

Raport Științific

privind implementarea proiectului în perioada 16 Decembrie 2014 –15 Decembrie 2015

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: 16.12.2014 – 15.12.2015

Datorită re-eșalonării proiectului inițial pe o perioadă extinsă (până în luna Septembrie a anului 2016), prezentul raport se referă la Obiective și Activități consemnate în Planul de Realizare a Proiectului, Anexa IV la Contractul de Finanțare nr. 310/05.10.2011.

S-au avut în vedere următoarele obiective și activități:

- O1.** Identificarea unor domenii de aplicare a LVI de diferiți solvenți nemiscibili:
 - O1A1.** Aplicații în controlul de calitate a produselor farmaceutice;
 - O1A2.** Aplicații în controlul calității mediului.
- O2.** Obținerea de date privind procesul bazat pe injecția de volume mari de solvenți nemiscibili în cromatografia de lichide:
 - O2A1.** Verificarea diverselor componente organice ale fazei mobile (mecanism RP) care se pretează la procese LVI de diluenți nemiscibili;
 - O2A2.** Verificarea diverselor mecanisme de separare (NP, ANP, HILIC).
- O3.** Identificarea unor potențiale domenii de aplicare a LVI în diferiți solvenți nemiscibili:
 - O3A1.** Aplicații în analiza alimentelor.
- O4.** Analizarea posibilităților de caracterizare a hidrofobicității compușilor organici prin procesul de injecție de volume mari de diluenți nemiscibili cu faza mobilă - studii preliminare:
 - O4A1.** Studiul injecției de volume mari de solvenți structurați în RPLC - studii preliminare.
- O5.** Diseminarea rezultatelor:
 - O5A1.** Publicarea datelor experimentale în reviste de specialitate cotate ISI.
 - O5A2.** Participarea la manifestări științifice.

Pentru O1A2 / O2A1:

A fost evaluată posibilitatea înlocuirii acetonitrilului cu lactat de etil în compoziția fazelor mobile utilizate pentru cromatografia de lichide cu fază inversă. Aplicația aleasă este una de mediu, ea referindu-se la separarea hidrocarburilor aromatice polinucleare (PAHs) pe o coloană convențională cu fază staționară de tip silicagel modificat chimic cu radicali octadecil, în condițiile înlocuirii acetonitrilului cu lactatul de etil. S-a avut în vedere determinarea compoziției de fază mobilă cu lactat de etil care produce atât o retenție, cât și o selectivitate similare cu cele obținute cu fază mobilă care conține acetonitril. Aplicația analitică poate fi considerată posibilă, acceptând totuși câteva compromisuri în termeni de ordine de eluție, eficiență cromatografică și sensibilitate (luând în considerare detecția UV). Aspectele termodinamice legate de procesul cromatografic de separare au fost, de asemenea, evaluate comparativ pentru cele două sisteme de eluție. Corelațiile dintre ordinea de eluție și câțiva descriptori moleculari au fost, în egală măsură, luate în considerație, ilustrând ideea că mecanismul de separare rămâne același, atât în cazul utilizării lactatului de etil, cât și a acetonitrilului.

Amestecul de analiți supus separării este următorul: naftalină (A); acenaften (B); fluoren (C); acenaften (D); fenantren (E); antracen (F); fluoranten (G); piren (H); crisen (I); benzo(a)antracen (J); benzo(b)fluoranten (K); benzo(k)fluoranten (L); benzo(a)piren (M); dibenzo(a,h)antracen (N); benzo(g,h,i)perilen (O) și indeno(1,2,3-c,d)piren (P).

Parametrii regresiilor liniare, care caracterizează relația dintre logaritmul factorului de retenție ($\log k$) și logaritmul procentului de modificador organic în faza mobilă, sunt consemnați în tabelul de mai jos.

Tabel 1. Parametrii regresiilor liniare pentru funcția $\log k = f(\log \% \text{ modificador organic})$.

Modif. Organic	Compus	A	B	C	D	E	F	G	H
Lactat de etil	Pantă	-4.2411	-4.4725	-4.6544	-4.4837	-4.9476	-5.0278	-5.0658	-5.1404
	Intercept	7.7420	8.1768	8.7255	8.4442	9.2080	9.4031	9.5114	9.6595
	r_{xy}	0.9987	0.9987	0.9985	0.9984	0.9983	0.9985	0.9980	0.9984
ACN	Pantă	-3.8469	-4.0150	-4.3572	-4.2085	-4.5166	-4.5389	-4.7739	-4.6100
	Intercept	7.4546	7.8538	8.6297	8.3726	8.9797	9.0741	9.5985	9.3603
	r_{xy}	0.9987	0.9999	0.9999	0.9987	0.9986	0.9999	0.9986	0.9999

Modif. Organic	Compus	I	J	K	L	M	N	O	P
Lactat de etil	Pantă	-5.6073	-5.6707	-5.6837	-5.8652	-5.7701	-6.1766	-5.7674	-5.9837
	Intercept	10.6214	10.7593	10.8761	11.2247	11.0470	11.9068	11.1102	11.5444
	r_{xy}	0.9980	0.9981	0.9979	0.9976	0.9979	0.9968	0.9976	0.9977
ACN	Pantă	-5.1810	-5.1667	-5.4330	-5.5098	-5.2363	-5.8086	-5.3121	-5.5983
	Intercept	10.5372	10.5335	11.1768	11.3432	10.8822	12.0437	11.1922	11.7115
	r_{xy}	0.9988	0.9999	0.9990	0.9990	0.9999	0.9999	0.9999	0.9993

Echivalența între procentul de lactat de etil și cel de acetonitril din faza mobilă, care generează o retenție cromatografică similară, este ilustrată în Tabelul 2.

Tabel 2. Compoziții ale fazelor mobile conținând lactat de etil și acetonitril având drept consecință o retenție cromatografică similară a analiților de interes.

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

Relația matematică $\% \text{ lactat de etil} = 0,7 \times \% \text{ acetonitril} + 3,6$ descrie corect condițiile experimentale în care retenția cromatografică a analiților de interes este practic egală.

Obținerea datelor experimentale pentru dependențele van't Hoff ($\ln k = f(1/T)$) a permis determinarea valorilor entalpiei și entropiei libere asociate retenției cromatografice în cazul utilizării fazelor mobile acetonitril/apă, respectiv lactat de etil/apă.

Dependența funcțională dintre $-\Delta H^0$ și $\ln k_{(T=30^\circ\text{C})}$, prezentată în Figura 1b, ilustrează faptul că fenomenul de compensare dintre entalpie și entropie, obținut atât la separarea PAHs în sistemele

acetonitril/apă și lactat de etil/apă (Figura 1a), care pledează pentru conservarea mecanismului de separare în cele două condiții de eluție, nu se datorează erorilor experimentale ce intervin pe durata determinării entalpiei (în Figurile 1a și b, punctele figurate cu negru corespund analiților separați în sistemul lactat de etil/apă, în timp ce punctele figurate cu gri corespund analiților separați în sistemul acetonitril/apă).

Tabel 3. Aspecte termodinamice care ilustrează retenția PAHs, în condițiile înlocuirii în faza mobilă a acetonitrilului cu lactatul de etil (condițiile corespund unei selectivități similare).

