

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE
ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN CHIMIE

TEZĂ DE DOCTORAT

Mecanismul de separare în cromatografia de lichide
prin perechi ionice:
Studiul comportării unor oxime cu caracter cationic

Doctorand
Florea (căsătorită Rădulescu)
Medeea - Ioana

Conducător doctorat
Prof. Dr. Victor David

Comisia de doctorat:

Președinte: Prof. Dr. Camelia Bala, Directorul Școlii Doctorale în Chimie
din Universitatea din București

Conducător doctorat: Prof. Dr. Victor David

Referenți oficiali:

1. Prof. Dr. Andrei Medvedovici, de la Universitatea din București
2. Conf. Dr. Costel Sârbu, de la Universitatea Babeș-Bolyai Cluj-Napoca
3. C.P. I Dr. Dan Florin Anghel, de la Institutul de Chimie-Fizica „Ilie Murgulescu”, Academia Română

2012

CUPRINS

Capitolul 1. Teoria mecanismului de retenție în faza inversă bazat pe formare de perechi ionice..	3
1.1. Descrierea mecanismului de retenție în faza inversă.....	4
1.1.1. Introducere.....	4
1.1.2. Faze staționare utilizate în retenția cromatografică în fază inversă.....	5
1.1.2.1. Generalități.....	5
1.1.2.2. Modele de faze staționare utilizate în cromatografia de lichide în faza inversă....	8
a) Modelul fazei staționare ca un strat lichid hidrocarbonat.....	8
b) Modelul fazei staționare hidrocarbonate de tip „lichid-cristalin”.....	10
c) Modelul fazei staționare hidrocarbonate de tip „amorf-cristalin”.....	11
d) Modelul monostratului hidrocarbonat de tip adsorbant.....	12
e) Modelul lanțurilor hidrocarbonate izolate și solvate.....	13
1.1.3. Faze mobile utilizate în retenția cromatografică în faza inversă.....	14
1.1.4. Modele de retenție în cromatografia de lichide în fază inversă.....	16
1.1.4.1. Modelul partiției.....	17
1.1.4.2. Modelul adsorbției.....	19
1.1.4.3. Modelul adsorbției componentelor fazei mobile.....	21
1.1.4.4. Modelul solvofobic.....	22
1.2. Descrierea mecanismului de retenție în fază inversă bazat pe formare de perechi ionice.....	25
1.2.1. Introducere.....	25
1.2.2. Agenți formatori de perechi ionice.....	26
1.2.3. Modele teoretice pentru explicarea comportării analiților în mecanismul bazat pe formare de perechi ionice.....	29
1.2.3.1. Introducere.....	29
1.2.3.2. Modelul electrostatic - noțiuni teoretice în cromatografia de lichide în fază inversă cu formare de perechi ionice.....	32
□ Conceptul de potențial electrostatic al suprafeței și teoria stratului dublu electric Gouy-Chapman.....	33
□ Factorul de retenție în cromatografia cu formare de perechi ionice.....	36
□ Izoterma de adsorbție a agentului formator de perechi ionice.....	38
□ Modelul electrostatic simplificat.....	39
1.2.3.3. Modelul partiției – noțiuni teoretice în cromatografia de lichide în fază inversă cu formare de perechi ionice.....	42
1.2.4. Factorii ce influențează retenția în mecanismul bazat pe formare de perechi ionice (conform modelului electrostatic).....	45
1.2.4.1. Efectul sarcinii electrice a ionului analitului și a agentului formator de perechi ionice.....	45
1.2.4.2. Efectul hidrofobității agentului formator de perechi ionice.....	46
1.2.4.3. Efectul concentrației și naturii modificatorului organic din faza mobilă.....	47
1.2.4.4. Influența electrolitului din faza mobilă.....	49
1.2.4.5. Efectele fazei staționare.....	51
a. Dimensiunea porilor fazei staționare.....	51
b. Capacitatea de adsorbție a împachetării fazei staționare.....	51
c. Disocierea grupărilor silanol.....	52
1.2.4.6. Efectul pH-ului fazei mobile.....	53

