

Raport stiințific

privind implementarea proiectului în perioada Octombrie 2011 – Octombrie 2013

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

Obiectiv general: Studiul procesului de injecție a unui volum mare de probă constituită într-un solvent organic nemiscibil cu faza mobilă în cromatografia de lichide cu mecanism de separare în fază inversă. Modelarea procesului și parametrizarea acestuia. Identificarea aplicațiilor analitice care pot utiliza cu succes tehnica propusă. Soluții de implementare on-line/automatizare în practica analitică curentă.

Condiții experimentale:

Analizi țintă: metoprolol bază (log P = 1,69); 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);

Faze staționare pentru mecanism de separare în fază inversă: silicagel modificat cu radicali octadecil dublu end-capped; silicagel modificat chimic cu radicali octil dublu end-capped; silicagel modificat cu radicali octadecil prin intermediul unui linker polar; silicagel monolitic modificat cu radicali octadecil end-capped; silicagel modificat cu radicali fenil; silicagel modificat cu radicali pentafluorofenil.

Coloane cromatografice: a) **Zorbax Eclipse XDB- C18**, 15 cm × 4,6 mm i.d. × 5 μm d.p.; b) **Zorbax SB-Aq**, 15 cm × 4,6 mm i.d. × 5 μm d.p.; c) **Chromolith C18**, 10 cm × 4,6 mm i.d. d) **Zorbax Eclipse XDB-C8**, 15 cm × 4,6 mm i.d. × 5 μm d.p.; e) **Betasil Phenyl**, 15 cm × 4,6 mm i.d. × 5 μm d.p.; f) **Luna PFP**, 10 cm × 4,6 mm i.d. × 3 μm d.p.; **Zorbax SB-C18**, 5 cm × 4,6 mm i.d. × 1,8 μm d.p.

Solvenți organici nemiscibili cu faza mobilă (diluente): acetat de butil (log P = 1,78); tetraclorură de carbon (log P = 2,83); 1-octanol (log P = 3,00); ciclohexan (log P = 3,44); n-hexan (log P = 3,29); izooctan (log P = 4,09) heptan (log P = 4,66); decan (log P = 5,01); dodecan (log P = 6,10).

Faza mobilă: soluție apoasă 50 mM formiat de amoniu și 0,2% TEA la pH=3 cu acid formic și acetonitril în raport volumetric 9/1 (pentru metoprolol); apă/acetonitril în raport volumetric 6/4 (pentru parabeni). Gradienții de tip treaptă la 100% acetonitril se aplică doar pentru eliminarea zonei de solvent nemiscibil din coloană și nu influențează retenția analiților țintă.

Detecție: UV la 254 și 280 nm.

Proiectare experimentală: pentru metoprolol - se injectează volumele crescătoare (1, 5, 10, 20, 50, 75, 100 μL) de analit în diluenții acetat de etil, tetraclorură de carbon, octanol, ciclohexan și hexan, exploatând coloanele cromatografice la debite diferite (0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 2; 2,5; 3 mL/min) și temperaturi diferite (15; 25; 35; 45; 55 °C); pentru parabeni - se injectează volumele crescătoare (1, 5, 10, 20, 50, 75, 100 μL) de analiții solubilizați în diluenții hexan, heptan, izooctan, decan și dodecan, la un debit de 1,5 mL/min și 25 °C.

Parametri măsurați:

- timpul mort al coloanei cromatografice în condițiile de exploatare (t_0 , se determină prin observarea timpului absolut de retenție a azotatului de potasiu, soluție apoasă 1000 ppm, injecție monitorizată la 210 nm);

- timpul absolut corespunzător picului de metoprolol (t_R^M);