Analit	Acetonitril/apă = 70/30 (v/v)					
	B	A	r_{xy}	ΔH^0 KJmol ⁻¹ K ⁻¹	ΔS^0 Jmol ⁻¹ K ⁻¹	ΔG^0 (25 °C) KJmol ⁻¹ K ⁻¹
A	878	-2.21	0.9847	-7.30	-7.6	-5.04
B	1043	-2.55	0.9923	-8.67	-10.4	-5.56
C	1108	-2.43	0.9922	-9.21	-9.5	-6.39
D	1025	-2.11	0.9860	-8.52	-6.7	-6.51
E	1138	-2.40	0.9876	-9.46	-9.2	-6.73
F	1276	-2.74	0.9926	-10.61	-12.0	-7.03
G	1290	-2.57	0.9886	-10.73	-10.6	-7.57
H	1422	-2.87	0.9922	-11.83	-13.1	-7.92
I	1538	-2.96	0.9906	-12.79	-13.9	-8.65
J	1594	-3.11	0.9929	-13.25	-15.1	-8.76
K	1741	-3.24	0.9915	-14.48	-16.2	-9.65
L	1801	-3.38	0.9919	-14.98	-17.4	-9.80
M	1899	-3.62	0.9931	-15.79	-19.3	-10.02
N	2073	-3.81	0.9930	-17.24	-20.9	-11.00
O	2024	-3.80	0.9937	-16.83	-20.8	-10.62
P	2072	-3.82	0.9925	-17.23	-21.0	-10.97
Analit	Lactat de etil/apă = 45/55 (v/v)					
	B	A	r_{xy}	ΔH^0 KJmol ⁻¹ K ⁻¹	ΔS^0 Jmol ⁻¹ K ⁻¹	ΔG^0 (25 °C) KJmol ⁻¹ K ⁻¹
A	1427	-2.97	0.9889	-11.86	-13.9	-7.71
B	1495	-3.08	0.9913	-12.43	-14.9	-8.00
C	1765	-3.43	0.9927	-14.67	-17.8	-9.37
D	1739	-3.34	0.9922	-14.46	-17.0	-9.39
E	1780	-3.49	0.9924	-14.80	-18.3	-9.34
F	1876	-3.67	0.9919	-15.60	-19.8	-9.70
G	1921	-3.71	0.9913	-15.97	-20.1	-9.99
H	1925	-3.68	0.9913	-16.00	-19.8	-10.09
I	2283	-4.44	0.9897	-18.98	-26.2	-11.18
J	2281	-4.36	0.9900	-18.97	-25.5	-11.36
K	2466	-4.74	0.9894	-20.51	-28.6	-11.97
L	2573	-5.00	0.9892	-21.39	-30.8	-12.22
M	2514	-4.86	0.9893	-20.90	-29.7	-12.06
N	2857	-5.54	0.9887	-23.75	-35.3	-13.23
O	2578	-4.91	0.9891	-21.43	-30.1	-12.47
P	2774	-5.40	0.9890	-23.06	-34.1	-12.89

Corelațiile care se stabilesc între datele de retenție a analiților de interes în cele două sisteme alternative de eluție și descriptorii moleculari asociați acestor analiți, descrise în Tabelul 4, pledează în egală măsură pentru faptul că mecanismul de separare nu se modifică la trecerea de la acetonitril la lactat de etil, drept componentă organică în faza mobilă.

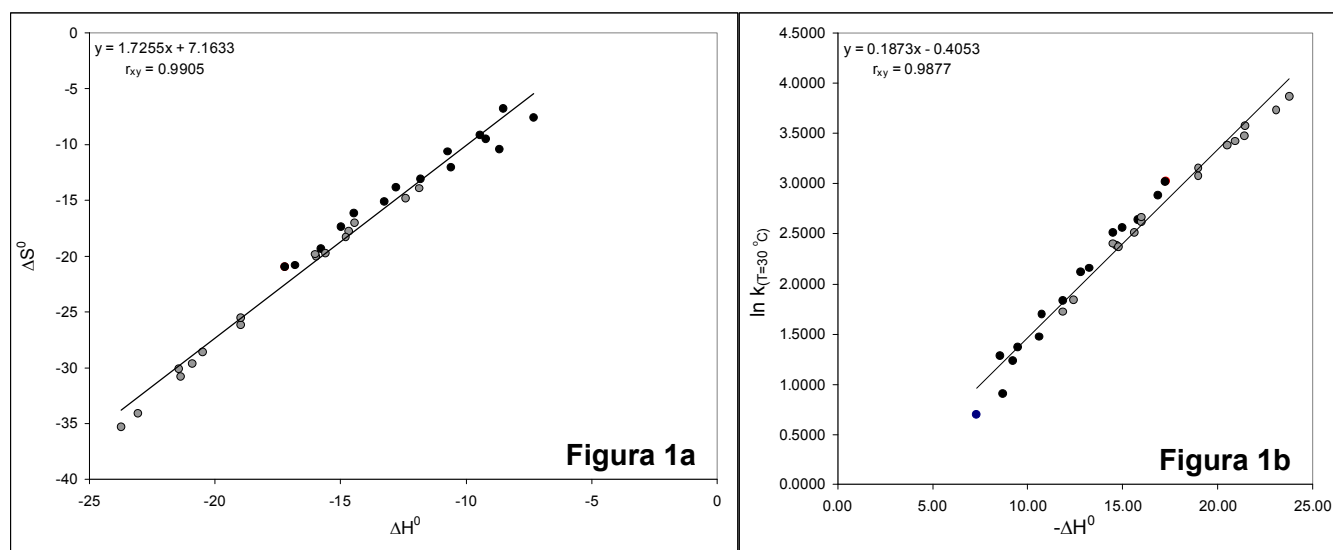


Figura 1. Compensarea dintre entalpie și entropie observată la separarea PAHs pe o fază staționară de tip ODS, în condițiile eluției în sistemul acetonitril/apă, respectiv lactat de etil/apă.

Tabelul 4. Relațiile dintre datele de retenție obținute în cele două sisteme alternative de eluție și descriptorii moleculari ai analiților de interes.

Modificator organic	Descriptor	M_w	V_w	$\log P$	S	χ	F	L/B
	Funcție	$M_w=f(\log k)$	$V_w=f(\log k)$	$\log P=f(\log k)$	$\log S=f(\log k)$	$\chi=f(\log k)$	$F=f(\log k)$	$L/B=f(\log k)$
ACN	medie r_{xy}	0.9941	0.9918	0.9937	-0.9701	0.9964	0.9974	0.3540
	s	0.0010	0.0017	0.0009	0.0007	0.0006	0.0010	0.0111
Lactat de etil	medie r_{xy}	0.9800	0.9852	0.9865	-0.9584	0.9832	0.9874	0.4367
	s	0.0040	0.0043	0.0024	0.0048	0.0021	0.0023	0.0156

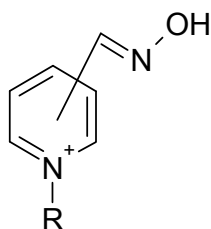
Concluzii:

Este posibilă înlocuirea acetonitrilului cu lactat de etil în fazele mobile, pentru separări RPLC. Ea poate fi considerată ca fiind utilă, în condițiile actuale de a transforma cromatografia într-o alternativă verde în chimie. Lactatul de etil este miscibil cu apa în orice proporție și produce un regim de presiune acceptat de instrumentația disponibilă comercial. Pentru analiții considerați, o retenție similară a fost obținută cu faze mobile conținând cu 15% mai puțin lactat de etil decât acetonitril. Pentru a atinge totuși o selectivitate comparabilă, fazele mobile conținând lactat de etil trebuie să fie cu cca. 20-25% mai sărace în modificator organic. Deși selectivitatea separărilor cu lactat de etil în faza mobilă nu diferă substanțial de separările care utilizează acetonitril, durata acestora va fi considerabil mai mare. Așa cum reiese din funcția Van Deemter, rezistența crescută la transferul de masă în faza mobilă conținând lactat de etil impune exploatarea coloanei în condiții optime de deplasare a fazei mobile. O creștere a acesteia va atrage după sine o pierdere semnificativă de eficiență. Două mari dezavantaje ale înlocuirii acetonitrilului prin lactat de etil vor trebui totuși luate în considerare: o lungime de undă de cut-off ridicată a lactatului de etil va reduce drastic sensibilitatea determinărilor; lactatul de etil de puritate cromatografică nu este disponibil comercial.

Pentru O1A1 / O2A2:

A fost evaluată posibilitatea utilizării unei faze staționare care funcționează multimodal (RP + HILIC) în evaluarea lipofilicității intrinseci a unei familii de analiți (oxime cuaternare), care sunt utilizați ca reactivatori ai acetilcolinesterazei inhibitate cu compuși organo-fosforici (sunt compuși care pot fi potențial utilizați ca antidot în condițiile intoxicației cu derivați organo-fosforici).