Capitolul 2. PARTEA EXPERIMENTALĂ.....	55
2.1. Studiu preliminar privind mecanismul de retenție prin perechi ionice aplicat la compuși polari.....	55
2.1.1. Problematika studiului.....	55
2.1.2. Condiții experimentale.....	60
2.1.3. Rezultate și discuții.....	62
Influența concentrației de modificador organic din faza mobilă.....	63
Influența concentrației API din faza mobilă.....	68
Influența hidrofobicității API din faza mobilă.....	73
Influența pH-ului componentei apoase a fazei mobile.....	75
2.1.4. Concluzii asupra studiului.....	81
2.2. Studiul retenției unor oxime cationice prin mecanism RP-IPC.....	82
2.2.1. Problematika oximelor.....	82
2.2.2. Studiul unor oxime pe o fază staționară C18 Zorbax Eclipse XDB.....	84
2.2.2.1. Problematika studiului.....	84
2.2.2.2. Condiții experimentale.....	86
2.2.2.3. Rezultate și discuții.....	87
Influența concentrației modificadorului organic din faza mobilă asupra retenției cromatografice.....	87
Influența concentrației API asupra retenției cromatografice.....	98
Influența hidrofobicității API din faza mobilă asupra retenției cromatografice.....	103
Influența pH-ului asupra retenției cromatografice.....	106
Influența temperaturii asupra retenției cromatografice.....	110
2.2.2.4. Concluzii asupra studiului.....	115
2.2.3. Studiul oximelor pe o fază staționară C18 Zorbax ODS.....	115
2.2.3.1. Problematika studiului.....	115
2.2.3.2. Condiții experimentale.....	119
2.2.3.3. Rezultate și discuții.....	120
Influența concentrației modificadorului organic din faza mobilă asupra retenției cromatografice.....	120
Influența concentrației API asupra retenției cromatografice.....	125
Influența hidrofobicității API din faza mobilă asupra retenției cromatografice.....	127
Influența pH-ului asupra retenției cromatografice.....	129
Influența temperaturii asupra retenției cromatografice.....	131
2.2.3.4. Concluzii asupra studiului.....	132
2.2.4. Mecanismul de retenție HILIC ca alternativă la mecanismul RP-IPC aplicat oximelor cationice.....	132
2.2.4.1. Problematika studiului.....	132
2.2.4.2. Condiții experimentale.....	133
2.2.4.3. Rezultate și discuții.....	134
2.2.4.4. Concluzii asupra studiului.....	138
2.3. Alegerea acizilor biliari ca formatori de perechi ionice în RP-IPC.....	139
2.3.1. Problematika studiului.....	142
2.3.2. Condiții experimentale.....	142
2.3.3. Rezultate și discuții.....	142
Influența concentrației de modificador organic din faza mobilă.....	143
Influența hidrofobicității API asupra retenției cromatografice.....	146
Influenta pH-ului asupra retenției cromatografice.....	146
Influența tăriei ionice asupra retenției cromatografice.....	147

2.3.4. Concluzii asupra studiului.....	149
2.4. Aplicarea mecanismului RP-IPC pe alți compuși cationici (clasa lichidelor ionice).....	149
2.4.1. Problematika studiului.....	149
2.4.2. Condiții experimentale.....	153
2.4.3. Rezultate și discuții.....	154
Influența concentrației de modifcatorului organic asupra retenției cromatografice....	154
Influența tăriei ionice asupra retenției cromatografice.....	157
Influența hidrofobicității API asupra retenției cromatografice.....	158
2.4.4. Concluzii asupra studiului.....	162
2.5. Aplicații analitice ale mecanismului de separare prin perechi ionice.....	162
2.5.1. Separarea și determinarea cantitativă a substanțelor active din Algifen, soluție injectabilă.....	162
2.5.1.1. Problematika studiului.....	162
2.5.1.2. Condiții experimentale.....	163
2.5.1.3. Rezultate și discuții.....	165
2.5.1.4. Concluzii asupra studiului.....	170
2.5.2. Determinarea unor derivați ai 4,4'-bipiridilului prin RP-IPC.....	171
2.6. Concluzii.....	175
Bibliografie.....	177
Anexa.....	181

Capitolul 2. PARTEA EXPERIMENTALĂ

2.1. Studiu preliminar privind mecanismul de retenție prin perechi ionice aplicat la compuși polari

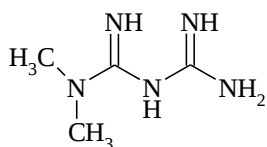
2.1.1. Problematika studiului

Cromatografia de lichide în fază inversă care utilizează varianta eluției ce decurge după un mecanism bazat pe formarea de perechi ionice are un număr mare de aplicații în ceea ce privește analiza compușilor ionici sau disociabili. Principiul acestui mecanism constă în faptul că analitul în formă ionică va interacționa cu un contraion, formând o pereche de ioni, care se va distribui între cele două faze. Astfel, perechea de ioni este caracterizată de o hidrofobicitate sporită, contribuția fiind adusă, de regulă, de către contraionul care participă la formarea de perechii respective de ioni.