- factorul de retenție corespunzător picului de metoprolol ($k = (t_R^M - t_0)/t_0$);
- eficiența procesului cromatografic aferentă eluției metoprololului, măsurată prin numărul de talere teoretice asociate picului în cauză ($N = (t_R^M)^2/\sigma^2$); σ este abaterea standard asociată populației valorilor timpilor de retenție asociate picului cromatografic și se calculează prin măsurarea lărgimii picului cromatografic la jumătate din înălțimea sa - $w_{1/2}$ ($s = w_{1/2}/2,355$);
- factorul de asimetrie asociat picului cromatografic, măsurat la 0,1 din înălțimea sa ($FA = b/a$, unde b este măsurat pe o paralelă la linia de bază trasată la 0,1 din înălțimea picului cromatografic și este determinat ca fiind segmentul la intersecția înălțimii coborâte din vârful picului pe această paralelă și latura descrescătoare a picului, iar a este măsurat pe o paralelă la linia de bază trasată la 0,1 din înălțimea picului cromatografic și este determinat ca fiind segmentul dintre latura crescătoare a picului cromatografic și intersecția înălțimii coborâte din vârful picului pe aceasta);
- factorul de trenă USP, notat TF ($TF = (a+b)/2 \times a$, unde a și b au semnificațiile sus-amintite, cu singura diferență că se vor măsura la 0,05 din înălțimea picului cromatografic);
- asimetria picului (skewness) notată cu sk ; sk poate căpăta valori negative dacă picul cromatografic înregistrează un fenomen de "fronting", sau pozitive dacă picul cromatografic înregistrează un fenomen de "tailing". O valoare sk nulă indică o distribuție oarecum egală în raport cu media, aceasta neimplicând însă o simetrie perfectă. sk -ul unei variabile aleatoare X reprezintă cel de-al treilea moment standardizat, notat cu γ și definit ca $\gamma = E[(X-\mu)^3]/\sigma$, unde μ este media, σ este abaterea standard, iar E este operatorul de estimare a unei variabile aleatoare (ca medie ponderată a tuturor valorilor posibile a variabilei, $E[X] = \sum_{i=1}^{\infty} (x_i \times p_i)$, p_i reprezentând ponderile valorilor concrete x_i).
- valorile $V_{inj}^{(k=0)}$ reprezentând volumul de injecție extrapolat la retenție nulă și care corespund, din punct de vedere fenomenologic, cu volumul de diluent care saturează întreaga fază staționară din coloana cromatografică.
- valorile $k^{(V_{inj}=0)}$ reprezentând intersecția ecuației regresiei liniare $k = f(V_{inj})$ cu ordonata ($V_{inj}=0$) și corespunzând retenției analitului în condițiile ipotetice a lipsei unui diluent de injecție.
- s-au trasat dependențele funcționale van't Hoff ($\ln k = f(1/T)$) pentru metoprolol, pentru determinarea contribuției entalpice (ΔH^0) și entropice (ΔS^0) la retenția cromatografică.

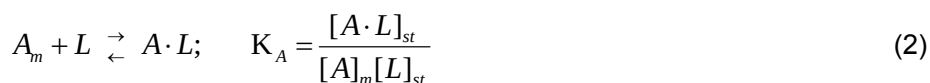
Rezultate obținute din datele experimentale:

- a) se observă o scădere riguros liniară a factorului de retenție pentru analiții studiați cu volumul injectat de probă în cazul tuturor diluenților nemiscibili cu faza mobilă și în cazul tuturor condițiilor experimentale aplicate;
- b) se pot obține picuri acceptabile cromatografic (sub aspectul eficienței și simetriei) și atunci când $\log P$ diluent < $\log P$ analit, dar în acest caz volumul de injecție maxim admis este mai redus decât în situația în care $\log P$ diluent > $\log P$ analit;
- c) se observă o scădere a eficienței cromatografice pentru picul de analit odată cu creșterea volumului injectat. Funcțional vorbind, scăderea eficienței poate fi după caz, liniar descrescătoare sau quadratic descrescătoare, în raport cu volumul de probă injectat. Pierderea de eficiență depășește întotdeauna valoarea corespunzătoare reducerii lungimii utile a coloanei cromatografice datorate reținerii diluentului;
- d) se observă o creștere liniară a lărgimii picului cromatografic în raport cu volumul injectat;
- e) dependența simetriei picului cromatografic cu volumul de probă injectat este mai complexă. În multe din cazuri, simetria picului cromatografic nu este afectată de volumul injectat. În cazul diluenților al căror $\log P$ este comparabil cu al analiților,