Setul de compuși considerați este ilustrat din punct de vedere structural în Figura 2.



#	Substituent (R)	Substituent (R)	Poziția funcțiunii oximice	Acronim
1	Etil	-C ₂ H ₅	2, 3, 4	2-PAE, 3-PAE, 4-PAE
2	Butil	-C ₄ H ₉	2, 3	2-PAB, 3-PAB
3	Hexil	-C ₆ H ₁₃	2, 3, 4	2-PAH, 3-PAH, 4-PAH
4	Octil	-C ₈ H ₁₇	2, 3, 4	2-PAO, 3-PAO, 4-PAO
5	Decyl	-C ₁₀ H ₂₁	2, 3	2-PAD, 3-PAD
6	Dodecil	-C ₁₂ H ₂₅	2, 3, 4	2-PAL, 3-PAL, 4-PAL
7	Benzil	-CH ₂ -C ₆ H ₅	2, 3, 4	2-PABn, 3-PABn, 4-PABn
8	Etil-fenil	-(CH ₂) ₂ -C ₆ H ₅	2, 3, 4	2-PAPE, 3-PAPE, 4-PAPE
9	Propil-fenil	-(CH ₂) ₃ -C ₆ H ₅	3	3-PAPP
10	Butil-fenil	-(CH ₂) ₄ -C ₆ H ₅	3, 4	3-PAPB, 4-PAPB
11	4-Metilbenzil	-CH ₂ -C ₆ H ₄ -CH ₃	2, 3, 4	2-PAMB, 3-PAMB, 4-PAMB
12	4- <i>t</i> -Butilbenzil	-CH ₂ -C ₆ H ₄ -C(CH ₃) ₃	3, 4	3-PATB, 4-PATB

Figura 2. Structura chimică a analiților investigați.

Faza staționară utilizată este un silicagel modificat chimic cu radicali dodecil-diol. Interacția analiților cu catena hidrocarbonată face ca mecanismul previzionat de separare să fie unul de fază inversă. Totuși, mai ales în contextul utilizării unor faze mobile foarte bogate în modificador organic (în speță acetonitrilul), datorită unui strat de apă reținut prin punți de hidrogen la nivelul hidroxililor terminali, faza staționară poate funcționa și în mecanism HILIC. Apariția simultană a celor două mecanisme, în funcție de compoziția fazei mobile, face ca retenția să crească la cele două extremități ale intervalului în care este situat procentul de modificador organic din faza mobilă. La mijlocul intervalului, este de așteptat o retenție scăzută, generată doar de transferul reciproc al analitului între stratul lipofil, asociat catenei hidrocarbonate și stratul hidrofil de apă legată la nivelul hidroxililor terminali. Procesul este ilustrat în Figura 3.

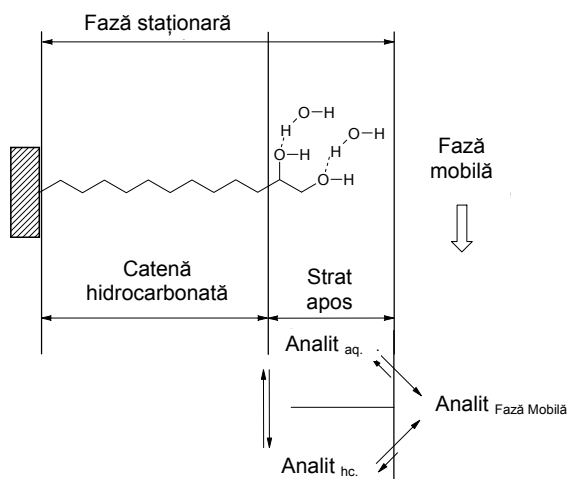


Figura 3. Maniere de interacție a analitului la nivelul unei faze staționare cu funcționare bimodală.

În contextul ilustrat mai sus, retenția analiților la nivelul unei astfel de faze staționare, prin utilizarea unor faze mobile a căror conținut în modificador organic variază în intervalul 0 - 100%, va urmări un profil parabolic. Minimumul de retenție coincide cu situația ilustrată în Figura 3. Deoarece, în acest caz, retenția analitului va depinde în mod univoc doar de transferul reciproc al acestuia între straturile lipofil și hidrofil, ea trebuie să fie corelabilă cu caracterul intrinsec de lipofilicitate a analitului, și, în consecință, cu valoarea log P a acestuia.

Profilele de retenție pe o astfel de fază staționară având formă parabolică (formă de „U”), pot genera informații care, la rândul lor, pot fi corelate cu valorile log P ale analiților în cauză. Plecând de la reprezentările primare $k = f(\% \text{ modificador organic})$, sau $\log k = f(\% \text{ modificador organic})$, pot fi identificați o serie de descriptori corelabili cu gradul de lipofilicitate moleculară, după cum urmează: $k_{\min}$ și $\log k_{\min}$, reprezentând factorul de retenție minim (respectiv logaritmul acestuia), așa cum rezultă din profilul de retenție; ISOELUT și LOGISOELUT, reprezentând % de modificador organic din faza mobilă (respectiv logaritmul acestuia) pentru care retenția cromatografică este minimă, așa cum rezultă din condiția de minim aplicată funcției binomiale ilustrând profilul de retenție; ISOELUT1 și

LOGISOELUT1, reprezentând % de modificador organic din faza mobilă (respectiv logaritmul acestuia) pentru care retenția cromatografică este minimă, așa cum rezultă din condiția de egalitate aplicată celor două funcții liniare ce descriu partea descrescătoare, respectiv crescătoare a profilului de retenție; ISOELUT2 și LOGISOELUT2, reprezentând % de modificador organic din faza mobilă (respectiv logaritmul acestuia) pentru care retenția cromatografică este minimă, așa cum rezultă din condiția de egalitate aplicată celor două funcții putere ce descriu partea descrescătoare, respectiv crescătoare a profilului de retenție; k_w^{lin} respectiv $\log k_w^{lin}$, reprezentând extrapolarea prin dependență liniară a retenției (respectiv $\log k$) corespunzătoare unei ipotetice faze mobile constituită din 100% apă; k_w^{bin} , respectiv $\log k_w^{bin}$, reprezentând extrapolarea prin dependență binomială a retenției (respectiv $\log k$) corespunzătoare unei ipotetice faze mobile constituită din 100% apă; Hyl, respectiv $\log Hyl$, reprezentând extrapolarea prin dependență liniară a retenției (respectiv $\log k$) corespunzătoare unei ipotetice faze mobile constituită din 100% modificador organic.

Situațiile descrise mai sus sunt ilustrate în Figura 4a și b.

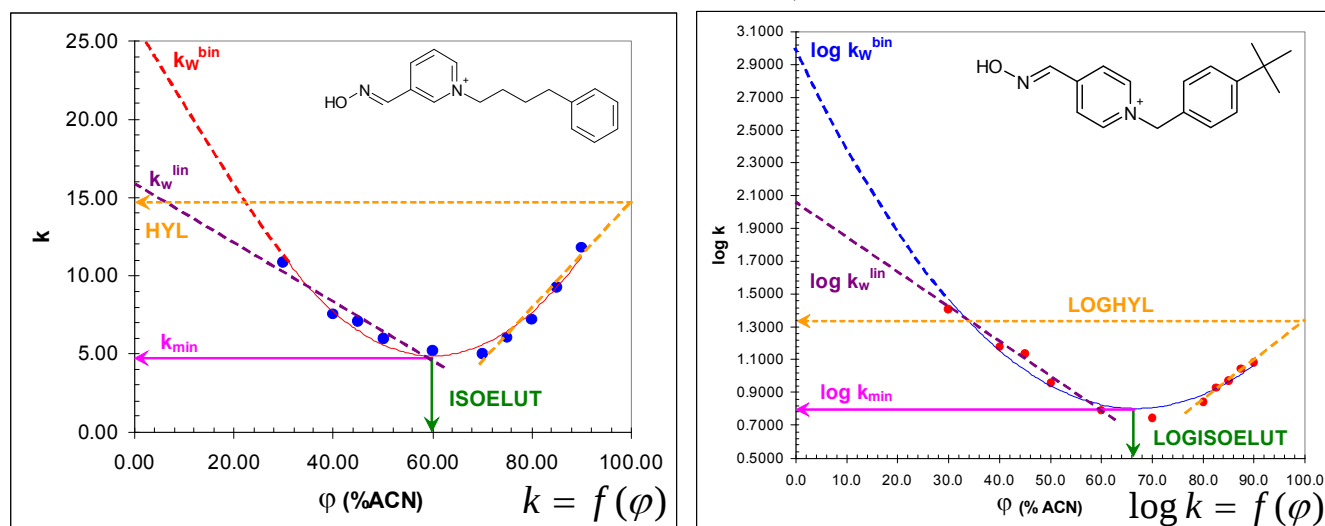


Figura 4. Descriptori ai lipofilicității, așa cum rezultă ei din profilele de retenție obținute pentru analiții studiați pe faza staționară care funcționează bimodal.