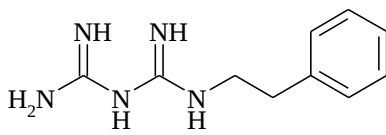
Retenția în cromatografia de lichide în fază inversă a analiților ionici sau disociabili este un proces complex care depinde de numeroși factori cum ar fi concentrația și hidrofobicitatea agentului formator de pereche ionică, concentrația modifierului organic, natura modifierului organic, tăria ionică, natura fazei staționare, pH-ul fazei mobile.

După cum a fost detaliat în capitolul teoretic, procesul de retenție în RP-IPC este descris de două modele principale și, anume, modelul partiției și cel electrostatic. Cu toate că aceste modele teoretice ne oferă o perspectivă diferită asupra interacției dintre analit și faza staționară, ele pot fi utilizate în mod complementar pentru a explica diferite efecte pe care le pot avea parametrii experimentali asupra procesului de retenție în RP-IPC.

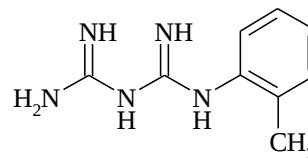
Compușii investigați în studiul de față au fost aleși atât datorită importanței lor farmaceutice, cât și datorită capacității lor de a forma perechi ionice, capacitate dată de caracterul lor puternic polar. În **Fig. 2.1.1.** sunt prezentate structurile acestor compuși.



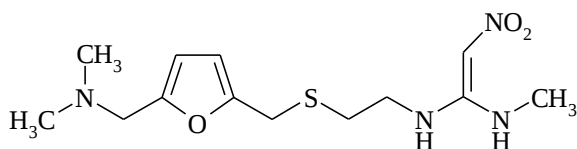
Metformin



Fenformin



Tolilformin



Ranitidina

Fig.2.1.1. Structurile compușilor investigați prin RP-IPC : metformin, fenformin, tolilformin și ranitidină.

Conform modelului electrostatic al mecanismului cu formare de perechi ionice descris în capitolul teoretic, factorul de retenție al unui analit încărcat electric $A^{\pm z_A}$ cu sarcina z_A , în prezența unui API, cu sarcina z_{API} , prezent în faza mobilă într-o anumită concentrație, C_{API} , se relaționează cu factorul său de retenție în absența API, k^0 , prin ecuația:

$$\ln k' = \ln k^0 + \left(\frac{-z_A z_{IPA}}{z_{IPA}^2 + 1} \right) \left[\ln \left(\frac{n_0 K_{IPA} C_{IPA}}{\kappa} \right) + \ln \left(\frac{F^2}{RT \varepsilon_0 \varepsilon_r} \right) + 1 \right] \quad (2.1.2)$$

unde k' reprezintă factorul de retenție în prezența API, k^0 reprezintă factorul de retenție în absența API, z_A - sarcina analitului A, z_{API} - sarcina API, κ - inversul lungimii Debye (m^{-1}), n_0 - capacitatea monostratului (mol/m^3), C_{API} - concentrația API în faza mobilă, K_{API} - constanta de adsorbție, dată de ecuația (1.27); ε_0 este permitivitatea electrică a vidului, ε_r este constanta dielectrică a fazei mobile, F - constanta Faraday (C/mol); T - temperatura absolută (K); R - constanta gazelor (J/mol K).

2.1.3. Rezultate și discuții

Influența concentrației de modificador organic din faza mobilă

Dependența factorului de retenție de concentrația de modificador organic din faza mobilă este descrisă prin ecuația următoare:

$$\log(k') = \log(k')_w + \sum_{i=1}^2 \alpha_i C_m^i \quad (2.1.7)$$

unde α_i reprezintă parametrii regresiei.

Dependența liniară ($i = 1$) este valabilă pe un interval limitat al compoziției fazei mobile. Studiarea întregului domeniu arată că majoritatea analiților prezintă un comportament neliniar la ambele capete ale intervalului. Se presupune faptul că abaterea de la liniaritate se datorează modificării solvătării fazei staționare în prezența unei faze predominant apoase.

