și temperatură bine definite.

Soluții probă: Amestecul de separat conține următorii analiți: metil paraben (log P=1,96), etil paraben (log P=2,47), propil paraben (log P=3,04), butil paraben (log P=3,57), pentil paraben (log P=3,96), hexil paraben (log P=4,35) și octil paraben (log P=5,43). Soluțiile stoc au fost obținute prin diluția 1/20 din soluții 2000 $\mu\text{g/mL}$ în metanol (în cazul diluenților hexan, heptan și izooctan) sau acetat de etil (în cazul diluenților decan și dodecan). Diluenții enumerați sunt la rândul lor caracterizați prin următoarele valori log P: hexan – 3,90; heptan – 4,66; isooctan – 4,09; decan – 5,01; dodecan – 6,10. Soluțiile corespunzătoare volumelor de injecție mai mari de 1 μL se obțin prin diluția corespunzătoare a soluției stoc în diluentul dorit, în așa fel încât cantitatea de analit încărcată în coloană să fie întotdeauna 200 ng.

Volume injectate: 1, 5, 10, 20, 50, 75, 100 μL .

Coloană cromatografică: Zorbax SB- C18 , 5 cm x 4,6 mm i.d. x 1,8 μ m d.p., termostată la 25 °C.

Condiții cromatografice: Solventul A – apă de uz cromatografic; Solventul B – acetonitril; Eluție în condiții izocratice. Compoziția fazei mobile: Solvent A/Solvent B = 60/40 (v/v). Debitul a fost de 1,5 mL/min.

Detectie: DAD, lungime de undă analitică 254 nm.

Abordări concomitente: S-au determinat constantele de repartitie K ale analiților de interes, la distribuția acestora între heptan (ca diluent) și faza mobilă. Determinările s-au făcut prin metoda "pâlniei de separare", prin amestecarea de volume egale de diluent și fază mobilă. Analiții, existenți în diluent, au avut o concentrație inițială de 10 μ g/mL fiecare. Echilibrul de distribuție a fost considerat a fi obținut după o amestecare timp de 24 ore, la un mixer orizontal, cu o viteză de 500 rpm. Determinările cantitative s-au efectuat folosind metoda cromatografică prezentată, și calibrările adecvate. Bilanțul de masă determinat prin însumarea cantităților analizate în cele două faze după obținerea echilibrului de distribuție în raport cu cele inițiale s-au încadrat în intervalul 98,1 - 100,6%.

Analiții considerați au fost separați și în condițiile în care faza mobilă a fost în mod deliberat saturată cu heptan. Operația s-a realizat prin agitarea unei faze pre-amestecate apă/acetonitril 6/4 (v/v) cu heptan, timp de 24 ore, în raport volumetric 17/1. Analiții au fost injectați sub forma unor soluții în metanol (concentrație nominală individuală 1 mg/mL), volumul injectat fiind de 1 μ L. S-au realizat injecții succesive până la obținerea unei retenții stabile.

Pentru efectuarea unor investigații de natură termodinamică, solutul butil-paraben (dizolvat în heptan) a fost injectat în coloana cromatografică folosind volume crescătoare (20, 40, 60, 80 și 100 μ L), în condițiile în care temperatura procesului de separare a fost variată în intervalul 20-45 °C, cu increment de 5 °C. Ca referință, s-a injectat o soluție de analit în metanol (volum injectat 1 μ L) în condițiile de lucru specificate. Determinarea valorilor de entalpie și entropie standard aparente asociate procesului s-a realizat prin trasarea dependențelor funcționale van't Hoff ($\ln k_{app} = f(1/T)$).

Rezultate și discuții

Datele experimentale arată în mod explicit faptul că, indiferent de analit sau diluent, factorul de retenție aparent (k_{app}) scade odată cu creșterea volumului injectat, respectiv odată cu volumul de injecție redus (α). Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 1. Regresiile liniare în cauză au întotdeauna pante negative. De remarcat că indiferent de situație, coeficienții de corelație determinați sunt mai mari de 0,99.

Deoarece constantele de repartitie (K) ale analiților între heptan și faza mobilă au fost determinate experimental, în conformitate cu formalismul prezentat în raportul anterior dar și în articolul publicat în Analytical Methods, se pot calcula τ , lungimea maximă ocupată de zona de diluent (W) și lungimea de coloană rămasă disponibilă pentru procesul de separare cromatografică (L^{IIIb}). Datele sunt prezentate în Tabelul 2. Din Tabelul 2 se pot observa următoarele: **1.** τ ar trebui să constant, căci se referă doar la un anumit diluent introdus în sistemul cromatografic. Acest lucru se obține de altfel și experimental, dar fără a considera datele obținute pentru injecții de 1 și 5 μ L. Foarte probabil, astfel de volume de diluent injectate nu pot ocupa în manieră omogenă secțiunea coloanei cromatografice, rămânând astfel canale de curgere ale FM neocupate de acesta. Un astfel de proces ar trebui să aibă ca urmare o distorsionare a geometriei picului cromatografic, fapt confirmat și ilustrat în Figura 1. **2.** Injecția unui volum de diluent aproximativ egală cu 1/5 din volumul mort al coloanei, duce, în cazul heptanului, la ocuparea a ceva mai mult de jumătate din lungimea acesteia. În

consecință, datorită "scurtării" de fapt a coloanei cromatografice, eficiența picurilor cromatografice scade proporțional cu lungimea de coloană disponibilă pentru procesul de separare.

Tabelul 1. Observații experimentale privind scăderea liniară a factorului de retenție aparent (k_{app}) în funcție de volumul de injecție redus ($\alpha=V_{inj}/V_0$).

Diluent	Caracteristicile regresiei liniare $k_{app}=f(\alpha)$	Analiți						
		MeP	EtP	PrP	BuP	PeP	HeP	OcP
Hexan	Pantă	-2.387	-5.144	-10.912	-22.374	-45.845	-95.813	-392.974
	Ordonată la origine	1.26	2.33	4.57	9.06	18.00	35.88	131.34
	Coeficient de corelație	0.9976	0.9990	0.9995	0.9997	0.9997	0.9996	0.9991
Heptan	Pantă	-2.295	-5.045	-10.715	-21.925	-44.822	-93.271	-411.107
	Ordonată la origine	1.27	2.35	4.60	9.09	18.09	35.96	140.45
	Coeficient de corelație	0.9964	0.9984	0.9994	0.9996	0.9995	0.9996	0.9997
Iso-Octan	Pantă	-2.114	-4.796	-10.366	-21.387	-43.902	-92.047	-409.310
	Ordonată la origine	1.26	2.34	4.59	9.10	18.08	36.08	142.22
	Coeficient de corelație	0.9960	0.9987	0.9996	0.9999	0.9998	0.9998	0.9997
Decan	Pantă	-2.025	-4.970	-11.103	-23.005	-47.240	-99.732	-444.952
	Ordonată la origine	1.51	2.72	5.23	10.26	20.32	40.54	160.11
	Coeficient de corelație	0.9938	0.9984	0.9996	0.9999	0.9998	0.9997	0.9996
Dodecan	Pantă	-2.137	-5.102	-10.971	-22.113	-46.101	-97.501	-445.343
	Ordonată la origine	1.528	2.735	5.250	10.297	20.402	40.694	161.327
	Coeficient de corelație	0.9979	0.9997	0.9996	0.9998	0.9999	0.9999	0.9997

În Tabelul 3 sunt ilustrate comparativ date de eficiență asociată picurilor cromatografice, după cum urmează: N_{app} - eficiență aparentă, așa cum rezultă ea din experimentele de injecție de volume crescătoare de diluent în coloana cromatografică; N - eficiență rezultată în urma injecției de volume crescătoare de probă dizolvată în fază mobilă; N_{calc} - eficiență calculată plecând de la injecțiile de probă în fază mobilă, corectată cu lungimea efectivă a coloanei rămase disponibile pentru procesul cromatografic (L^{IIIb}/L) în cazul injecției de volume crescătoare de diluent nemiscibil (N.B. în această situație, N_{calc} ar trebui să fie similar cu N_{app}).