- efectul de fronting este relativ frecvent. În cazul diluenților al căror log P este sensibil mai mare decât al analiților, efectul de tailing este mai frecvent;
- prin compararea pantelor regresiiilor liniare ilustrând relația funcțională $k = f(V_{inj})$ în cazul utilizării de debite crescătoare pentru coloanele luate în discuție, se poate destul de ușor observa că aceasta nu este semnificativă. Se poate deci concluziona că debitul fazei mobile nu are un efect semnificativ la injectia de volume mari de probă în diluenți nemiscibili cu faza mobilă;
 - s-a studiat relația care se stabilește între valoarea pantelor regresiiilor liniare $k = f(V_{inj})$ și a valorilor logP pentru diluenții utilizați, pentru diferite faze staționare. S-a putut observa că variabilitatea determinată de logP diluent pe o anumită fază staționară este mai mică decât variabilitatea determinată de natura fazei staționare prin raportare la un anumit diluent. În acest context, se poate observa că faza staționară PFP funcționează similar indiferent de valoarea log P a diluentului. Observațiile de mai sus arată destul de clar că nu numai interacția hidrofobă este cea care determină reținerea diluentului la suprafața fazei staționare;
 - în mod paradoxal, creșterea temperaturii face ca frontul de diluent să ocupe o lungime mai mică din coloana cromatografică;
 - contribuțiile entalpice (pantele) calculate din reprezentările funcției van't Hoff pentru analitul considerat pe o anumită fază staționară nu se modifică cu volumul injectat. Contribuția entropică (interceptul) scade proporțional cu volumul injectat.

Discuții:

O parte din observațiile anterioare sunt mai greu explicabile prin modelul propus de directorul de proiect în publicația sa, Medvedovici A. et al., *Retention phenomena induced by large volume injection of solvents non-miscible with the mobile phase in reversed phase liquid chromatography*, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 30, 199-213 (2007). Modelul are la bază teoria adsorbției diluentului la nivelul fazei staționare, cu saturarea unei părți a acesteia la intrarea în coloana cromatografică. Mecanismul de adsorbție pornește de la echilibrele implicând interacțiile dintre ligandul hidrocarbonat, notat cu L (spre exemplu, lanțul alchil imobilizat la suprafața silicagelului) și diluent, respectiv analit. Analitul (A) difuzează în afara frontului de injecție a diluentului S în faza mobilă (m), în acord cu echilibrul (1). Analitul și diluentul competiționează în procesul de adsorbție la nivelul ligandului hidrocarbonat (L) din faza staționară, după echilibrele (2) și (3),



unde indexul *st* și *m* se referă la faza staționară, respectiv la cea mobilă.

Din cauza cantității mari de diluent S încărcat în coloană și a caracterului acestuia mai pronunțat hidrofob prin comparație cu A, echilibrul (2) se deplasează spre dreapta, iar echilibrul (3) spre stânga, până când toată cantitatea de diluent este adsorbită la nivelul ligandului L. Când diluentul are o vâscozitate semnificativ mai mare decât cea a fazei mobile, aceasta din urmă penetrează în frontul diluentului prin fenomenul de canelare vâscoasă, implicând apariția unor zone cu mobilitate sporită prin comparație cu poziția normală a frontului. Drept consecință, pot apărea distorsiuni ale profilului de eluție în zona terminală a picului cromatografic. Astfel, o porțiune din faza staționară (ΔV) la intrarea în coloana cromatografică devine disponibilă doar pentru diluent. ΔV este proporțional cu V_{inj} , după relația $\Delta V = \gamma \cdot V_{inj}$, prin intermediul unei constante de proporționalitate γ . În consecință, analitul A participă la mecanismul de retenție în coloana cromatografică doar în faza staționară rămasă disponibilă, având un volum egal cu $V_{st} - \gamma \cdot V_{inj}$ (considerând volumul

inițial al fazei staționare V_{st}). În baza acestor considerații, relația funcțională dintre factorul de retenție a analitului A (k_A) și V_{inj} , pentru o fază mobilă de volum V_m , este ilustrată de relația de mai jos:

$$k_A = K_A \cdot \frac{V_{st}}{V_m} - \gamma \cdot \frac{K_A}{V_m} \cdot V_{inj} \quad (3')$$

Această relație indică o scădere liniară a retenției analitului cu volumul de probă injectat, fapt care a fost riguros observat experimental.