Valorile descriptorilor experimentali ai lipofilicității au fost corelate cu valorile $\log P$ calculate prin diverse modele computaționale. Rezultatele sunt ilustrate în Tabelul 5.

Tabelul 5. Corelații între descriptorii determinați experimental și cei calculați prin algoritmi cunoscuți.

Coeficienți de corelație											
Seturi de valori corelate	ALOGPs	AC logP	miLogP	KOWWIN	XLOGP2	XLOGP3	Hy	MLOGP	ALOGP	LogD7	SlogD7.4
k_{min}	0.958	0.977	0.934	0.963	0.977	0.983	-0.758	0.935	0.943	0.884	0.969
$\log k_{min}$	0.938	0.977	0.927	0.973	0.964	0.978	-0.849	0.954	0.944	0.918	0.969
ISOELUT	0.842	0.915	0.835	0.942	0.895	0.899	-0.891	0.914	0.904	0.931	0.902
LOG ISOELUT	0.809	0.881	0.810	0.904	0.865	0.873	-0.874	0.880	0.855	0.894	0.864
ISOELUT 1	0.479	0.512	0.460	0.508	0.484	0.529	-0.518	0.577	0.393	0.537	0.503
LOG ISOELUT 1	0.678	0.740	0.661	0.752	0.700	0.750	-0.817	0.806	0.640	0.788	0.738
ISOELUT 2	0.552	0.598	0.526	0.602	0.558	0.621	-0.730	0.668	0.493	0.642	0.609
LOG ISOELUT2	0.193	0.209	0.117	0.214	0.201	0.226	-0.267	0.240	0.135	0.232	0.227
k_w^{lin}	0.788	0.784	0.767	0.753	0.793	0.787	-0.546	0.803	0.770	0.652	0.770
$\log k_w^{lin}$	0.847	0.862	0.836	0.843	0.862	0.863	-0.672	0.878	0.840	0.766	0.845

k_w^{bin}	0.754	0.812	0.756	0.787	0.817	0.800	-0.570	0.814	0.778	0.714	0.771
$\log k_w^{bin}$	0.139	0.278	0.202	0.304	0.246	0.239	-0.377	0.257	0.259	0.374	0.230
HYL	0.488	0.472	0.479	0.413	0.458	0.502	-0.327	0.520	0.363	0.363	0.464
LOG HYL	0.430	0.405	0.420	0.346	0.400	0.440	-0.245	0.464	0.298	0.291	0.396

Concluzii:

Se poate concluziona faptul că profilul de retenție rezultat în urma separării cromatografice pe o fază staționară care funcționează bimodal (RP + HILIC) poate furniza descriptori ai lipofilicității moleculare semnificativ corelați cu valorile ce rezultă prin aplicarea algoritmilor computaționali clasici. Dintre acești descriptori experimentali, valorile minime de retenție (logaritmate sau nu, k_{min} și $\log k_{min}$) și valorile de compoziție ale modificatorului organic în faza mobilă asociate retenției minime (ISOELUT sau LOG ISOELUT), sunt cei mai bine corelați cu valorile rezultate prin aplicarea algoritmilor chemometrici.

Pentru O3A1:

A fost evaluată posibilitatea comparării holistice prin metode chemometrice a amestecurilor naturale foarte complexe, în speță a ceaiurilor. Aplicarea metodelor chemometrice cunoscute, PCA și HCA, a fost aplicată la serii de date reprezentând cromatogramele RPLC, respectiv spectrele de masă (cu monitorizarea ionilor pozitivi, respectiv negativi) a unor extracte de ceaiuri verzi. Se propune și o altă metodă alternativă de evaluare a rezultatelor, bazată pe regresia liniară. Nevoia unei alternative la evaluările chemometrice clasice este generată de capabilitatea limitată a software-urilor chemometrice de a prelucra seturi foarte mari de date (astfel, software-ul Statistica acceptă matrici de corelație limitate la 1000 de variabile, în condițiile în care cromatogramele sau spectrele de masă sunt șiruri numerice cu peste 8000 de termeni). Atâta vreme cât tehnicile chemometrice se rezumă în aplicațiile amintite la o simplă comparare a formelor, este evident faptul că o frecvență de achiziție crescută a datelor va permite reproducerea mai corectă a profilelor comparate. A existat în egală măsură dorința de a evalua modul în care repetabilitatea instrumentală afectează puterea de discriminare a tehnicilor chemometrice amintite.

În acest sens, cinci tipuri de ceaiuri verzi disponibile comercial (notate de la T1 la T5) au fost supuse extracției în etanol (0,1 g substanță solidă la 2 mL de etanol; vortexare 1 minut la 2500 rpm; păstrare la întuneric timp de 7 zile; centrifugare și prelevarea supernatantului). Extractul etanolic a fost supus separării cromatografice, în mecanism de fază inversă, pe o coloană Eclipse XDB C18 (15 cm × 4,6 mm i.d. × 3,5 μm d.p), cu o fază mobilă compusă din acetonitril și soluție apoasă de acid formic 0,1% (v/v) în regim de gradient de compoziție a fazei mobile (min/solvent organic % (v/v): 0.0/5%; 5.0/10%; 20.0/35%; 25.0/55%; 30.0/100%; 35.0/100%; 35.01/5%; 45.0/5%). Frecvența de achiziție a datelor a fost de 5 Hz. Durata separării a fost de 35 minute, în consecință, șirurile numerice asociate unei cromatograme constau din 10500 de termeni. Fiecare probă de ceai în parte a fost injectată de 5 ori succesiv. Pentru PCA și HCA, șirurile numerice au fost reduse prin medierea a 10 valori succesive. Spectrele de masă au fost obținute prin infuzia extractelor etanolice direct în sursa de ionizare a unui spectrometru de masă de tip electrospray, folosind un flux purtător format din acetonitril/soluție apoasă de acid formic 0,1% = 1/1 (v/v) cu debit de 0,5 mL/min. Spectrele de masă obținute prin monitorizarea ionilor pozitivi și negativi au fost măsurate cu o rezoluție spectrală de 0,1 a.m.u., în intervalul 20 -1100 a.m.u. Șirurile numerice astfel obținute au avut 10800 date. Pentru PCA și HCA, aceste șiruri au fost reduse prin medierea a câte 10 date succesive.

Rezultatele comparării prin PCA a celor 5 tipuri de ceaiuri verzi (cromatograme, (+)MS și respectiv (-)MS) sunt prezentate în Figura 5 a-c. Se poate observa faptul că PCA realizează discriminarea între cele 5 tipuri de ceaiuri verzi. Se poate de asemenea observa că variabilitatea instrumentală nu afectează puterea de discriminare a tehnicii PCA.