Din Tabelul 3, se pot observa următoarele: **1.** la injecția de volume crescătoare de probă dizolvată în fază mobilă, pentru analiții mai puțin reținuți în faza staționară, se observă o deteriorare a eficienței odată cu volumul injectat. Acest fapt se datorează incapacității fazei staționare de a focusa analiții pe durata injecției, deplasarea frontului fiind oarecum simultană cu încărcarea probei în coloana cromatografică; **2.** la injecția de volume crescătoare de diluent nemiscibil cu faza mobilă, pentru analiții mai puțin reținuți în faza staționară, deteriorarea eficienței este mai puțin evidentă (se obțin eficiențe sensibil mai bune decât în cazul injecției de volume mari de fază mobilă); **3.** prin compararea cu valorile calculate din datele de reducere a lungimii coloanei cromatografice disponibile separării, valorile aparente sunt mai mari. Aceasta înseamnă că extracția analiților din diluent către faza mobilă ajută la refocusarea frontului de analit; **4.** în cazul analiților puternic reținuți în faza staționară, injecția de volume crescătoare în fază mobilă nu deteriorează valorile de eficiență, datorită focusării acestora în faza staționară; **5.** valorile eficienței aparente, măsurate în condițiile injecției de volume crescătoare de diluent nemiscibil sunt mai mici decât cele obținute la injecțiile în fază

Tabelul 2. Calculul valorilor ι , W și L^{lib} , în cazul utilizării heptanului ca diluent. Valorile constantelor de distribuție diluent/faza mobilă (K) au fost determinate experimental. Volumul mort al coloanei (V_0) determinat experimental este 0.447 mL, iar volumul fazei staționare 0,1 mL (mărimă sugerată de producătorul coloanei cromatografice).

	V_{inj} (μ L)	α $\times 10^3$	k	k_{app}	K	K_0	K_0/K	ι	ι mediu	W (αL_i)	L^{lib} (mm)	L^{lib}/L
MeP	1	2.237	1.27	1.27	0.011	28.5	2537.6	-	M=2.0; s=0.13; RSD%=6.7	0.27	49.73	0.995
	5	11.186		1.25				-		1.35	48.65	0.973
	10	22.371		1.21				2.1		2.70	47.30	0.946
	20	44.743		1.16				2.0		5.39	44.61	0.892
	50	111.857		0.98				2.1		13.48	36.52	0.730
	100	223.714		0.77				1.8		26.96	23.04	0.461
EtP	1	2.237	2.34	2.35	0.028	52.4	1890.9	-	M=2.2; s=0.09; RSD%=4.2	0.27	49.73	0.995
	5	11.186		2.31				-		1.35	48.65	0.973
	10	22.371		2.23				2.1		2.70	47.30	0.946
	20	44.743		2.12				2.1		5.39	44.61	0.892
	50	111.857		1.74				2.3		13.48	36.52	0.730
	100	223.714		1.24				2.1		26.96	23.04	0.461
PrP	1	2.237	4.57	4.59	0.062	102.2	1661.3	-	M=2.3; s=0.11; RSD%=4.8	0.27	49.73	0.995
	5	11.186		4.50				-		1.35	48.65	0.973
	10	22.371		4.35				2.1		2.70	47.30	0.946
	20	44.743		4.12				2.2		5.39	44.61	0.892
	50	111.857		3.34				2.4		13.48	36.52	0.730
	100	223.714		2.23				2.3		26.96	23.04	0.461
BuP	1	2.237	9.04	9.06	0.144	202.3	1407.6	-	M=2.0; s=0.04; RSD%=1.9	0.27	49.73	0.995
	5	11.186		8.92				-		1.35	48.65	0.973
	10	22.371		8.57				2.3		2.70	47.30	0.946
	20	44.743		8.06				2.4		5.39	44.61	0.892
	50	111.857		6.59				2.4		13.48	36.52	0.730
	100	223.714		4.22				2.4		26.96	23.04	0.461
PeP	1	2.237	17.95	17.94	0.318	401.6	1262.5	-	M=2.4; s=0.11; RSD%=4.4	0.27	49.73	0.995
	5	11.186		17.81				-		1.35	48.65	0.973
	10	22.371		17.06				2.2		2.70	47.30	0.946
	20	44.743		15.98				2.5		5.39	44.61	0.892
	50	111.857		13.01				2.5		13.48	36.52	0.730
	100	223.714		8.11				2.5		26.96	23.04	0.461
HeP	1	2.237	35.81	35.69	0.690	801.1	1161.2	-	M=2.6; s=0.04; RSD%=1.5	0.27	49.73	0.995
	5	11.186		35.31				-		1.35	48.65	0.973
	10	22.371		33.79				2.5		2.70	47.30	0.946
	20	44.743		31.61				2.6		5.39	44.61	0.892
	50	111.857		25.32				2.6		13.48	36.52	0.730
	100	223.714		15.22				2.6		26.96	23.04	0.461
OcP	1	2.237	141.34	139.80	2.938	3161.9	1076.3	-	M=3.1; S=0.12; RSD%=3.8	0.27	49.73	0.995
	5	11.186		136.89				-		1.35	48.65	0.973
	10	22.371		131.38				3.2		2.70	47.30	0.946
	20	44.743		120.98				3.2		5.39	44.61	0.892
	50	111.857		93.47				3.0		13.48	36.52	0.730
	100	223.714		49.12				2.9		26.96	23.04	0.461

mobilă, dar rămân superioare valorilor calculate. Aparent, această situație este dificil de interpretat, atâta vreme cât extracția analiților hidrofobi din diluent de către faza mobilă polară este mai puțin favorizată (reinjecția analiților în capul coloanei cromatografice rămase disponibile pentru separare se face într-o perioadă mai lungă). În fapt, și de această dată refocusarea analiților în faza staționară este favorizantă și împiedică o pierdere exagerată de eficiență).

Tabelul 3. Privire comparativă asupra valorilor eficienței cromatografice asociate picurilor analiților de interes (eficiență aparentă pentru injecții de volume crescătoare de diluent nemiscibil cu faza mobilă - N_{app} ; eficiență pentru injecțiile de volume crescătoare de fază mobilă - N ; eficiență calculată din lungimea efectivă în care se realizează separarea cromatografică, la injecția de volume crescătoare de diluenți nemiscibili - N_{calc} ; diluentul utilizat a fost heptanul).

V_{inj}	L^{IIIb}/L	N	N_{app}	N_{calc}	N	N_{app}	N_{calc}	N	N_{app}	N_{calc}	N	N_{app}	N_{calc}
		MeP			EtP			PrP					
1	0.995	6988	7128	7092	7951	8845	8801	8711	9601	9553			
5	0.973	5602	5757	5602	7030	7569	7365	8037	8923	8682			
10	0.946	5087	5550	5250	6800	6944	6569	7785	8576	8113			
20	0.892	3860	5096	4546	5465	6972	6219	7003	7031	6272			
50	0.730	1541	4830	3526	2671	6113	4462	4514	6889	5029			
100	0.461	485	4577	2110	906	4817	2221	2071	4615	2128			
		BuP			PeP			HeP			OcP		
1	0.995	8596	9705	9656	8028	8790	8746	7042	7525	7487	5001	4353	4331
5	0.973	8181	9435	9180	7807	8468	8239	7206	7625	7419	5115	4542	4419
10	0.946	8050	8581	8118	7824	8001	7569	7066	6542	6189	5015	4326	4092
20	0.892	7744	7351	6557	7669	6593	5881	7077	5385	4803	4972	3647	3253
50	0.730	6627	6717	4903	7379	5945	4340	6939	5039	3678	5044	3458	2524
100	0.461	4289	3832	1767	6292	3327	1534	6609	2674	1233	5212	1413	651