Cu toate acestea, există observații experimentale care nu sunt explicate în totalitate prin modelul propus (în acest sens, pot fi enumerate observațiile b, c, f, h). De aceea s-a dorit formularea unui nou model care să explice mai bine rezultatele experimentale.

Procesul de injecție de volume mari de probă în diluenți nemiscibili cu faza mobilă poate fi împărțit în următoarele etape consecutive (ilustrate și în Figura 1):

- (I) umplerea coloanei cu proba constituită în solventul nemiscibil (etapele A, B din Figura 1). Notății: diluent nemiscibil – ISS; analit – A; fază staționară – F.S.; fază mobilă – F.M.; L – lungimea coloanei; F – debit fază mobilă; t_0 – timp mort; V_0 – volum mort; u – viteza de deplasare a fazei mobile. Procesul se poate parametriza astfel: volumul probei poate varia de la 0 la V_{inj} ; timpul de umplere cu probă poate varia de la 0 la $t_{endfill}$, unde $t_{endfill} = V_{inj}/F$; dispersia spațială a diluentului și analitului în capul coloanei cromatografice poate varia de la 0 la $L/(V_{inj}/V_0)$. Dispersia analitului și a diluentului în lungul coloanei cromatografice la sfârșitul duratei de umplere se poate în consecință scrie:

$$X_{A,max}^L = X_{ISS,max}^L = \frac{V_{inj}}{V_0} \times L = \alpha \times L; \text{ unde } \alpha \text{ este volumul de injecție redus } \frac{V_{inj}}{V_0} \quad (4)$$

În egală măsură, dispersia maximă a diluentului și analitului în coloană se obține la $t_{endfill}$, dat de relația:

$$t_{endfill} = \frac{V_{inj}}{F} = \alpha \times \frac{V_0}{F} = \alpha \times t_0 \quad (5)$$

Deplasarea frontului interfeței între diluent și faza mobilă este egală cu viteza de deplasare a fazei mobile:

$$u = \frac{F}{S} = \frac{L}{t_0} = \frac{V_0}{S \times t_0}; \text{ unde } S \text{ este secțiunea efectivă de curgere a F.M.} \quad (6)$$

Forma și dispersia spațială a analitului în zona formată este aceeași ca cea a ISS. Profilul de concentrație a analitului, de formă rectangulară, poate fi corectat în raport cu valoarea inițială, datorită "diluției" ISS cu radicalii hidrocarbonați din faza staționară.

$$C_{ISS+F.S.}^A = C_0 \times \frac{S}{S + S_0} = C_0 \times \frac{1}{1 + \gamma^0} \quad (7)$$

unde S_0 este secțiunea din coloană ocupată de F.S., C_0 este concentrația inițială a analitului în diluentul nemiscibil, iar γ^0 reprezintă raportul volumelor F.S. și F.M. în coloana cromatografică.

- (II) Penetrarea F.M. în zona ocupată de ISS determină două viteze de deplasare (a frontului dintre F.M. și ISS+A și a frontului dintre ISS+A și F.M.) – Figura 1C. Se poate defini un parametru suplimentar γ , ca fiind raportul între secțiunea de curgere în care ISS acoperă sub formă de film F.S., notată cu S_1 și secțiunea eficace de curgere a F.M. în absența ISS, notată cu S. Cea mai simplă modelare a procesului presupune formarea în timp și spațiu a unui film uniform de ISS. Drept consecință, dispersia spațială a ISS va crește, în comparație cu situația existentă la sfârșitul perioadei de umplere (injecția propriu-zisă). Constanta de

distribuție (K_D) a analitului A între ISS și F.M. va juca un rol important în această etapă.