Rezultatele comparării prin HCA a celor 5 tipuri de ceaiuri verzi (cromatograme, (+)MS și respectiv (-)MS) sunt prezentate în Figura 6 a-c. Se poate observa faptul că HCA realizează discriminarea între cele 5 tipuri de ceaiuri verzi. Se poate, de asemenea, observa că variabilitatea

instrumentală nu afectează puterea de discriminare a tehnicii HCA. Se poate observa ca tehnica HCA, aplicată cromatogramelor RPLC asociază ceaiurile T1 și T4, respectiv T2 și T5. HCA aplicată spectrelor de masă a ionilor pozitivi asociază ceaiurile T2 și T3, respectiv T4 și T5. HCA aplicată spectrelor de masă a ionilor negativi asociază în același mod ceaiurile T2 și T3, respectiv T4 și T5.

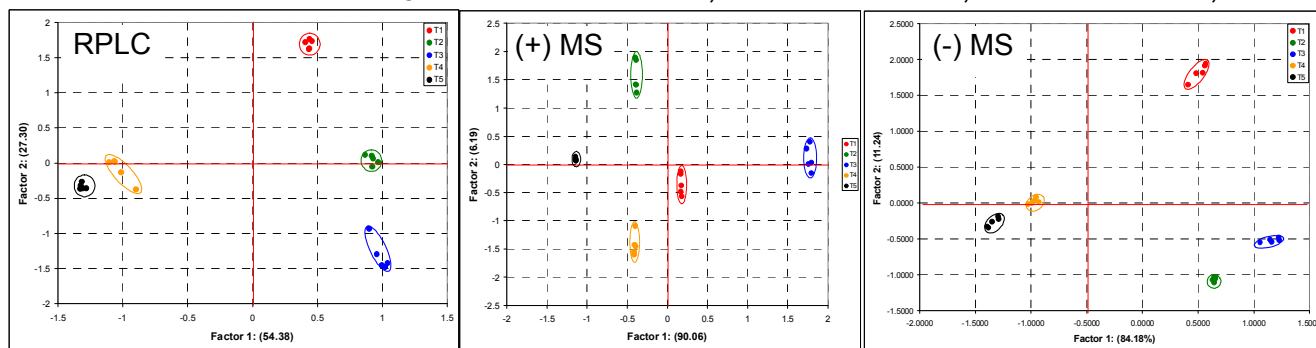


Figura 5. Prelucrări PCA a datelor provenite de la analiza RPLC-UV, (+) MS și (-) MS a celor 5 tipuri de ceaiuri verzi.

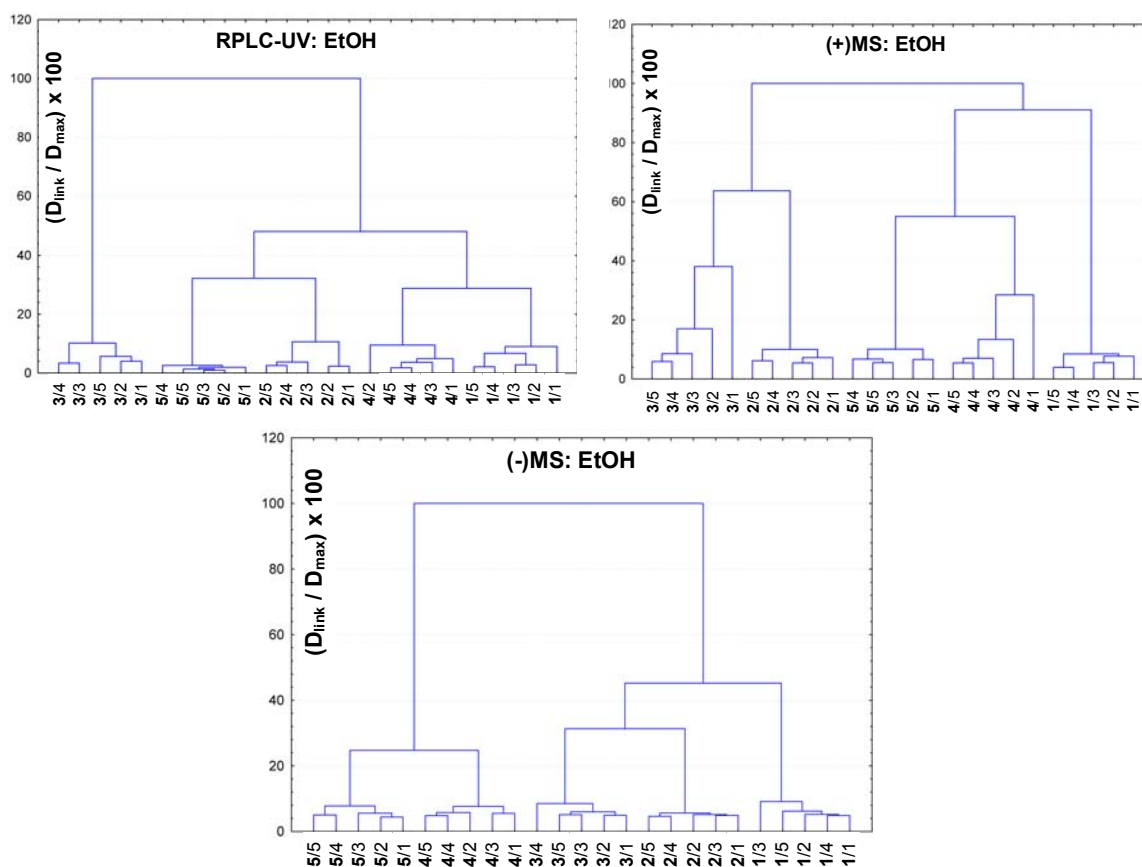


Figura 6. Prelucrări HCA a datelor provenite de la analiza RPLC-UV, (+) MS și (-) MS a celor 5 tipuri de ceaiuri verzi.

O manieră nouă de comparare a datelor experimentale se bazează pe utilizarea regresiei liniare. Cele 5 șiruri numerice obținute pentru fiecare ceai în parte (T_{x1} - T_{x5}) se compară prin reprezentarea succesivă a câte două șiruri (unul plasat în abscisă, celălalt în ordonată - Vezi Figura 7). Pentru graficul de corelație, se calculează dreapta de regresie (caracterizată prin pantă și intercept) și coeficientul de corelație. Pentru cele 20 de aranjamente posibile (aranjamente de 5 șiruri

luate câte 2), se calculează valorile medii ale pantelor, intercepțiilor și coeficienților de corelație, precum și abaterile standard asociate. Pentru fiecare parametru al regresiei liniare în parte se stabilește un domeniu normal de variație (medie $\pm 2 \times$ abatere standard). În cazul comparației a două ceaiuri (de exemplu T_x și T_y) se vor compara reciproc două seturi a câte 5 șiruri numerice. Comparația T_x/T_y va păstra întotdeauna șirurile asociate probei T_x în abscisă. Se obțin astfel 25 regresii liniare, caracterizate prin pantă, intercept și coeficient de corelație. Se calculează valorile medii asociate și domeniile normale de variație. Se vor reprezenta în spațiul tridimensional domeniile normale de variație pentru cei 3 parametri ai regresiilor liniare (O_x - pantă, O_y - intercept, O_z - coeficient de corelație). Volumele astfel generate indică în ce măsură compararea probelor între ele se situează la distanță mai mare sau mai mică de volumul generat de compararea șirurilor în interiorul fiecărui tip de probă (pentru a fi și mai ilustrativ, pentru probele individuale de ceai repetate fiecare de câte 5 ori, se poate alege volumul determinat de variațiile maxime pe cele 3 axe de coordonate).

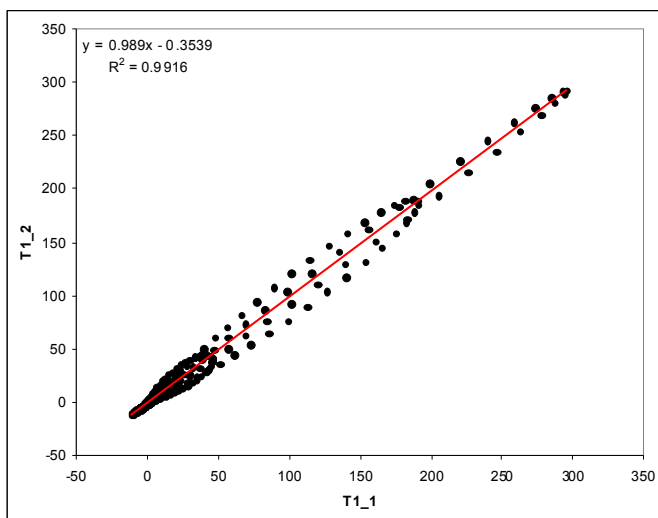


Figura 7. Compararea prin regresie liniară a șirurilor numerice experimentale rezultate prin analiza succesivă a extractelor etanolice din ceai verde.