În figurile **Fig.2.1.4**, **2.1.5** pot fi urmărite dependențele ($\log k'$ vs. C_m) pe un interval de concentrație a modificatorului organic cuprins între 30 și 55% MeOH, pentru doi dintre cei patru compuși analizați. Aceste dependențe au fost urmărite în cazul utilizării hexansulfonatului drept API, la diferite concentrații ale acestuia, cuprinse între 5mM și 50mM, în mediu acid.

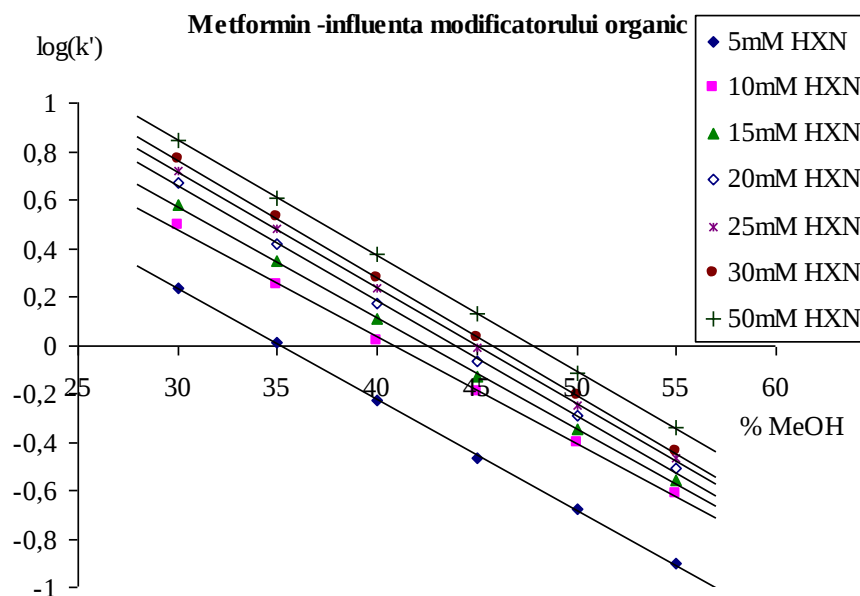


Fig.2.1.4. Dependențele $\log(k')$ vs %MeOH obținute pentru soluția de metformin analizată prin RP-IPC pe coloana Zorbax Eclipse XDB C18, F.M. Aq (0,1% H_3PO_4 + x mM $C_6H_{13}SO_3Na$) + MeOH

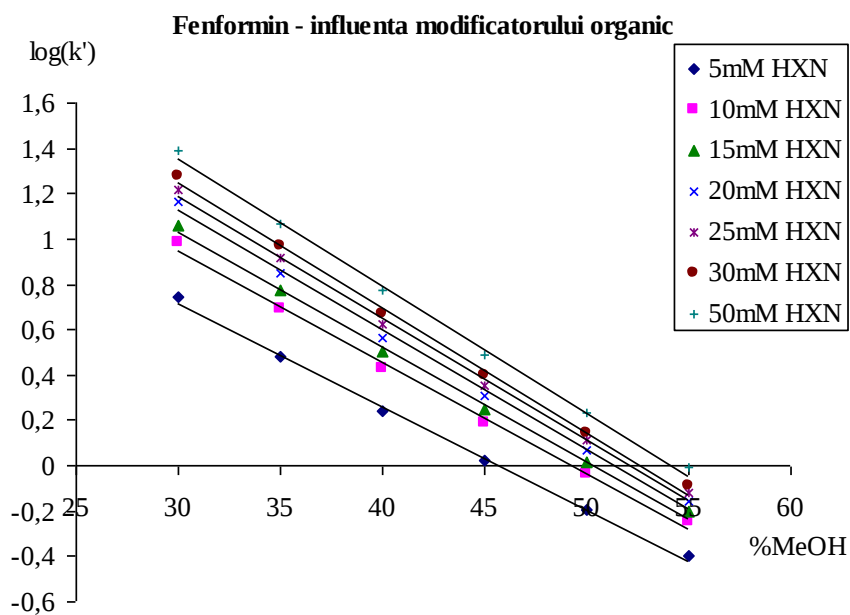


Fig.2.1.5. Dependențele $\log(k')$ vs %MeOH obținute pentru soluția de fenformin analizată prin RP-IPC pe coloana Zorbax Eclipse XDB C18, F.M. Aq (0,1% H_3PO_4 + x mM $C_6H_{13}SO_3Na$) + MeOH

Se poate observa faptul că, în intervalul studiat, aceste dependențe sunt liniare, timpii de retenție scăzând odată cu creșterea concentrației de modificador organic din faza mobilă.