În procesul de formare a canalelor de curgere a F.M. prin zona de ISS+A, apar două viteze de dispersie, respectiv u (cea de deplasare a interfeței (ISS+A)/F.M.) și u_1 cea de penetrare a F.M. dinspre capul coloanei cromatografice. Ca urmare, dispersia spațială a zonei de ISS crește până când penetrarea F.M. prin zona de ISS este finalizată. În consecință, se poate calcula diferența între vitezele de deplasare a celor două fronturi Δu , după cum urmează:

$$\Delta u = u_1 - u = \frac{F}{S_1} - \frac{F}{S} = \frac{F}{\gamma \times S} - \frac{F}{S} = \frac{(1-\gamma)}{\gamma} \times \frac{F}{S} = \frac{(1-\gamma)}{\gamma} \times u \quad (8)$$

Timpul de penetrare a ISS de către F.M. va fi:

$$t_{ISS,max}^{II} = \frac{\alpha \times \gamma}{1-\gamma} \times \frac{L}{u} = \frac{\alpha \times \gamma}{1-\gamma} \times t_0; \text{daca } \iota = \frac{1}{1-\gamma} \text{ atunci} \quad (9)$$

$$t_{ISS,max}^{II} = \alpha \times \gamma \times \iota \times t_0$$

Timpul total scurs de la momentul începerii injectiei propriu-zise și până în momentul în care F.M. penetrează zona de ISS va fi:

$$t_{ISS,max}^{I+II} = \alpha \times t_0 + \frac{\alpha \times \gamma}{1-\gamma} \times t_0 = \alpha \times \iota \times t_0 \quad (10)$$

Dispersia spațială a ISS la sfârșitul procesului de penetrare a F.M. este

$$X_{ISS,max}^{II} = \alpha \times L + t_{ISS,max}^{II} \times u = \alpha \times \left(1 + \frac{\gamma}{1-\gamma}\right) \times L = \frac{\alpha}{1-\gamma} \times L = \alpha \times \iota \times L \quad (11)$$

Volumul maxim al zonei de ISS este dat de relația:

$$V_{ISS,max} \frac{\alpha}{1-\gamma} \times V_0 = \alpha \times \iota \times V_0$$

- (III) Extracția și focalizarea analitului în F.M.; canalele de curgere a F.M. prin zona de ISS sunt formate (Figura 1D); zona de dispersie a ISS în coloană este maximă și se va considera de acum încolo constantă; viteza de curgere a F.M. prin zona de dispersie a ISS este mai mare decât cea de deplasare a F.M. în coloana cromatografică neocupată de ISS; zona de focalizare a analitului depinde de geometria curgerii și de cinetica procesului de extracție; oricum, procesul de focusare este avantajat de micșorarea vitezei de deplasare datorată creșterii secțiunii de curgere, imediat după depășirea zonei acoperite de ISS.

Relația de conservare a debitului masic poate fi scrisă astfel:

$$(S - S_1) \times C_{A,F.M.} \times (u_1 - u_{AT}) = S_1 \times C_{A,ISS} \times u_{AT} \quad (12)$$

unde u_{AT} este viteza de deplasare a analitului în frontul de F.M. care penetrează zona de ISS. Ecuția (12) poate fi rescrisă:

$$\frac{u_1 - u_{AT}}{u_{AT}} = \frac{1-\gamma}{\gamma} \times K_D \quad (13)$$

care prin rearanjare duce la:

$$u_{AT} = \frac{1}{\gamma + K_D \times (1-\gamma)} \times u \quad (14)$$

Viteza de compresie a zonei analitului Δu este în consecință:

$$\Delta u = u_{AT} - u = \frac{1-\gamma - K_D \times (1-\gamma)}{\gamma + K_D \times (1-\gamma)} \times u \quad (15)$$

Extensia spațială maximă a zonei posterioare în canalul de curgere a F.M. (unde concentrația analitului tinde către 0 atât în ISS cât și în F.M.), notată W_{Void}^{III} , va fi dată de relația:

$$W_{Void}^{III} = u_{AT} \times t_{ISS, \max}^{II} = \frac{\alpha \times \gamma}{(1 - \gamma) \times (\gamma + K_D \times (1 - \gamma))} \times L \quad (16)$$