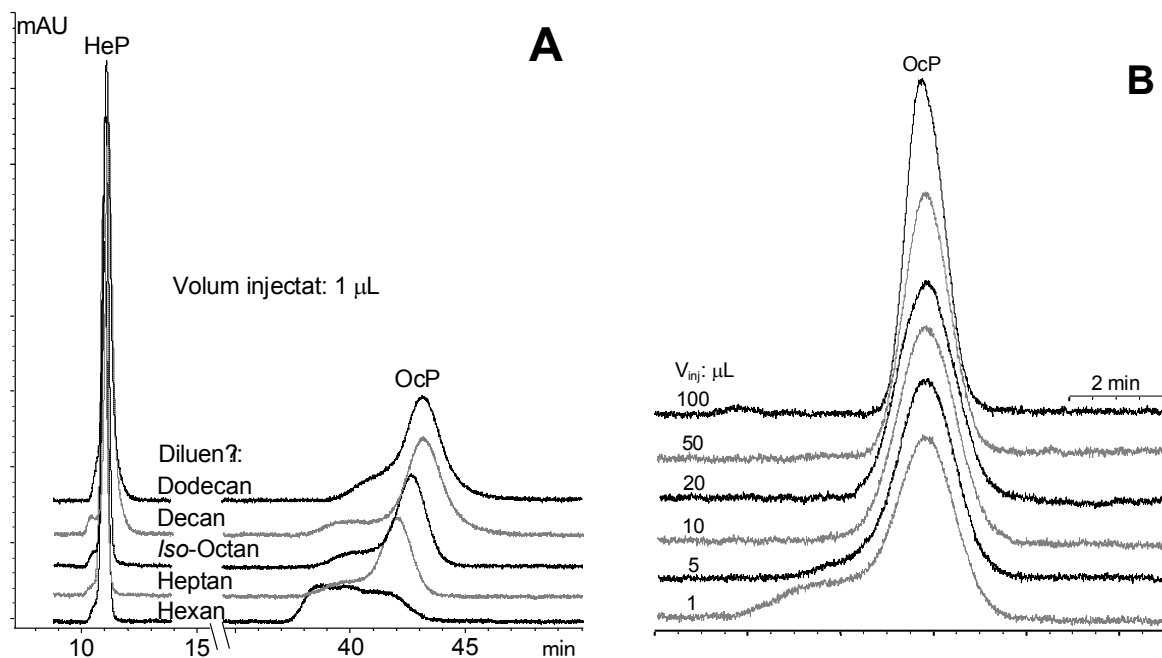


Figura 1. Distorsiunea picurilor de analit la injecția de volum mic de diluent nemiscibil, datorită ocupării neomogene a secțiunii de curgere în coloană de către diluent (A). Obținerea unei eficiențe și simetrii crescute a picului cromatografic la injecția de volume crescătoare de diluent nemiscibil cu faza mobilă (B).

Deși modelul matematic pleacă de la ipoteza simplificatoare că "dopul" de diluent nemiscibil nu se deplasează în coloana cromatografică, acest fapt este infirmat experimental. Așa cum poate fi observat în Figura 2 (monitorizată atât UV cât și RID) se poate observa că, după eluția ultimului analit, apare și frontul diluentului care s-a deplasat în coloana cromatografică (mult mai lent decât analiții de interes).

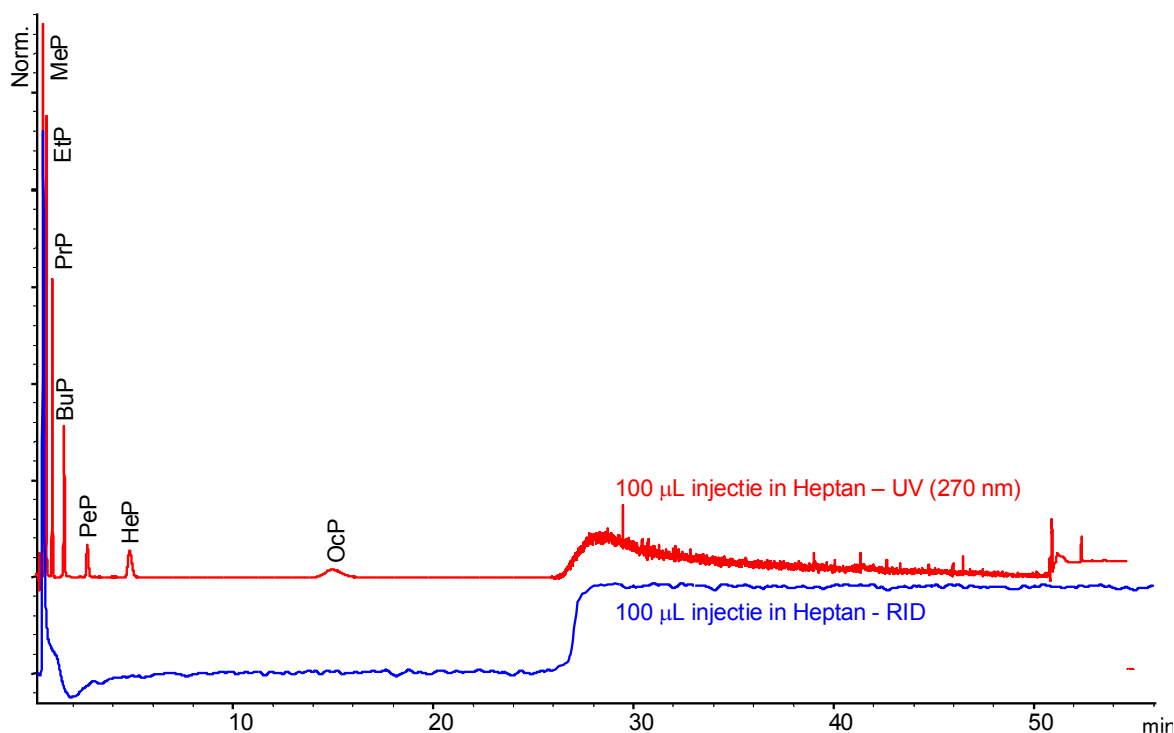


Figura 2. Monitorizarea simultană a cromatogramei în UV și RID, la injecția unui volum de 100 µL de heptan.

Plecând de la observația că "dopul" de diluent din capul coloanei cromatografice poate funcționa ca un saturator al fazei mobile în diluent, ne-am pus firesc întrebarea dacă nu cumva scăderea factorilor de retenție observată experimental nu se datorează în fapt saturării fazei mobile cu diluent. De aceea am recurs la studiul retenției analiților de interes în cazul utilizării unei faze mobile saturate în prealabil cu diluent (heptan). Rezultatele demersului experimental sunt prezentate în Figura 3.

Se poate observa că retenția scade continuu în condițiile saturării fazei mobile cu diluent. Echilibrul de repartitie al diluentului din faza mobilă către faza staționară (observat prin stabilizarea retenției analiților de interes) se obține după circa $800 \times V_0$. În mod evident, procesul de saturare a fazei mobile cu diluent nu poate influența procesul cromatografic pe durată scurtă, deci formalismul matematic dezvoltat pentru modelarea fenomenului rămâne valabil.

Trasarea dependențelor funcționale $\ln k = f(1/T)$ (reprezentare van't Hoff), în condițiile creșterii continue a volumului de diluent nemiscibil injectat, în comparație cu injecția de volum mic (1 µL) în metanol, a permis calculul valorilor de entalpie și entropie standard aparente asociate procesului. Valorile calculate sunt prezentate în Tabelul 4.

În mod surprinzător, dependențele funcționale van't Hoff sunt liniare, în ciuda faptului că la injecția de volume mari de diluent nemiscibil cu faza mobilă acționează două procese diferite (extractia lichid/lichid și separarea cromatografică).

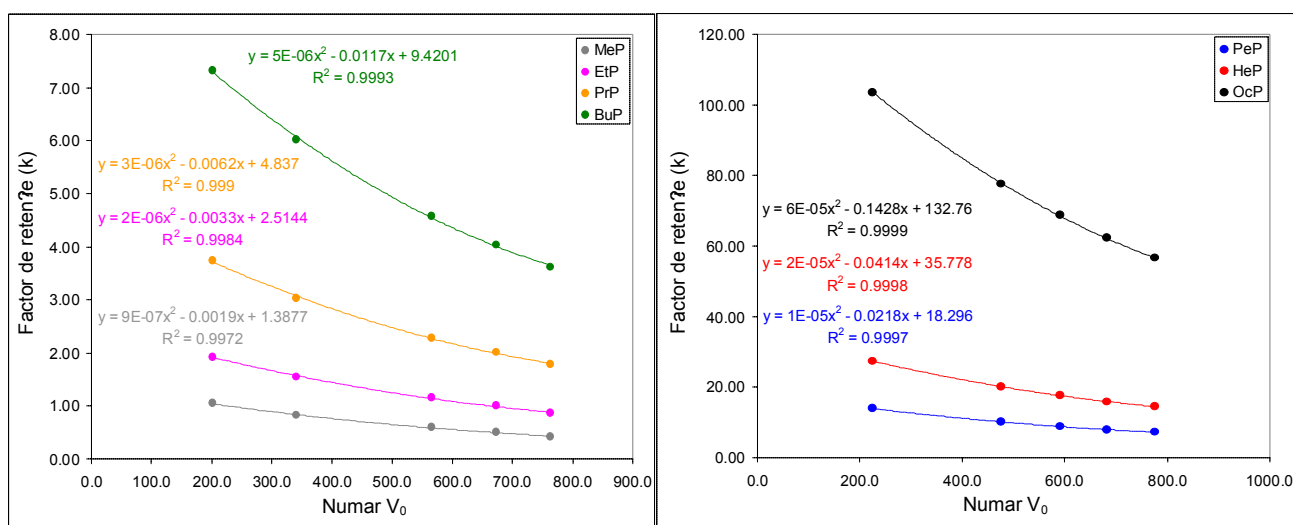


Figura 3. Variația retenției analiților de interes la utilizarea unei faze mobile saturate în diluent.