Utilizând ecuațiile descrise anterior, din regresiile obținute experimental, s-au putut estima coeficienții de partiție apă – n-octanol din date de retenție cromatografică pentru perechile ionice formate de analiți cu hexansulfonatul de sodiu. A fost tabelată, de asemenea, și valoarea $\log P$ calculată cu ajutorul softului EPI Suite (ținând cont de faptul că valoarea teoretică este calculată în lipsa oricăror agenți formatori de perechi ionice). Rezultatele pot fi urmărite în Tabelul 2.1.1.

Tabel 2.1.1. Valori ale coeficienților de partiție apă – n-octanol obținute din date de retenție cromatografică, prin mecanism cu formare de perechi ionice
API : Hexansulfonat de sodium

Analit	5mM	10mM	15mM	20mM	25mM	30mM	50mM	log P ^{EPI} Suite
Metformin								
log k' _w	1.6003	1.7947	1.9449	2.0739	2.1441	2.2181	2.2742	-2.6399
log P	1.7953	1.9897	2.1399	2.2689	2.3391	2.4131	2.4692	
R ²	0.9996	0.9989	0.9994	0.9992	0.9997	0.9998	0.9999	
Fenformin								
log k' _w	2.0745	2.4128	2.5478	2.7019	2.7909	2.89	3.0293	-0.6522
log P	2.2695	2.6078	2.7428	2.8969	2.9859	3.085	3.2243	
R ²	0.9982	0.9965	0.9975	0.996	0.997	0.9969	0.9972	
Tolilformin								
log k' _w	2.3913	2.8024	2.9445	3.1199	3.2216	3.337	3.4929	1.0514
log P	2.5863	2.9974	3.1395	3.3149	3.4166	3.532	3.6879	
R ²	0.9969	0.9951	0.9961	0.9948	0.9960	0.9960	0.9967	
Ranitidina								
log k' _w	2.2041	2.5871	2.7631	2.934	3.0204	3.1335	3.2563	0.2938
log P	2.3991	2.7821	2.9581	3.129	3.2154	3.3285	3.4513	
R ²	0.9932	0.9905	0.9929	0.9912	0.9931	0.9930	0.9937	

Influența concentrației API din faza mobilă

Pentru observarea efectului pe care îl are concentrația API asupra retenției cromatografice a compușilor în cauză, s-a adăugat în faza apoasă hexansulfonat de sodiu de diferite concentrații, cuprinse între 5 și 50mM.

Menținând ceilalți parametri ai ecuației (2.1.2) constanți, dependența factorului de retenție de concentrația API ar trebui să fie una logaritmică, având panta de 0,5, pentru cazul în care atât analitul, cât și API sunt monovalenți ($\frac{Z_A Z_B}{Z_A^2 + 1} = -\frac{1}{2}$). Ecuația se poate scrie sub forma:

$$\ln k' = \chi + \frac{1}{2} \ln C_{API} \quad (2.1.8)$$

unde χ este o constantă ce depinde de hidrofobicitatea și sarcina electrică a ionilor analitului și, respectiv, a ionilor API, de modificatorul organic și de tăria ionică.

Parametrii de regresie obținuți pentru diferite compoziții ale fazei mobile, cuprinse între 30% și 55% MeOH, se regăsesc în Tabelul 2.1.2.

Tabelul 2.1.2. Parametrii de regresie pentru dependențele $\ln k'$ vs. $\ln C_{IPA}$ (API: HXN) pentru diferite compoziții ale fazei mobile.