Relația de mai sus conduce la calculul zonei de dispersie a analitului din spatele frontului de străpungere a ISS de către F.M., notat $W_{A,Fin}^{III}$:

$$W_{A,Fin}^{III} = \frac{\alpha \times K_D}{\gamma + K_D \times (1 - \gamma)} \times L \quad (17)$$

- (IV) Această etapă debutează cu pătrunderea frontului de F.M. conținând analit în zona în care F.S. nu este acoperită de ISS (Figura 1D). Procesul este similar cu injecția unui volum mare de analit conținut în F.M. într-o coloană cromatografică exploatată în mecanism de fază inversă. Relația de conservare a debitului masic poate fi scrisă astfel:

$$S \times (u - u_{AF}) \times C_{A,F.M.} = S_0 \times u_{AF} \times C_{A,F.S.} \quad (18)$$

unde u_{AF} este viteza de deplasarea a frontului de analit "re-injectat" în restul de coloană neocupat de ISS.

Rearanjarea relației (18) duce la:

$$u_{AF} = \frac{1}{1 + K_A \times \gamma^0} \times u \quad (19)$$

unde K_A este constanta de repartiție a analitului A între F.S. și F.M., iar γ^0 este raportul volumelor F.S. și respectiv F.M.

Durata virtuală de re-injecție a analitului în coloana rămasă disponibilă va fi:

$$t_{inj}^* = \frac{W_{A,Fin}^{III}}{u_{AT}} = \alpha \times K_D \times t_0 \quad (20)$$

Volumul virtual de re-injecție va fi:

$$V_i^* = F \times t_{inj}^* = \frac{V_0}{t_0} \times \alpha \times K_D \times t_0 = \alpha \times K_D \times V_0 \quad (21)$$

Lărgimea frontului de analit în zona de re-injecție se va calcula după relația:

$$W_{A,\max}^* = u_{AF} \times t_{inj}^* = \frac{\alpha \times K_D}{1 + K_A \times \gamma^0} \times L \quad (22)$$

Lungimea coloanei rămasă disponibilă pentru separarea cromatografică propriu-zisă este:

$$L^* = L - \frac{\alpha}{1 - \gamma} \times L - \frac{1}{2} \times \left(\frac{\alpha \times K_D}{1 + K_A \times \gamma^0} \right) \times L = \left[1 - \alpha \times \iota - \frac{1}{2} \times \left(\frac{\alpha \times K_D}{1 + K_A \times \gamma^0} \right) \right] \times L \quad (23)$$

"Timpul de retenție cromatografic" va fi deci o fracție din timpul de retenție a analitului pe coloana cromatografică de lungime L, în urma unei injecții conduse în manieră obișnuită (de ex. solventul probei este chiar F.M.).

$$t_R^* = \left[1 - \alpha \times \iota - \frac{1}{2} \times \left(\frac{\alpha \times K_D}{1 + K_A \times \gamma^0} \right) \right] \times t_R = \left[1 - \alpha \times \iota - \frac{1}{2} \times \left(\frac{\alpha \times K_D}{1 + K_A \times \gamma^0} \right) \right] \times (k + 1) \times t_0 \quad (24)$$

Din observațiile anterioare, se poate ușor calcula timpul de retenție aparent al analitului, adică timpul scurs din momentul injecției sale în sistem până la momentul detecției sale:

$$t_R^{ap} = t_{ISS, \max}^{I+II} + \frac{t_{inj}^*}{2} + t_R^* \quad (25)$$

Prin înlocuirea în expresia de mai sus a relațiilor (10), (20) și (24) se ajunge la următoarea egalitate:

$$\frac{t_R^{ap}}{t_0} = 1 + k - \alpha \left[\iota \times k + \frac{K_D}{2} \times \left(\frac{k + 1}{1 + K_A \times \gamma^0} - 1 \right) \right] \quad (26)$$

Cum $K_A \times \gamma^0$ este în fapt chiar k , iar $(t_R^{ap}/t_0)-1=k^{ap}$, se ajunge la o dependență evident liniară între factorul de retenție aparent și V_{inj} .