Valorile de entalpie standard aparentă (ΔH^0) variază de la -11.52 la -13.32 kJ la creșterea volumului injectat de la 20 la 100 μL . Entalpia standard aparentă (ΔS^0) variază și ea de la - 8.90 la -20.17 J K^{-1} , pentru aceeași variație a volumului de diluent nemiscibil injectat. Așa cum se poate observa din Figura 4, relația dintre ΔH^0 și ΔS^0 determinate la diverse volume injectate este una liniară, fapt explicat prin procesul de compensare entalpie/entropie. Dacă în dependența liniară din Figura 4 se adaugă și punctul determinat de valorile ΔH^0 și ΔS^0 obținute la injecția a 1 μL de probă în metanol (procesul de extracție diluent/fază mobilă lipsește), se poate lesne observa că liniaritatea rezultată se deteriorează. Se poate astfel demonstra că injecția de volume mari în diluenți nemiscibili se bazează pe două procese distincte: extracția analiților din diluent de către faza mobilă și procesul cromatografic de separare. Deoarece ambele procese au la bază interacții similare (bazate pe similaritatea/disimilaritatea caracterului hidrofoab), relațiile funcționale van't Hoff își păstrează aspectul liniar.

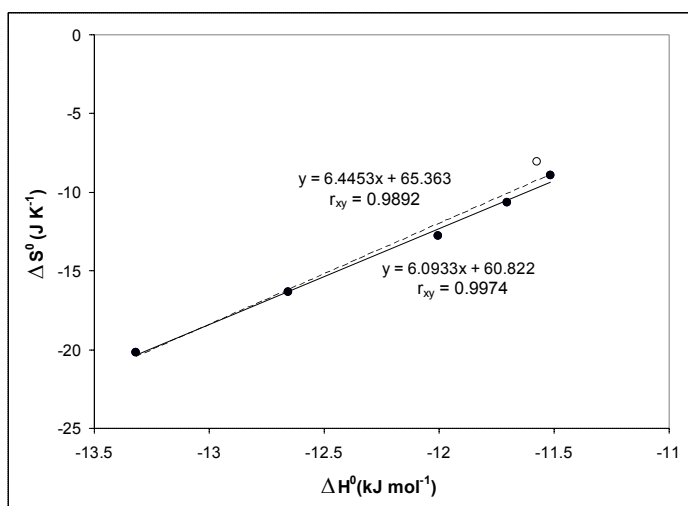


Figura 4. Reprezentarea grafică a efectului de compensare entalpie/entropie observată la injecția de volume crescătoare de probă în diluenți nemiscibili cu faza mobilă.

Tabelul 4. Date termodinamice calculate din dependențele funcționale van't Hoff, la injecția de volume crescătoare de diluent nemiscibil cu faza mobilă.

V_{inj} (μL)	Diluent	$\ln k$	T ($^{\circ}\text{C}$)	$1/T$ (K^{-1})	B^*	A^{**}	r_{xy}^{***}	ΔH^0 (kJ)	ΔS^0 (JK^{-1})	ΔG^0
1	MeOH	2.28	20	0.003411	1391.98	-2.4680	0.9972	-11.57	-8.07	-9.21
		2.20	25	0.003354						-9.17
		2.13	30	0.003299						-9.13
		2.05	35	0.003245						-9.09
		1.96	40	0.003193						-9.05
		1.92	45	0.003143						-9.01
20	Heptan	2.15	20	0.003411	1385.08	-2.5681	0.9990	-11.52	-8.90	-8.91
		2.08	25	0.003354						-8.86
		2.01	30	0.003299						-8.82
		1.93	35	0.003245						-8.77
		1.85	40	0.003193						-8.73
		1.78	45	0.003143						-8.68
40	Heptan	2.02	20	0.003411	1407.81	-2.7765	0.9994	-11.71	-10.64	-8.59
		1.95	25	0.003354						-8.53
		1.87	30	0.003299						-8.48
		1.79	35	0.003245						-8.43
		1.72	40	0.003193						-8.37
		1.64	45	0.003143						-8.32
60	Heptan	1.89	20	0.003411	1443.71	-3.0312	0.9998	-12.00	-12.75	-8.27
		1.81	25	0.003354						-8.20
		1.73	30	0.003299						-8.14
		1.66	35	0.003245						-8.07
		1.58	40	0.003193						-8.01
		1.50	45	0.003143						-7.95
80	Heptan	1.73	20	0.003411	1522.24	-3.4613	0.9999	-12.66	-16.33	-7.87
		1.64	25	0.003354						-9.17
		1.56	30	0.003299						-9.13
		1.48	35	0.003245						-9.09
		1.40	40	0.003193						-9.05
		1.32	45	0.003143						-9.01
100	Heptan	1.54	20	0.003411	1601.70	-3.9236	0.9936	-13.32	-20.17	-7.40
		1.44	25	0.003354						-7.30
		1.34	30	0.003299						-7.20
		1.31	35	0.003245						-7.10
		1.18	40	0.003193						-7.00
		1.11	45	0.003143						-6.90

* panta regresiei liniare $\ln k = f(1/T)$;

** ordonata la origine a regresiei liniare $\ln k = f(1/T)$;

*** coeficientul de corelație a regresiei liniare $\ln k = f(1/T)$;

În final, ne-am pus problema în ce măsură gradul de variație al factorului de retenție cu volumul injectat ($\partial k_{app}/\partial \alpha$) observat în cazul proceselor de injecție de volume progresiv crescătoare de diluenți nemiscibili cu faza mobilă nu poate fi cumva corelat cu caracterul de

hidrofobicitate al analitului, exprimat de valoarea logaritmului constantei de distribuție între n-octanol și apă ($\log K_{ow}$ sau $\log P$). Așa cum se poate observa din Figura 5, între valorile $\log (\partial k_{app} / \partial \alpha)$ și $\log K_{ow}$ determinate pentru analiții luați în lucru (seria alchil parabenilor), se stabilește o relație liniară caracterizată printr-o valoare a coeficientului de corelație foarte apropiată de valoarea 1 (mai precis 0,9998).

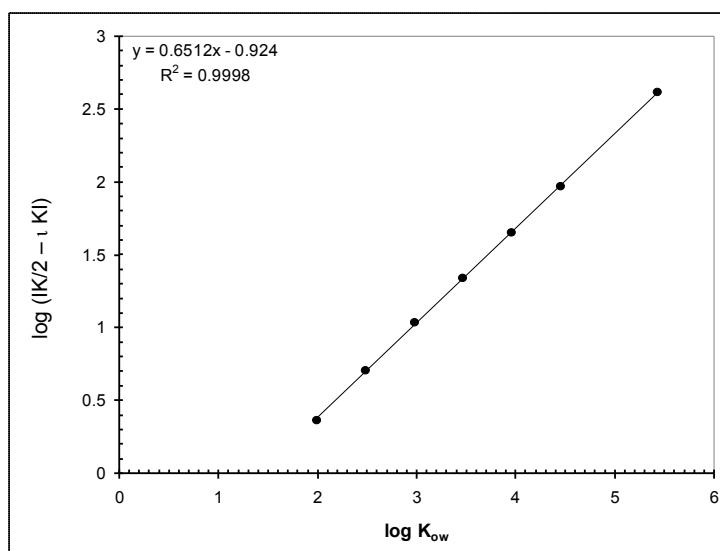


Figura 5. Reprezentarea grafică a corelației dintre $\log K_{ow}$ a analiților investigați în prezentul studiu și logaritmul reducerii progresive a retenției aparente odată cu creșterea volumului de diluent nemiscibil injectat în coloana cromatografică ($\partial k_{app} / \partial \alpha$).

În consecință, $\log (\partial k_{app} / \partial \alpha)$ poate fi considerat un descriptor al hidrofobității moleculare, iar procesul de injecție de volume mari a diluenților nemiscibili cu faza mobilă poate fi considerat un proces care permite estimarea caracterului hidrofob al analiților considerați.