% MeOH	Intersecția (χ)	Panta	R ²
Metformin			
30	-0.344	0.611	0.9716
35	-0.862	0.602	0.9801
40	-1.415	0.601	0.9852
45	-1.890	0.576	0.9663
50	-2.301	0.537	0.9557
55	-2.784	0.530	0.9333
Fenformin			
30	0.705	0.650	0.9917
35	0.192	0.590	0.9938
40	-0.263	0.526	0.9977
45	-0.672	0.464	0.9961
50	-1.079	0.414	0.9948
55	-1.498	0.382	0.9918
Tolilformin			
30	1.082	0.719	0.9915
35	0.499	0.652	0.9951
40	0.003	0.576	0.9987
45	-0.438	0.502	0.9990
50	-0.857	0.439	0.9991
55	-1.275	0.394	0.9980

Ranitidină			
30	0.444	0.720	0.9861
35	-0.281	0.677	0.9895
40	-0.853	0.597	0.9966
45	-1.326	0.524	0.9947
50	-1.759	0.464	0.9933
55	-2.220	0.432	0.9868

Aceste dependențe pot fi utilizate pentru a estima valoarea extrapolată a factorului de retenție al analitului în prezența API, atunci când API este în concentrație de 1mol/L; pentru această concentrație, valoarea $\ln C_{API}$ devine 0 și valoarea $\ln k'$ devine χ .

Influența concentrației API din componenta apoasă a fazei mobile și formele picurilor cromatografice pot fi urmărite în figura următoare. Creșterea concentrației hexansulfonatului de sodiu în componenta apoasă a fazei mobile conduce la o creștere a timpilor de retenție cromatografică; picurile își mențin simetria, dar înălțimea lor scade, eluând într-un interval mai mare de timp (devin mai late).

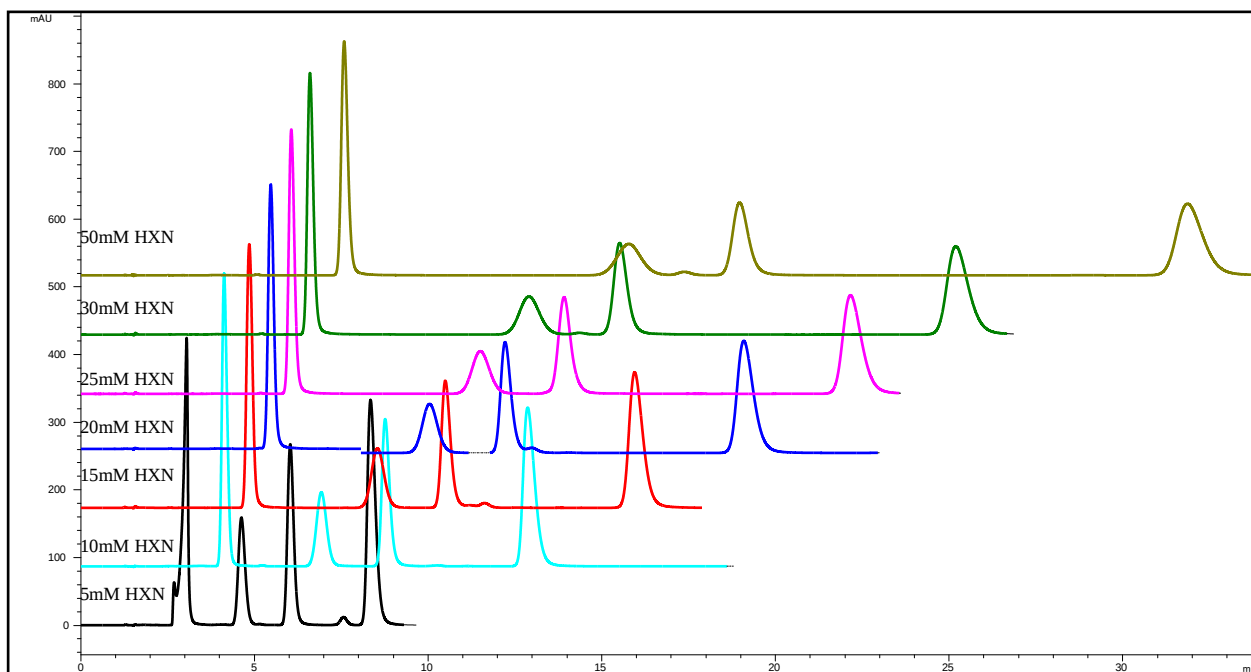


Fig.2.1.12. Alura cromatogramelor suprapuse obținute pentru soluțiile de biguanidine analizate prin RP-IPC pe coloana Zorbax Eclipse XDB C18, F.M. 65%Aq (0,1% H_3PO_4 + x mM $C_6H_{13}SO_3Na$) + 35%MeOH

Influența hidrofobicității API din faza mobilă

Pentru observarea efectului pe care îl are hidrofobicitatea API asupra retenției cromatografice a biguanidinelor, în faza apoasă au fost adăugați patru agenți formatori de perechi

ionice : pentan-, hexan-, heptan- și, respectiv, octan- sulfonat de sodiu, de concentrație 10 mM. Hidrofobicitatea API crește odată cu creșterea numărului de atomi de C, astfel că și valorile factorilor de retenție vor crește în același mod. Dependențele logaritmicilor zecimali ai factorilor de retenție în funcție de numărul de atomi de C sunt liniare, cu un factor de corelație destul de bun, după cum se poate observa în **Fig.2.1.13**.