$$k^{ap} = k - \alpha \times I \times k = k \times \left(1 - \frac{V_{inj}}{V_0} \times \frac{S_0}{S_0 - S_1} \right) \quad (27)$$

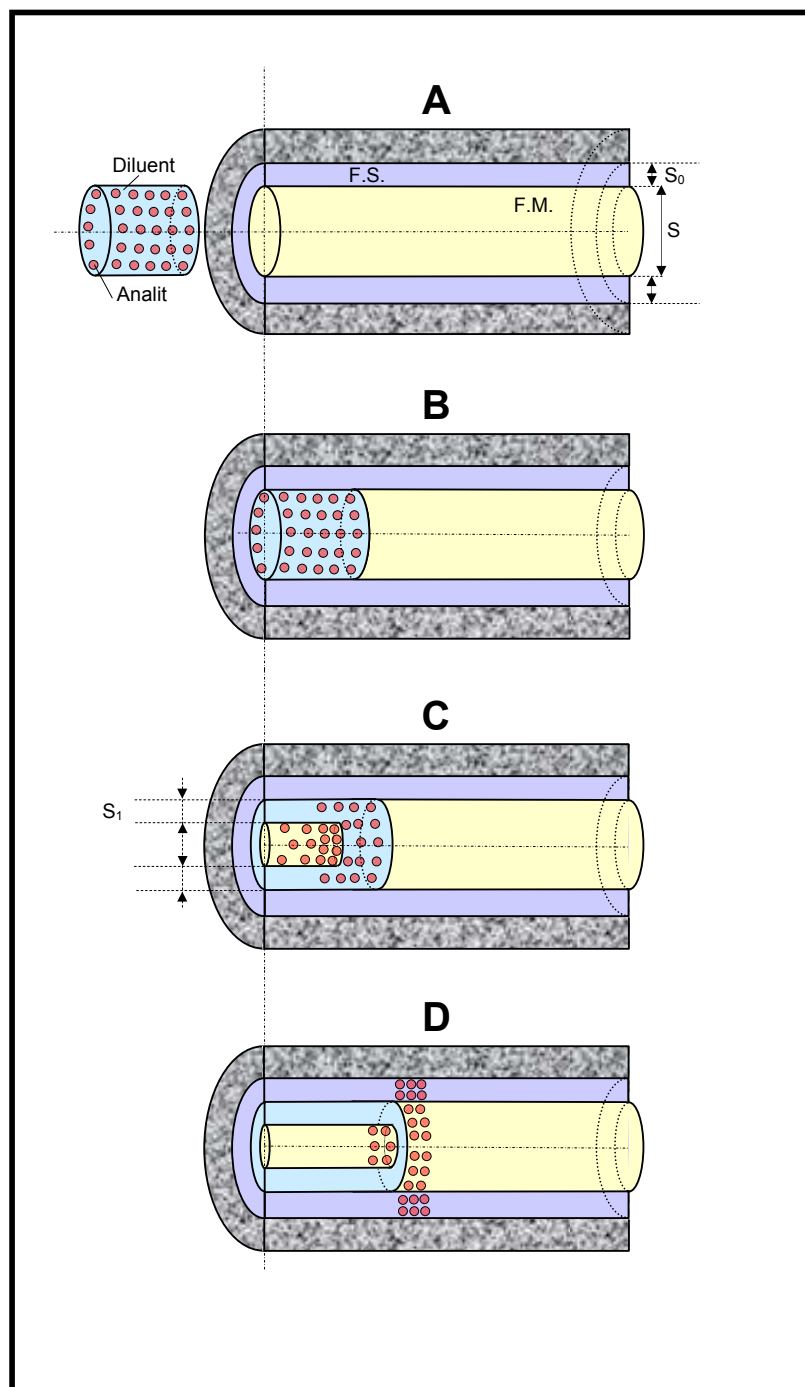
Dincolo de relația (27), care în principiu explică, la fel ca și relația (3'), dependența experimentală liniară dintre factorul de retenție aparent și volumul injectat, modelul nou propus implică realizarea a două procese analitice distincte și consecutive. Primul proces analitic poate fi numit "reversed SLE", se realizează la intrarea în coloană și este cuplat on-line cu separarea cromatografică.