O astfel de manieră de comparare reduce drastic numărul variabilelor, de la câteva mii la doar trei (pantă, intercept și coeficient de corelație). În acest fel, șirurile de date experimentale pot fi generate cu un număr practic nelimitat de termeni, ceea ce permite considerarea cu mare acuratețe a profilului comparat.

Pentru interpretarea mai ușoară a comparațiilor efectuate, în Figura 8a-c sunt prezentate proiecțiile volumelor generate în cele trei planuri (xOy , yOz , xOz) pentru cazul probelor de ceai analizate prin (+)MS.

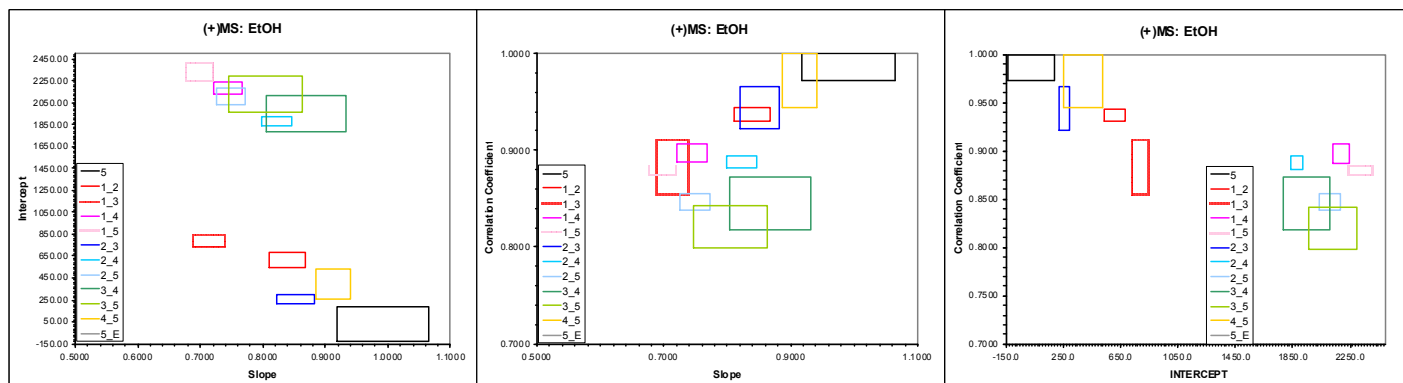


Figura 8. Proiecțiile volumelor în cele trei suprafețe ale spațiului cartezian rezultate în urma comparării spectrelor (+)MS ale extractelor etanolice din ceaiuri verzi reprezentate prin reducerea dimensionalității de la 10800 de variabile la numai 3.

Se poate lesne observa că, metoda permite discriminarea între cele 5 tipuri de ceai (fiecare probă fiind analizată de 5 ori succesiv). Suprafețele rezultate din comparația T4-T5, respectiv T2-T3, se plasează în imediata apropiere a suprafețelor determinate de compararea celor 5 repetări pentru fiecare din cele 5 tipuri de ceai, ceea ce confirmă observații HCA (ceaiurile T4 și T5 se grupează, așa cum se grupează ceaiurile T2 și T3).

Concluzii:

Metoda de reducere a variabilelor experimentale prin considerarea parametrilor regresii liniare (pantă, intercept și coeficient de corelație) rezultate prin compararea șirurilor de date furnizează informații cel puțin comparabile cu metodele chemometrice PCA și HCA. Variabilitatea instrumentală nu influențează puterea de discriminare a nici uneia dintre metodologiile discutate.

Pentru O4A1:

Se evaluează posibilitatea injectării de volume mari de lichide supramoleculare (SUPRAS). Lichidele supramoleculare sunt menționate în literatură (F.J. Ruiz et al., Anal. Chem., 2007, 79, 7473-7484; A.B. Gomez et al., Anal. Chem., 2012, 84, 342-349; C. Burton et al., Anal. Chem., 2013, 85, 11137-11145) ca fiind obținute în sisteme ternare apă/solvent organic/agent tensioactiv neionic. Mai precis, este vorba de coacervarea în micle inverse a alcanolilor sau a acizilor grași carboxilici în medii conținând apă și tetrahidrofuran. Lichidele supramoleculare alcătuite din agregarea micelilor inverse pot servi drept medii de extracție cu potențial experimental foarte important, deoarece pot reține compuși polari în mediul din interiorul micellei, compuși apolari în mediul hidrofob produs de lanțurile hidrocarbonate (peretele micelar), dar în același timp exercitând un efect de excluziune sterică a compușilor cu moleculă mare (de ex. proteine, acizi humici, polizaharide) din matricea extrasă. Potențialul utilizării lichidelor supramoleculare ca agent de extracție este evident, atât pentru analiza de mediu, cât și în bioanaliză.

Deoarece sensibilitatea determinărilor este influențată în mod direct de volumul de probă injectată, studiul injectării de lichide supramoleculare în cromatografia de lichide reprezintă un subiect de interes evident.

S-a studiat efectul injectării de volume mari de probă a unor soluții conținând carbamazepină, obținute în apă, tetrahidrofuran, octanol, și solvent supramolecular preparat în sistemul apă/THF/n-octanol. Separarea s-a realizat pe o coloană ODS 5 cm L × 4,6 mm i.d. × 1,8 μm d.p., utilizând o fază mobilă constituită din soluție apoasă de acid formic 0,1% (v/v) și acetonitril. Debitul utilizat a fost de 0,6 mL/min, iar temperatura coloanei a fost menținută la 25 °C. Detecția este UV, la 254 nm. Volumele de injecție utilizate au fost de 1, 5, 10, 20, 50 μL, iar cantitatea absolută de analit încărcată în coloană a fost de 1 μg. S-a lucrat atât în condiții izocratice, cu 75% componentă apoasă în faza mobilă, cât și în condiții de gradient de elutie (10% componentă organică pentru 1 min., la 100% componentă organică în 6 min., unde se menține timp de 5 min.). Au fost injectate soluții de carbamazepină în apă, tetrahidrofuran, octanol și SUPRAS. Rezultatele sunt prezentate în Figura 9 a-e. SUPRAS a fost obținut prin amestecul a 1,5 mL soluție apoasă de carbamazepină, cu 1,5 mL THF și 0,35 mL octanol.

Se poate observa că THF utilizat ca solvent implică injecția unui volum foarte redus de probă (max 1 μL). Injecția în octanol poate fi de 20 μL, în condițiile izocratice date. În aceleași condiții, volumul maxim de SUPRAS injectat poate fi de 10 μL. Această limită se conservă și în cazul eluției în gradient.

Concluzii:

Volume relativ mari de lichide supramoleculare pot fi injectate în cromatografia de lichide (a nu se ignora faptul că pentru coloana considerată, volumele de injecție recomandate sunt de 1-2 μL). Aceste rezultate preliminare indică potențialul semnificativ al utilizării SUPRAS ca agent de extracție în procesele de pregătire a probelor complexe de mediu sau biologice.