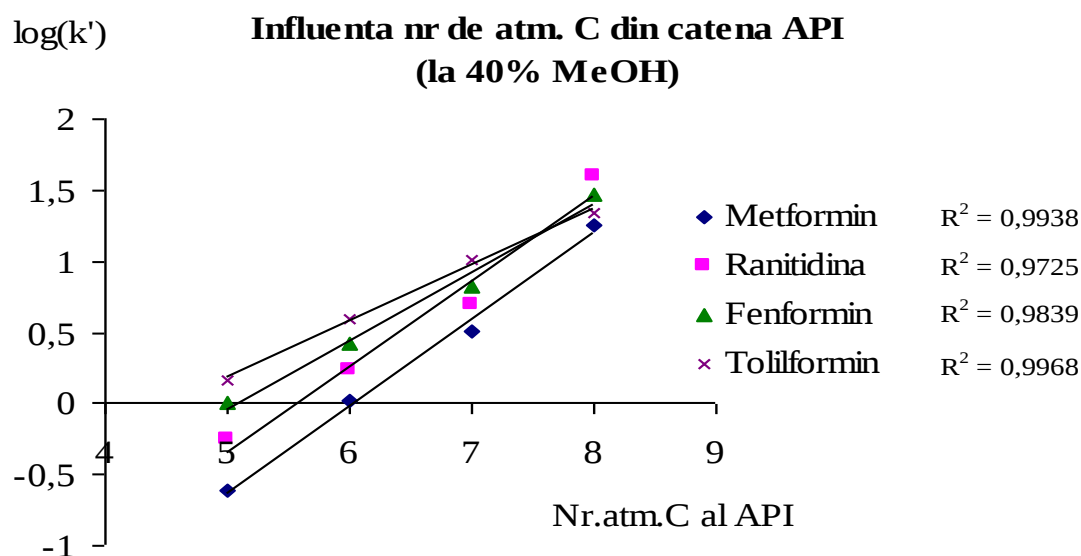


Fig.2.1.13. Dependențele liniare $\log(k')$ vs. numărul de atomi de C din molecula API pentru cei patru compuși investigați prin RP-IPC

Influența pH-ului componentei apoase a fazei mobile

Efectul pH-ului componentei apoase a fost studiat într-un interval cuprins între 1,2 și 8. Soluțiile au fost realizate utilizând 0.1% soluție de acid fosforic de concentrație 85% și aduse la pH-ul dorit cu o soluție de 10% KOH.

Au fost obținute forme sigmoide ale dependențelor retenției de valoarea pH-ului pentru mai multe compoziții ale fazei mobile, mai ales în cazurile în care conținutul de modificador organic din faza mobilă a fost scăzut (35, 40 și, respectiv, 45% MeOH). Rezultatele obținute au fost în acord cu modelul partiției, procesul putând fi descris prin ecuația:

$$k_A^{API} = k_A^0 + k_{A^+API^-} \frac{K_b 10^{-pH}}{K_w + K_b 10^{-pH}} \quad (2.1.9)$$

În **Fig.2.1.15**, este ilustrat un exemplu al formei obținute pentru metformin. Se poate observa faptul că valorile experimentale situate în intervalul de pH 3-7 pot fi fitate cu ajutorul

funcției Boltzmann. Acest comportament de retenție poate fi explicat bine prin modelul partiției. Dacă intervalul de pH se extinde de la 2 la 8, se poate observa o curbă sigmoidală dublă pentru compuşii menționați, care poate fi explicată prin posibilitatea protonării a două grupări $=NH$ ale moleculei respective, ducând la formarea unei perechi duble, de tipul $AH_2^{2+}(API^-)_2$. Această dublă pereche formată de analit cu anionul alchil-sulfonat este mai hidrofobă decât o pereche ionică simplă, de tipul AH^+API^- , și se poate forma la pH-uri foarte acide (între 1 și 2).