Concluzii

În perioada Noiembrie 2013 - Decembrie 2014, echipa proiectului a realizat 4 articole publicate sau acceptate pentru publicare în reviste cotate ISI, după cum urmează:

1. V. David, M. Cheregi, A. Medvedovici, Alternative sample diluents in bioanalytical LC/MS, *Bioanalysis*, 5(24) (2013) 3051-3061. I.F.=3.027
2. A. Medvedovici, F. Albu, R.-D. Nașcu Briciu, C. Sârbu, Fuzzy clustering evaluation of the discrimination power of UV-Vis and (+/-)ESI-MS detection systems in individual of coupled RPLC characterization of Ginkgo Biloba extracts, *Talanta*, 119 (2014) 524-532. I.F.=3.511
3. P. Lazăr, S. Udrescu, F. Tache, F. Albu, N. Grinberg, A. Medvedovici, Revisiting large volume injection in non-miscible diluents: an on-line reversed phase supported liquid extraction / liquid chromatography scenario, *Analytical Methods*, (2014) DOI:10.1039/c4ay02332c. I.F.=1.938
4. E.E. Iorgulescu, F. Albu, F. Tache, A. Medvedovici, On the HPLC/MS-MS of

ephedrine in urine: an experimental appraisal, Revue Roumaine de Chimie, acceptat pentru publicare în numărul omagial dedicat Prof. Dr. Candin Liteanu. I.F.=0.393

Rezultatele prezentate în publicații enumerate mai sus corespund următoarelor obiective (O) și activități (A) ale proiectului:

Publicația 1. O6/A1;

Publicația 2. O6/A4;

Publicația 3. O2/A1; O3/A1,A2,A3; O5/A1;

Publicația 4. O6/A1.

Diseminarea rezultatelor obținute prin derularea proiectului s-a efectuat și prin prezentarea unor conferințe plenare în cadrul următoarelor simpozioane:

Simpozion 1. Chimia 2014 - New trends in applied chemistry, 23-24 Mai 2014, Constanța - România (simpozion internațional); conferință plenară: On-line reversed phase supported liquid extraction (RP-SLE) as a basic scenario for explaining large volume injection (LVI) of immiscible diluents in RPLC (A. Medvedovici, P. Lazăr), Book of Abstracts: PL3 - pg. 14.

Simpozion 2. 2nd International Conference on Analytical Chemistry RO-ICAC' 2014 - Analytical Chemistry for a better life, 17-21 Septembrie 2014, Târgoviște - România; conferință plenară: Hydrophobicity descriptors resulting from bimodal liquid chromatographic behavior (A. Medvedovici), Book of Abstracts: PL_08 - pg. 50.

Simpozion 3. Micro-simpozion dedicat comemorării a 100 ani de la nașterea Prof. Dr. Candin Liteanu, 11 Septembrie 2014, Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, România; Actual aspects in separation sciences (A. Medvedovici).

Publicațiile și conferințele plenare amintite anterior contribuie și la Obiectivul 7 al proiectului, privitor la diseminarea rezultatelor cercetării. Publicațiile de mai sus includ la secțiunea Acknowledgements referirea la grantul de cercetare în derulare. Prezentările Power Point ale conferințelor plenare amintite conțin la ultimul slide referirea la grantul de cercetare în derulare.

Publicațiile (pagina 1 și pagina conținând secțiunea Acknowledgements sau acceptul pentru publicare) au fost postate pe site-ul proiectului <http://www.chimie.unibuc.ro/cercetare/analitica/web%20Med.pdf>. Prezentările la conferințele menționate au fost postate pe același site, în integralitate.

Gestionarea și actualizarea permanentă a site-ului proiectului răspunde în egală măsură Obiectivului 8.

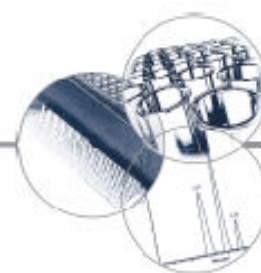
Datele obținute, manuscrisele publicate (sau acceptate pentru publicare) și conferințele plenare prin care s-au diseminat rezultatele, sunt conforme și cu obiectivele, respectiv activitățile redistribuite în urma modificării duratei proiectului (Anexa IV la contractul de finanțare nr. 310/2011).

Director de proiect,
Profesor Dr. Andrei Valentin Medvedovici,



Adresa directorului de proiect:

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



Alternative sample diluents in bioanalytical LC–MS

The problem of sample diluent in bioanalytical LC–MS is reviewed with a special focus on large-volume injections and non-miscible solvents with mobile phase components. These issues are related to the sample preparation approach, which in many instances provides the sample diluent before injecting this into the chromatographic column. The sample volume influences the quantitation limit of the chromatographic method, while its nature may influence the retention process of the injected analytes. The literature reports a few papers that are focused on alternative sample diluents in bioanalytical LC–MS that are generally non-miscible with mobile phase. The principle of this approach and some of its current bioanalytical applications from literature are discussed. However, more applications and more publications from HPLC users and vendors are expected in this field, which could prove its analytical importance and potential in bioanalysis.

LC–MS is nowadays the most utilized analytical technique in bioanalysis due to its sensitivity and better control of the selective determination of many species in biological matrices.

The current available LC with mass-spectrometric detection instrumentation, with low or high resolution, has become the method of choice in small-molecule drug bioanalysis (molecular mass less than 800 Da) and is also increasingly being applied as an alternative to ligand-binding assays for the bioanalytical determination of biopharmaceuticals [1]. The trend of eliminating 'old' detection approaches in HPLC techniques in favor of MS can easily be seen in the content of many papers from specialized journals such as *Journal of Chromatography B*, *Biomedical Chromatography*, *Bioanalysis* and *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. On the other hand, the introduction of a new generation of HPLC instruments (namely, UHPLC) that surpasses the pressure limitation of conventional equipment (400 bar) and that are capable of achieving LC separations at back-pressures up to approximately 1000 bar are now commercialized. This technology is based on small particle size (up to 2 μm) as the stationary phase material, which allows high-throughput methods for bioanalytical purposes to be developed [2].

However, the quality of analytical data is highly influenced not only by the analytical instrument used to analyze more or less number of samples, but also by the correctness and the approach of carrying out the **sample preparation** [3]. The main task of this step is to

make the samples of biological origin amenable to the HPLC–MS analysis, or to improve its analytical performances.

The importance of sample preparation methods as the first stage in any bioanalytical procedure is well known, and this also influences the performances of the chromatographic process and MS detection [3–5]. This step is mainly focused on the isolation, enrichment or structure modification of target analyte(s) using different types of LLE, SPE, solid-phase microextraction, matrix precipitation or derivatization. The final sample, before injection into the LC–MS system, can be discussed by analyte concentration factor, interferences retained into the sample, and sample solvent [6]. The solvent (diluent) of the final sample should exhibit a high solubility for target analytes, and be appropriate to both LC separation and MS detection [7,8]. It can also be discussed according to its miscibility with the mobile phase, and especially by its amount (volume) injected into the head of analytical column, which in turn influences the LOQ of chromatographic method [9,10]. The nature of stationary phase and column dimension are also important from this point of view. In some special cases, stability of target analytes is also an important issue related to the **sample diluent** and its injection into the column [11]. This Review emphasizes the importance of the injection diluent in LC–MS and new alternative solvents that can be used in this analysis, which are reported in literature. The injected sample amount and its solvent nature are two items that are discussed in this Review.

Victor David*, Mihaela Cheregi & Andrei Medvedevici

University of Bucharest, Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, Sos. Panduri no. 90, Bucharest 050663, Romania
*Author for correspondence:
E-mail: vict_david@yahoo.com

**FUTURE
SCIENCE** part of **fsg**

Key Term

Green solvents: Solvents that have a minimum impact on environment.

'Green' solvents used as sample diluents

Organic solvents that can be considered as 'green solvents' are desirable in practice because they avoid toxicity and environment problems [51,52], although there is serious debate on how green property can be measured [53]. They have rarely been used for analytical purposes due to the specific conditions allowed for non-miscible solvents: extraction yield, selectivity and cost. Among them, many of the ionic liquids are considered as green extraction solvents, although they are mostly used as synthesis solvents rather than solvents for analytical purposes [54]. A useful and green method for the extraction of fats and oils from biological matrices is Soxhlet extraction using d-limonene as the biosolvent, or green solvent, instead of n-hexane (petroleum solvent) [55]. Starting from this information, according to which limonene can be used as a green solvent, a study was recently focused on its potential in application to LLE-based separation of simvastatin, lovastatin, and their hydroxyacid metabolites from human plasma samples, followed by direct injection of samples [56]. In this study, it was shown that extraction of hydrophobic compounds from biological matrices with limonene is, in principle, possible, and high-volume injection of aliquots from this hydrophobic solvent can be directly injected into the chromatographic column. In this way, the problems related to the toxic character of the classic solvents and unpleasant working conditions for the analyst are overcome by this solvent, which is less volatile than lower hydrocarbon solvents. The possibility of 'greening' the sample preparation is not only a new trend in bioanalysis, but it is also necessary, mainly when large number of samples must be analyzed.