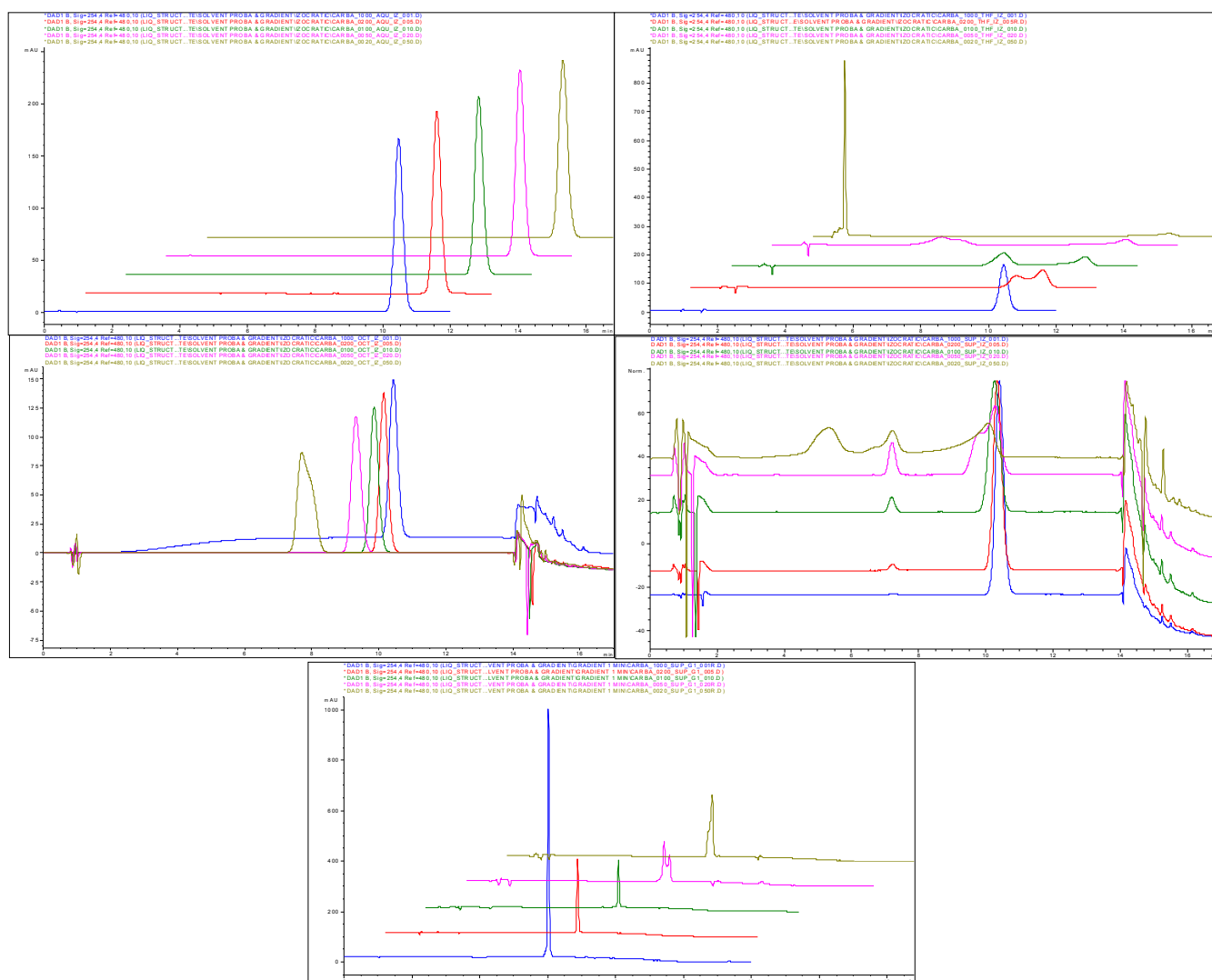


Figura 9. Injecții de volume crescătoare a 1 µg carbazepină dizolvată în (a) apă; (b) THF; (c) Octanol; (d) SUPRAS în condiții izocratice și (e) SUPRAS în condiții de eluție în gradient.

Concluzii generale

În perioada 16 Decembrie 2014 – 15 Decembrie 2015, echipa proiectului a realizat 2 articole publicate în reviste cotate ISI, după cum urmează:

1. P. Lazăr, S. Udrescu, F. Tache, F. Albu, N. Grinberg, A. Medvedovici, Revisting large volume injection in non-miscible diluents: an on-line reversed phase supported liquid extraction / liquid chromatography scenario, Analytical Methods (2015) 7(1) 342-352. I.F.=1.821
2. F. Micăle, F. Albu, E.E. Iorgulescu, A. Medvedovici, F. Tache, Ethyl lactate as a greener alternative to acetonitrile in RPLC: A realistic appraisal, Journal of Chromatographic Science (2015) 53(10) 1701-1707. I.F.=1.363

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

Publicația 1. O4A1;

Publicația 2. O1A2; O2A1;

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

Simpozion 1. International Workshop "Food Chemistry & Engineering", Ovidius University of Constanța, Faculty of Applied Sciences and Engineering - România, Mai 15-16, 2015; conferință plenară: Green chromatographic assay of PAHs in dietary supplements and foodstuff (A. Medvedovici, F. Micăle, F. Tache), Book of Abstracts: KN1 - pg. 7.

Simpozion 2. 1st International Conference "From science to guidance and practice,, 19-21 Octombrie 2015, București - România; conferință plenară: Chromatographic approaches for evaluation of the hydrophobic characteristics of chemical compounds with emphasis on newly developed separation mechanisms (A. Medvedovici, V. Voicu), Book of Abstracts: - pg. 1, 56. ISBN: 978-973-708-854-3.

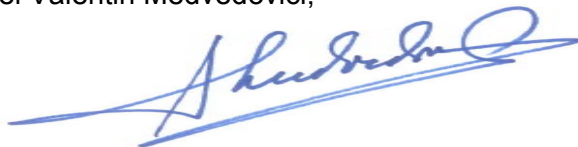
Publicațiile și conferințele plenare amintite anterior contribuie și la obiectivul O5A1, O5A2 al proiectului, privitor la diseminarea rezultatelor cercetării. Publicațiile de mai sus includ la secțiunea *Acknowledgements* referirea la grantul de cercetare în derulare. Prezentările Power Point ale conferințelor plenare amintite conțin pe ultima planșă 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/lvihplc/index.htm>. Prezentările la conferințele menționate au fost postate, în integralitate, pe același site.

Gestionarea și actualizarea permanentă a site-ului proiectului răspunde în egală măsură Obiectivului 5.

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). Varianta în limba Engleză a prezentului Raport Științific este disponibilă pe site-ul proiectului.

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

PAPER

Cite this: *Anal. Methods*, 2015, 7, 342

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

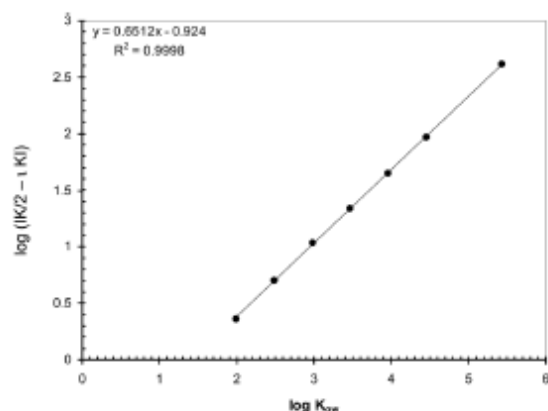


Fig. 5 Functional relationship established between the absolute values of the slopes of the linear regressions relating the apparent retention factor (k_{app}) to the reduced injected volume ($V_{inj}V_0^{-1}$) and the log K_{ow} of the studied compounds.

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.

Article

Ethyl Lactate as a Greener Alternative to Acetonitrile in RPLC: A Realistic Appraisal

Florina Micăle¹, Florin Albu^{1,2}, Emilia-Elena Iorgulescu¹,
Andrei Medvedovici¹, and Florentin Tache^{1,*}

¹Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Bucharest, #90 Panduri Av., Bucharest 050663, Romania, and ²Analytical Application Laboratory, Agilrom, # 40S Th. Pallady Ave., Bucharest 032266, Romania

*Author to whom correspondence should be addressed. Email: ftache_m@yahoo.com

Received 17 September 2014; Revised 24 April 2015

Abstract

Appropriate substitution of acetonitrile (ACN) in mobile phases for reversed-phase liquid chromatography (RPLC) by low toxicity, ecologically friendly alternative solvents emerges as a greener approach in separation sciences. Ethyl lactate is considered as a green solvent in organic synthesis, industrial extraction processes and many other applicative fields. Its ability to substitute ACN in mobile phases for RPLC applications was barely investigated. The feasibility of such a replacement was tested for the separation of the mixture of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons listed by the Environmental Protection Agency. The analytical approach was found to be achievable, with some compromises in terms of elution order, peak efficiency and UV detectability. Thermodynamic aspects of the chromatographic process were also comparatively assessed. Correlations between the elution order and some molecular descriptors were also discussed.