Procesul SLE (Solid Liquid Extraction) a fost introdus relativ recent în practica bioanalitică și presupune extracția lichid-lichid a analitului de interes între o fază apoasă (fluidul biologic) imobilizată la suprafața silicagelului și o fază organică nemiscibilă cu apa. În esență SLE a câștigat teren în practica experimentală curentă datorită capabilităților foarte mari de automatizare a procesului, în comparație cu extracția lichid-lichid clasică (LLE). În procesul de injecție de volume mari de probă constituită în solvenți organici nemiscibili cu faza mobilă dedicat mecanismului de fază inversă, diluentul apolar se va fixa, la intrarea în coloană, la nivelul fazei staționare, la rândul său apolar. Faza mobilă, mai polară și nemiscibilă cu diluentul imobilizat, va funcționa ca fază extractantă într-un proces LLE. Analitul extras de faza mobilă va fi re-injectat și focusat într-o coloană cromatografică a cărei lungime s-a redus cu exact lungimea zonei de realizare a procesului SLE. Este de remarcat faptul că, în cazul unui analit având caracter apolar similar diluentului, cinetica procesului de extracție dinamică lichid-lichid este nefavorabilă (trecerea analitului în faza mobilă se realizează lent) dar este compensată de focusarea analitului în faza staționară, la trecerea în zona de coloană rămasă liberă. Tot așa, un analit polar se va focusa rapid în frontul de fază mobilă care penetrează zona diluentului imobilizat, dar nu va suferi un fenomen similar la contactul cu faza staționară din porțiunea de coloană cromatografică rămasă liberă. Toate aceste procese explică aparenta independență (determinată experimental) a procesului de injecție de volume mari de diluenți nemiscibili cu faza mobilă în raport cu debitul fazei mobile, și favorizarea acestui proces de parametrul temperatură. Acest model explică în egală măsură invarianța factorului entalpic determinată din studiul van't Hoff. Condiționarea de realizare a procesului în raport cu relația logP analit versus logP diluent, deși semnificativă, nu mai are rolul determinant, ca în modelul precedent. În sfârșit, modelul nou propus revine la un proces cromatografic în fază inversă explicat (în manieră clasică) prin repartiție și nu prin adsorbție.

Pentru a concluziona, procesul de injecție de volume mari de diluenți nemiscibili cu faza mobilă reprezintă o manieră practică de cuplare on-line a procesului RSLE (reversed solid liquid extraction) cu cromatografia de lichide în fază inversă (RPLC).

În concluzie, obiectivul 2/activitatea 1 (perfecționarea modelului teoretic) prevăzută pentru anul 2013 a fost atins. Obiectivul 1, activitatea 7, a fost și el abordat, atâta vreme cât studiul pentru metoprolol s-a realizat și pe o coloană de tip monolitic. Activitatea 8 (studiul procesului pe faze staționare polimerice) nu a fost atins, deoarece reducerea finanțării nu a mai permis procurarea coloanelor cromatografice respective. Obiectivul 3/activitatea 1, legat de modalități de evaluare experimentală a logP din procesul de injecție de volume mari de diluenți nemiscibili cu faza mobilă a fost și el atins în studiul procesului aplicat la seria omologă a alchil-parabenilor. Modelul experimental discutat în prealabil deschide noi oportunități în această direcție (pentru scenariul în care diluentul este 1-octanolul, faza staționară este un silicagel modificat cu radicali octadecil imobilizați prin linker hidrofil, faza mobilă este apa, coloana cromatografică funcționează doar de post de coloană SLE). Obiectivul 5/activitatea 2 a fost implicit atins prin explicitarea modelului experimental, atâta vreme cât este explicat prin cuplarea on-line a RSLE cu RPLC. Obiectivul 6/activitatea 2 a fost atins prin publicațiile efectuate (a se vedea completarea în platforma on-line de evaluare a proiectului).

Figura 1. Etapele de realizare a procesului on-line RSLE/RPLC, considerat a modela coerent injecția de volume mari de diluenți nemiscibili cu faza mobilă.



20 Octombrie 2013

Director proiect,