Substitution of acetonitrile as organic modifier in mobile phases for RPLC with mixtures of propylene carbonate and ethanol has been proposed as 'greener' for chromatographic applications. Of note, these additives in mobile phase proved not to significantly modify the chromatographic performance, such as the elution order, retention time, peak efficiency or symmetry, in several LC mechanisms such as RP, ion pairing and HILIC [57]. Moreover, the effect of this replacement of acetonitrile with mixture of propylene carbonate and ethanol seems not to influence the analyte detectability by UV-vis or MS. The advantages of replacing acetonitrile with propylene carbonate and ethanol mixture in RPLC for bioanalytical purposes has been shown in a recent study assaying enalapril and enalaprilat in human plasma [58].

Conclusion

Various sample diluents can be used in LC depending on the retention mechanism of the chromatographic process. They must solve the problem of solubility of analytes and not disturb the elution process. For this reason, whatever the solvent is, the injection volume must be small, up to 5–10 µl. For larger volume injection, the sample diluent must be in the mobile phase or a very similar solvent. To date, only a few alternative sample diluents are known for bioanalytical purposes. In RPLC some papers report that hydrophobic solvents can be successfully used in LLE, followed by high-volume injection of the organic phase. In this way, the tedious operations given by organic layer prelevation, solvent evaporation, and residue redissolution in a small volume of mobile phase as sample diluent are avoided. The utilization of such solvents in large-scale studies for bioequivalence purposes proved that they represent a very good solution for simplification of sample preparation, and we expect to see in the near future many studies from HPLC users and vendors relying on this approach, as well as new organic diluents being studied for sample injection. If they fulfill environmentally friendly conditions, this will be another huge advantage for bioanalysis and LC.

Future perspective

Due to the continuous demand for sample preparation to be simplified for bioanalysis, a focus on alternative diluents in LC-MS is expected to be of great interest. Direct injection of the organic phase resulting from LLE or SPE in the chromatographic column will improve some analytical parameters, such as time, precision and detection limit. There will be permanent interest in organic solvents that fulfill the conditions imposed by green chemistry. Due to its importance in separation of very polar compounds, HILIC will be extensively studied from the sample diluent point of view.

Financial & competing interests disclosure

The authors acknowledge the financial support given by the Romanian Agency UEFISCDI, through the grant PNII-ID-PCE-2011, 3-0152/C, no. 310/2011. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.



Fuzzy clustering evaluation of the discrimination power of UV–Vis and (±) ESI-MS detection system in individual or coupled RPLC for characterization of *Ginkgo Biloba* standardized extracts



Andrei Medvedovici^{a,b}, Florin Albu^{a,b}, Rodica Domnica Nașcu-Briciu^c, Costel Sârbu^{c,*}

^a University of Bucharest, Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, Pinduri Ave., No. 90, Bucharest 050663, Romania

^b Bioanalytical Laboratory, SC Labomed Pharma SA, No. 448, Th. Pallady Blvd., Bucharest 032265, Romania

^c Babes-Bolyai University, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Department of Chemistry, Arany Janos Street, No. 11, Cluj-Napoca 400028, Romania

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 August 2013

Received in revised form

6 November 2013

Accepted 9 November 2013

Available online 27 November 2013

Keywords:

Ginkgo Biloba standardized extracts

Fuzzy hierarchical clustering

Principal components analysis

Cluster analysis

HPLC/UV/ESI-MS

ABSTRACT

Aim: Discrimination power evaluation of UV–Vis and (±) electrospray ionization/mass spectrometric techniques, (ESI-MS) individually considered or coupled as detectors to reversed phase liquid chromatography (RPLC) in the characterization of *Ginkgo Biloba* standardized extracts, is used in herbal medicines and/or dietary supplements with the help of Fuzzy hierarchical clustering (FHC).

Experimental: Seventeen batches of *Ginkgo Biloba* commercially available standardized extracts from seven manufacturers were measured during experiments. All extracts were within the criteria of the official monograph dedicated to dried refined and quantified *Ginkgo* extracts, in the European Pharmacopoeia. UV–Vis and (±) ESI-MS spectra of the bulk standardized extracts in methanol were acquired. Additionally, an RPLC separation based on a simple gradient elution profile was applied to the standardized extracts. Detection was made through monitoring UV absorption at 220 nm wavelength or the total ion current (TIC) produced through (±) ESI-MS analysis. FHC was applied to raw, centered and scaled data sets, for evaluating the discrimination power of the method with respect to the origins of the extracts and to the batch to batch variability.

Results: The discrimination power increases with the increase of the intrinsic selectivity of the spectral technique being used: UV–Vis < MS(–) < MS(+), but it is strongly sensitive to chemometric transformation of data. Comparison with cluster analysis (CA) and principal components analysis (PCA) indicates that the FHC algorithm produces better classification. However, PCA and CA may be successfully applied to discriminate between the manufacturing sources of the standardized extracts, and at some extent, to monitor the inter-batch variability. Although the chromatographic dimension sensibly contributes to the discrimination power, spectral MS data may be used as the lone powerful holistic alternative in characterization of standardized *Ginkgo Biloba* extracts.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nowadays fingerprinting and pattern recognition algorithms represent valuable tools for the characterization of the complex

chemical mixtures of natural origins, with promising results in various application fields such as food [1,2], beverages [3,4], agriculture [5,6], chemotaxonomy [7,8], herbal medicines [9], dietary supplements [10,11], metabolic profiling [12–14], environmental [15,16] and standardization [17]. The European Medicines Agency [18] recommends that the appropriate fingerprinting procedures should be based on chromatographic techniques. However, other techniques, such as the spectral ones, may lead to interesting and useful results [19] as the US Food and Drug Administration [20] recommends.

Evolution of fingerprinting procedures during the last decade has been supported by the application of powerful and advanced chemometric methods, among which principal component analysis (PCA), partial least squares (PLS), cluster analysis (CA), linear discriminant analysis (LDA) and artificial neural networks (ANN)

Abbreviations: ANN, artificial neural network; a.m.u., atomic mass unit; CA, cluster analysis; DAD, diode array detection; (±) ESI, positive/negative electrospray ion source; FHC, Fuzzy hierarchical clustering; HPLC, high pressure liquid chromatography; IBI, Bagley–Jain Index; LDA, linear discriminant analysis; mAU, milli-absorption unit; MS, mass spectrometry; PCA, principal components analysis; PCN, normalized partition coefficient; PEN, normalized partition entropy; PLS, partial least squares; RAM, random access memory; RPLC, reversed phase liquid chromatography; TIC, total ion current; TOC, total organic carbon; UV–Vis, ultra-violet and visible.

* Corresponding author. Tel.: +40 264 593833; fax: +40 264 590838.

E-mail address: csarbu@chem.ubbcluj.ro (C. Sârbu).

comparing to RPLC/(+)MS data. This remains valid for both raw and scaled values.

For informational purpose, projection of all samples in the space defined by the membership degrees to various clusters obtained from raw and scaled data sets is presented in the Supplementary material: Parts D and E, respectively. According to the technique of investigation, classification power varies for raw data in the order $UV < RPLC/(-)MS < RPLC/UV < (-)MS < RPLC/(+)MS \approx (+)MS$, while for the scaled data the succession differs slightly: $UV \approx RPLC/(-)MS \approx RPLC/(+)MS < RPLC/UV < (-)MS < (+)MS$.

3.3. Comparison of FHC to PCA and CA results

The discrimination power provided by FHC may be also evaluated through comparison to results produced by the common classification methods, more specifically PCA and CA. The PCA eigenvalues enlisted in Table 3 confirmed the FHC results, meaning that the hyphenation of MS to RPLC substantially favors discrimination power between samples.

Both processing algorithms behave similarly on the given data sets. Figs. 4 and 5 contain classifications produced through application of PCA and CA, respectively.

Both PCA and CA produced isolation of manufacturer A against the others when considering all data sets, except those originating from $(-)MS$ and UV techniques. Exactly the same situation could be observed on grouping manufacturers C–F against A and B. Manufacturer B was identified based on data provided by all techniques when processed by PCA. Under CA processing algorithm, RPLC/UV and UV taken individually failed to discriminate between manufacturer B and the other ones. Succession within manufacturer's B batches was obtained only with PCA and CA, based on RPLC/(+)MS data set. Exclusion of the RPLC dimension made processing procedures insensitive to the batch production order.

PCA and CA did not allow identification of manufacturers E and F, as individual batches. PCA and CA failed also to classify manufacturers C and D, each containing two batches. Under PCA processing conditions the classification power varied in the order $UV < (-)MS < (+)MS \approx RPLC/UV < RPLC/(-)MS < RPLC/(+)MS$. The order is slightly modified when data were treated through the CA algorithm: $UV < (-)MS < RPLC/UV < (+)MS < RPLC/(-)MS < RPLC/(+)MS$.