Introduction

The sense of a “green” chromatographic solvent expresses the goal to minimize the environmental impact resulting from its use in the separation process. The degree of greenness of an organic solvent is provided by its environmental, health and safety (EHS) properties and the life cycle assessment (LCA) (1, 2).

Chromatographic techniques have the potential to be greener during all steps of the analysis, from sample collection and preparation to separation and final determination. The approaches to get greener separations differ according to the type of chromatography. In liquid chromatography, the main direction focuses on the reduction of solvent consumption and replacement of toxic and environmentally hazardous solvents with more benign alternatives (3). The most popular green solvents are water, supercritical carbon dioxide (CO₂) and ionic liquids. In spite of the increasing interest, less attention was given to bio-based solvents and today some of them are already commercialized, i.e., propylene carbonate, ethyl lactate (EL) and D-limonene (4).

The reduction in solvent consumption has been already discussed (5), and some environmental friendly solvents have been also used: water (6), ethanol or iso-propanol (7), supercritical CO₂ (8) and propylene carbonate (9–11).

EL is one of the most promising candidates among the known alternative green organic solvents (12, 13). It is *in vivo* readily metabolized to ethanol and lactic acid due to the esterase enzymatic activity. The ecotoxicity of EL is also very low, as it rapidly and completely undergoes biodegradability. In case of vapor release, EL is a non-ozone-depleting fluid. Its production from carbohydrate feedstock as starting materials makes it economically attractive. EL has been successfully used in industrial extractive processes (14), as dispersion solvent in magnetic tape coating (15), as co-solvent in organic synthesis (16, 17) or surfactantless microemulsions (18) and constituent in skin protective formulations. A single report about the use of EL as an organic modifier in reversed-phase liquid chromatography (RPLC) was identified in the existing literature (19). The application refers to the separation of paracetamol, aspirin and caffeine in pharmaceutical products. The content of EL in the mobile phase was limited to 10%, the separation required acidic addition in the eluent (3% acetic acid) and the column was thermostated at 60°C.

The aim of the present work was to have a deeper insight about the possibility of ACN replacement by EL in RPLC applications. The set of the analytes was increased to 16 and consists in a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The elution was carried out at

Table II. Functional Correlation Between Molecular Descriptors and Experimental Retention Data Obtained Under ACN and EL Elution Conditions

Organic modifier	Descriptor Function	M_w $M_w = f(\log k)$	V_w $V_w = f(\log k)$	$\log P$ $\log P = f(\log k)$	S $\log S = f(\log k)$	χ $\chi = f(\log k)$	F $F = f(\log k)$	L/B $L/B = f(\log k)$
ACN	Mean r_{xy}	0.9941	0.9918	0.9937	-0.9701	0.9964	0.9974	0.3540
	St dev	0.0010	0.0017	0.0009	0.0007	0.0006	0.0010	0.0111
EL	Mean r_{xy}	0.9800	0.9852	0.9865	-0.9584	0.9832	0.9874	0.4367
	St dev	0.0040	0.0043	0.0024	0.0048	0.0021	0.0023	0.0156

The functional correlation is expressed as the mean value of the correlation coefficients (r_{xy}) considering retention data under the different tested mobile phase compositions.

n-octanol and water ($\log P$). Well-known geometrical descriptors for PAHs are the van der Waals volume (V_w) and the van der Waals surface area (A_w). Other descriptors refer to the molecular shape (length to breadth ratio— L/B) or to the molecular topology (the connectivity index— χ and the correlation factor— F). More often, by plotting the experimental retention factors versus these descriptors and finding the descriptors that produce the highest correlation, one can determine the most important factors controlling retention (23, 24).

Our aim was to compare correlations obtained between some molecular descriptors (Supplementary Material, Part I) and the retention behavior of PAHs under ACN and EL elution conditions. If such correlations do not substantially differ, one can consider that the shift from ACN to EL in the mobile phase composition does not alter interactions of the studied compounds with the stationary phase. Correlation data are given in Table II.

One can observe that linear relationships were obtained between the considered molecular descriptors and the logarithms of the retention factors, except for L/B . Better correlations are always obtained when ACN is used as an organic modifier. However, correlations obtained under EL elution conditions are not significantly lower, meaning that interactions solutes-stationary phase are basically the same fact that confirms also the thermodynamic aspects before mentioned.

If assuming that the chromatographic separation of the target compounds is driven by hydrophobic interactions and also considering the experimental findings with respect to enthalpy/entropy compensation (illustrating that the replacement of the organic modifier has little influence on the analyte/stationary phase interactions), the reversal of the elution order from some compounds under EL/water elution conditions merits at least a tentative explanation. The reversal of the elution order arises among D/C, M/L, and O/P/N compounds (illustrating a change in selectivity under EL/water elution conditions) characterizes analytes with very similar or identical $\log P$ (for instance, compounds M and L have $\log P$ -values of 5.52, whereas compounds N, O and P have $\log P$ -values of 6.22). However, their water solubilities are different (Supplementary Material, Part SI). Information about their solubilities in ACN and EL is missing in the existing literature, in order to assess some correlations with the elution order. It may be possible that the specific different solubilities in the mobile phases (ACN/water and EL/water, respectively) are responsible with the reversal in the elution order within some groups of compounds characterized by very similar or identical $\log P$.

Conclusion

Replacement of ACN by EL in mobile phases for RPLC appears to be feasible. This may be considered an useful issue in the actual general tendency of greening chromatographic processes. EL is fully miscible with water and produces pressure drop regimes accepted by the usual available instrumentation existing on the market. For the tested

solutes, similar retention was obtained in mobile phases containing ~15 % of less EL compared with ACN-based ones. However, for a similar selectivity of the separation process, ~20–25% of less EL compared with the ACN elution conditions is needed. Although optimized selectivity with EL in the mobile phase does not differ substantially from that obtained under ACN elution conditions, the required duration of the separation process is larger. As observed from the Van Deemter plot, the increased resistance to the mass transfer in the mobile phase, when using EL, imposes working conditions close to the optimal speed of the eluent through the column, further increase in the flow rate generating an important reduction of efficiency. Two major drawbacks make ACN replacement by EL to be considered with precautions. The first one refers to detection reasons: the cutoff wavelength of EL is significantly much higher than that of ACN. Consequently, when using UV detection, especially for rich organic modifier mobile phase compositions and for separation of solutes lacking of chromophores, detectability under EL elution conditions may be fully compromised. When monitoring chromatograms at lower analytical wavelengths, under EL gradient elution conditions, the shift of the baseline and the noise will seriously affect the analytical results. The second drawback refers to the lack of availability (at least for the moment) on the market of chromatographic grade EL. Another sensible issue, which was not addressed in this work, deals with the chemical stability of EL under using acidic or alkaline conditions in the mobile phases. To conclude, ACN replacement by EL in mobile phases used in liquid chromatography is possible, but should be considered with precaution.

Supplementary material

Supplementary materials are available at *Journal of Chromatographic Science* (<http://chromsci.oxfordjournals.org>).

Funding

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

Conflict of interest statement. None declared.

References

- Capello, C., Fischer, U., Hungerbühler, K.; What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents; *Green Chemistry: An International Journal and Green Chemistry Resource*, (2007); 9: 927–934.
- Clark, J.H., Tavener, S.J.; Alternative solvents: shades of green; *Organic Process Research and Development*, (2007); 11: 149–155.