4. Conclusions

It appeared from the experimental approach that batch to batch discrimination may be achieved only through RPLC/(+)MS and FHC or CA analysis of data. Manufacturers A and B were easily identified by either HPLC/MS or MS approaches. With respect to the ability of discrimination between manufacturers C–F, the FHC approach is more powerful compared to PCA and CA. Data interpretation through PCA allowed the lower classification power against the used chemometric treatments. Within the FHC treatment, processing of raw and centered data produced similar classifications, while scaling data induced a negative effect on the discrimination capacity that derived from their gathering tendency.

As expected, the raw intrinsic information produced by the analytical investigation technique of samples plays an important role in tuning the discrimination power. The chromatographic dimension was necessary to observe the batch to batch variability. However, the chromatographic separation does not add significant insights with respect to manufacturer's identification. The holistic comparison of the classification ability of the analytical techniques used during the present work results in the following ranking order: $UV < RPLC/UV < (-)MS < RPLC/(-)MS < (+)MS < RPLC/(+)MS$. This hierarchy seems difficult to interpret at a first sight, as long as the number of

peaks in chromatograms is relatively the same irrespective to the detection system that was used, while signals in the $(+)(-)$ mass spectra are identical. The last position occupied by the UV spectrometry can be easily explained, since differences between samples are based on relatively small shifts of the three or four existing absorption bands. The ability of the MS spectral investigation modes to overcome UV is also obvious. The selectivity induced by the RPLC separation is balanced by the ionization characteristics of the ESI and the intrinsic sensitivity of the MS detection. Compounds in samples simultaneously ionize and the mild ionization technique seriously limits the fragmentation of the produced molecular ions. This results in a limited overlapping of signals in the resulting spectra, while conserving the ability to consider most of the components from the complex mixture, including minor ones. Thus, the mass spectra become perfect carriers of subtle differences and the discrimination ability increases. The superiority of $(+)MS$ over $(-)MS$ in detection is far more difficult to explain since negative ionization generally occurs more selectively compared to the positive one. However, one should consider that the composition of the mobile phase was optimized for positive ionization. Consequently, $(-)MS$ spectra exhibit signals having at least one order of magnitude lower intensity compared to $(+)MS$ ones, and the ability of observing minor components decreases. The increased sensitivity in the positive ionization mode accounts for a specific pattern added particularly by these minor compounds in the samples and largely contributes to the increase of the differentiation ability.

Acknowledgments

This work was possible with the financial support offered by the Romanian Ministry of Education, Research, Youth and Sport through research Grants PN-II-ID-PCE-2011-3-152 and PN-II-ID-PCE-2011-3-0366.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.035>.

References

- [1] L.A. Benetta, R.M. Alonso-Salces, K. Héberger, *J. Chromatogr. A* 1158 (2007) 196–214.
- [2] M. Peris, L. Escuder-Gilabert, *Anal. Chim. Acta* 638 (2009) 1–15.
- [3] P. Ciosek, W. Wtobielewski, *Talanta* 71 (2007) 738–746.
- [4] A. de Villiers, P. Alberts, A.C.J. Tredoux, H.H. Nieuwoudt, *Anal. Chim. Acta* 750 (2012) 2–23.
- [5] Y. Huang, Y. Ian, S.J. Thomson, A. Rang, W.C. Hoffmann, R.E. Lacey, *Comput. Electron. Agr.* 71 (2010) 107–127.
- [6] K. Villier, K. Steppe, D.J.W. De Pauw, *Biosyst. Eng.* 103 (2009) 23–34.
- [7] J.T. Fischelick, A. Hazekamp, T. Ekelens, V.H. Choi, R. Verpoorte, *Phytochemistry* 71 (2010) 2058–2073.
- [8] S. Dussert, A. Laffargue, A. de Kochko, T. Joët, *Phytochemistry* 69 (2008) 2950–2960.
- [9] C. Tistaert, B. Dejaegher, Y.V. Heyden, *Anal. Chim. Acta* 690 (2011) 148–161.
- [10] A. Lanzarotta, J.B. Crowe, M. Witkowski, B.M. Gamble, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 67 and 68 (2012) 22–27.
- [11] A.B. Champagne, K.V. Emmel, *Vib. Spectrosc.* 55 (2011) 216–223.
- [12] D.S. Wishart, *Trends Food Sci. Technol.* 19 (2008) 482–493.
- [13] K.H. Liland, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 827–841.
- [14] I. García-Pérez, M. Vallejo, A. García, C. Legido-Quigley, C. Barbas, *J. Chromatogr. A* 1204 (2008) 130–139.
- [15] A. Hildebrandt, M. Guzmán, S. Lacorte, R. Tauler, D. Baez, *Water Res.* 42 (2008) 3315–3326.
- [16] R.L. Olsen, R.W. Chappell, J.C. Loftis, *Water Res.* 46 (2012) 3130–3122.
- [17] J. Sarambaud, R. Pinto, D.N. Rutledge, M. Reinberg, *Anal. Chim. Acta* 603 (2007) 147–154.
- [18] European Medicines Agency, Note for guidance on quality of herbal medicinal products, London, 2001, p. 6. (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003370.pdf) (accessed 27.02.2013 US).

Revisiting large volume injection in non-miscible diluents: an on-line reversed phase supported liquid extraction/liquid chromatography scenario†

Paul Lazăr,^a Ștefan Udrescu,^a Florentin Tache,^a Florin Albu,^{a,b} Nelu Grinberg^c and Andrei Medvedovici^{a*}

According to some recently published studies, large volume injection (LVI) of diluents immiscible with the eluents used in reversed phase liquid chromatography (RPLC) appears to be feasible, despite the widely accepted rules governing injection related phenomena. The process was previously described and was successfully applied in practice. The present study describes a simple theoretical model explaining LVI of diluents immiscible with the mobile phase in RPLC; the model relies on the on-line coupling of reversed phase supported liquid extraction (RP-SLE) to the chromatographic separation. The compliance of the theoretical model with experimental observations was tested by using data collected for LVI of a homologous series of *para*-hydroxy alkyl benzoates (methyl, ethyl, propyl, butyl, pentyl, hexyl and octyl congeners) in liquid alkanes (hexane, heptane, iso-octane, decane and dodecane). The SP consisted of an octadecyl chemically modified silica gel eluted with a mixture of acetonitrile:water 4:6 (v/v). Although the model mainly focuses on explaining the linear reduction of the retention time with the injected volume, some aspects relating to zone spreading and thermodynamic aspects are also discussed.

Received 2nd October 2014
Accepted 19th November 2014

DOI: 10.1039/c4ay02332c
www.rsc.org/methods

1. Introduction

Large Volume Injection (LVI) in chromatography relates to the continuous challenge of increasing method sensitivity.^{1,2} Injection phenomena arising in liquid chromatography (LC) were extensively studied with respect to the strength^{3–7} and viscosity^{8–10} of the sample diluent (D) and their recurrent impact on the chromatographic parameters illustrating retention, band spread, and peak shape. The injection produces a thermodynamic disturbance in the chromatographic system. Column loadability in a LVI complex phenomenon depends directly on its intrinsic characteristics (length, internal diameter, particle size, and phase ratio), mobile phase (MP) composition and elution conditions, D characteristics, and the specific properties of the analytes (A). LC injection phenomena should be also considered in a close relationship with the widely applied sample preparation methods, primarily delivering the target compounds in a wide variety of organic solvents.¹¹ Moreover, removal of solvents producing unwanted phenomena in LC and

their replacement by adequate ones strongly impacts on the characteristics of the sample preparation approaches and directly influences the overall accuracy and precision.

The possibility of using D immiscible with the MP in RPLC was already demonstrated.^{12–14} The process was successfully applied in the pharmaceutical field^{15–19} and in bioanalysis.^{20–24} Injection in immiscible D was also used for estimation of the hydrophobic characteristics of a series of pharmaceutical compounds.²⁵ However, determination of the retention corresponding to a hypothetical condition assuming the absence of the D is more related to the intrinsic behavior of the analyte in the chromatographic column, rather than an illustration of injection related phenomena.

The possibility of introduction in the chromatographic column of large volumes of samples in immiscible D to the MP was explained through the competition equilibria between the analyte and the D molecules for the adsorption sites in the stationary phase (SP).¹² Consequently, the process becomes experimentally possible, without affecting peak shapes, if the affinity of the D for the SP is higher than that of the analyte. As a direct consequence, a part of the SP in the column's head becomes unavailable for the compounds contained in the sample, their retention linearly decreasing with the increase of the injection volume. It results that an essential condition for achieving LVI of immiscible D in RPLC is an increased hydrophobic character of the D compared to analytes. The process generally occurs with a loss in the peak efficiency, although band focusing was also reported in some specific conditions.¹³

*University of Bucharest, Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, #90 Panduri Av., Bucharest – 050663, Romania. E-mail: amedved@ yahoo.com; Fax: +40 214 102 279; Tel: +40 723 330 423

^aAnalytical Application Laboratory, Agilrom, # 405 Th. Pallady Ave., Bucharest – 032266, Romania

^cChemical Development Department, Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc., 900 Ridgebury Rd, Ridgefield, CT 06877-0368, USA

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c4ay02332c

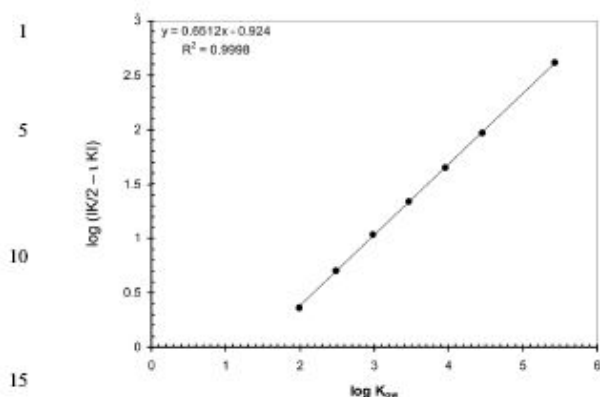


Fig. 5 Functional relationship established between the absolute values of the slopes of the linear regressions relating the apparent retention factor (k_{app}) to the reduced injected volume ($V_{inj}V_0^{-1}$) and the log K_{ow} of the studied compounds.

injection of 1 μ L solution in methanol (accounted only for the chromatographic separation process) is added to the plot, the correlation coefficient is reduced to 0.9609.

One can conclude that the thermodynamic study revealed the existence of the distinctive LLE and the RP chromatographic stages. As both stages are based on similar interactions of the analyte distributed between a hydrophobic phase (D and SP) and the MP, van't Hoff plots remain linear. The slight increase of the enthalpy on increasing the D volume is well compensated by the entropy change. Through analyzing the compensation plots, the small difference between the chromatographic separation taken alone and the on-line coupling between RP-SLE and RPLC resulted in a reduction of the correlation coefficients. A large entropy change indicates that the solute molecules are retained with less random movement in the SP than they were in the D layer.

3.5. Hydrophobicity indicating scale

From eqn (19) it results that the slope of the linear regression $k_{app} = f(\alpha)$ depends on the retention factor of the model compound in the chromatographic column and its partition constant from the MP to the D (K). Consequently, the slope of the linear regression should globally express the affinity of the analyte towards hydrophobic media (the D and the SP), or towards the hydrophilic MP. Thus, a correlation between the log K_{ow} of the analytes and the slope of the linear regression $k_{app} = f(\alpha)$ should be observable. Fig. 5 illustrates the correlation between the calculated log K_{ow} values of the target compounds and the logarithms of the slopes of the linear regressions $k_{app} = f(\alpha)$, taken as absolute values, when using heptane as D on injection. One can observe the excellent correlation between the two sets of data.

Similar correlations were established between log K_{ow} and the logarithms of the absolute slopes resulting from the injection of all analytes in the other D (see the ESI,† Part 7). In fact,

the data generated in all D are similar, as long as their hydrophobic characteristics are similar with respect to the hydrophobic characteristics of the SP. It appears that the slope of the linear relationship between k_{app} and α may successfully act as a hydrophobicity descriptor.

4. Conclusions

Large volume injection (LVI) of immiscible D in reversed phase liquid chromatography (RPLC) may be successfully described by means of a reversed phase supported liquid extraction process (RP-SLE) on-line coupled to the chromatographic separation. The simple mathematic model being developed fully explains the linear relationship experimentally established between the apparent retention factor (k_{app}) and the reduced injected volume ($\alpha = V_{inj}V_0^{-1}$). The model is based on the immobilization of the D plug immediately after its transfer in the column's head, followed by the formation of MP channels. The formation of MP channels leads to inflation of the D plug and allows liquid-liquid extraction of the analytes. The chromatographic separation follows the SLE process in the part of the column remaining after inflation of the D plug up to its maximal extent. The model allows the calculation of the column cross-section occupied by the D. The model was verified on a homologous series of *para*-alkyl hydroxybenzoates, using hexane, heptane, iso-octane, decane, and dodecane as D. A rapid liquid-liquid extraction from the D in the MP leads to analyte focusing and improves band spreading in the case of rapidly eluting compounds, as compared to the situation of injection of large volumes of samples dissolved in the MP. For analytes poorly extracted from the D by the MP, band spreading is limited by refocusing in the SP. It was experimentally proven that D saturation of the MP is not responsible for the retention factor reduction under the given conditions. The SLE and RPLC processes consecutively acted according to the proposed mechanism, and are observable in the enthalpy-entropy compensation plots, if compared to the chromatographic separation conditions taken alone. It also results that the logarithm of the slope of the linear relationship between k_{app} and α , taken as the absolute value, may successfully act as a hydrophobicity descriptor. LVI of immiscible D in RPLC is also one of the most direct proofs that the chromatographic retention mechanism is based on adsorption. Under the experimental conditions, the adsorption based chromatographic retention is "quenched" by the D.

Acknowledgements

Some of the authors (S. Udrescu, F. Tache, F. Albu and A. Medvedovici) acknowledge the financial support given by the Romanian project PNII_ID_PCE_2011_3_0152.

References

- 1 C. F. Poole and S. K. Poole, in *Chromatography Today*, Elsevier, Amsterdam, 5th edn, 1991, ch. 5, pp. 563–567.

ON THE HPLC/MS-MS ASSAY OF EPHEDRINES IN URINE: AN EXPERIMENTAL APPRAISAL

Elena Emilia IORGULESCU^a, Florin ALBU^{a,b}, Florentin TACHE^a and Andrei MEDVEDOVICI^{a*}

^a University of Bucharest, Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, # 90-92 Panduri Ave., Bucharest-050663,
Romania.

^b Analytical Application Laboratory Agilrom, # 40S Th. Pallady Ave., Bucharest-032266, Romania.

Chromatographic separation of ephedrines faces the imperative discrimination among the diastereoisomeric pairs ephedrine/pseudoephedrine and norephedrine/norpseudoephedrine, respectively. Additionally, specific elution mechanisms and/or conditions are required to adequately control the peak symmetry. A discussion about the necessary experimental conditions to fulfil such goals is presented. Three alternatives were selected for the assay at sub-ppm level of ephedrines in urine through HPLC/MS-MS: i) ion pair reversed phase liquid chromatography with a perfluorinated ion pair agent; ii) reversed phase liquid chromatography on a phenyl modified silicagel as a stationary phase; iii) on-line solid phase extraction and reversed phase liquid chromatography under alkaline elution conditions. These alternatives were comparatively discussed with respect to their quality specifications.

INTRODUCTION

Ephedrines are commonly used as stimulants, decongestants, and appetite suppressants. Ephedrines belong to the alkaloids class, acting through the increase of noradrenaline on adrenergic receptors. Due to their increased ability to cross the blood brain barrier, they are acting as central nervous system stimulants,

CONCLUSIONS

Although simple with respect to their chemical structures, ephedrine require special chromatographic elution conditions in order to simultaneously preserve selectivity against the critical pairs NE/NPE and E/PE and peak symmetry. After studying the retention behaviour on different stationary phases and separation mechanism, three alternatives were retained: one uses IP retention mechanism with a perfluorinated ion pairing agent (HFBA) on an octadecyl chemically modified silicagel, the other uses an RP retention mechanism modulated by means of the π - π interactions on a phenyl modified silicagel, while the last one requires alkaline elution conditions under RP separation mechanism on polymeric, strongly end-capped octadecyl silicagel. The last method used an on-line SPE/RPLC approach, the SPE procedure being achieved on a vinylpyrrolidone/divinylbenzene copolymer (Oasis HLB).

The proposed methods were validated, and behave similarly with respect to most of their quality characteristics. Incurred urine samples being analyzed by means of the three alternatives produces comparable results. Comparison between the concentration values obtained for ephedrine (E) by means of the Bland-Altman approach revealed the good correlation between the results produced through application of the three alternative methods on the incurred samples, although some of the experimental values exceeded the upper limit of quantitation (ULOQ) determined during validation.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors acknowledge the financial support given by the Romanian project PNII_ID_PCE_2011_3_0152.