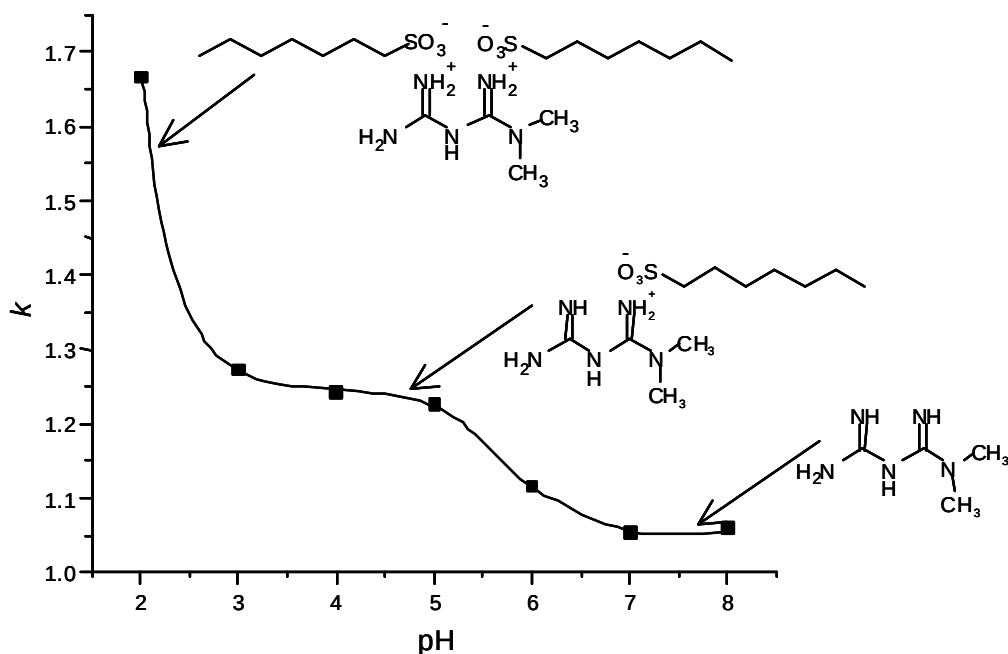


Fig.2.1.15. Dependentele (k') de pH-ul componentei apoase obținute pentru metformin prin RP-IPC pe coloana Zorbax Eclipse XDB C18, F.M. 65%Aq (10 mM $C_7H_{15}SO_3Na$) + 35%MeOH

Creșterea retenției fenforminului, tolilforminului și ranitidinei la $pH > 7$ se poate explica prin deprotonarea grupărilor bazice ale moleculei, nemaiavănd loc procesul de formare de perechi ionice. Pentru $pH > 7$ aceste molecule participă la procesul de retenție ca molecule libere conform unui mecanism de fază inversă, având loc interacții hidrofobe între structurile hidrocarbonate din moleculele lor și lanțurile hidrocarbonate ale fazei staționare C18. Acest efect a fost observat și pentru metformin, dar creșterea retenției sale a fost mai puțin semnificativă, deoarece cele două grupări metil sunt mai puțin implicate în astfel de interacții.

2.1.4. Concluzii asupra studiului

Parametrii studiați pentru cei patru compuși ce conțin grupări funcționale bazice prin mecanism cu formare de perechi ionice, pot fi explicați atât prin modelul electrostatic, cât și prin cel al partiției. Efectele naturii API și a concentrației sale în faza mobilă sunt bine explicate prin

modelul electrostatic, dependențele prezise de acest model teoretic fiind utilizate cu succes în analiza compușilor; au fost obținute corelații bune pentru dependențele dintre parametri experimentali și rezultatele cromatografice prezise de modelul teoretic.

Cu ajutorul modelului partiției pot fi explicate bine efectele concentrației modificatorului organic și pH-ului componentei apoase, obținându-se corelații bune pentru dependențele dintre parametri experimentali și rezultatele cromatografice obținute. Aceste corelații pot fi utilizate pentru estimarea unor valori extrapolate ale datelor cromatografice obținute, care pot fi utilizate în caracterizarea perechilor ionice formate de analit cu API în ceea ce privește hidrofobicitatea acestora. Efectul pH-ului asupra retenției este un proces complex în cazul moleculelor ce conțin două sau mai multe grupări bazice și alte grupări funcționale cu efecte electronice asupra moleculei.

2.2. Studiul retenției unor oxime cationice prin mecanism RP-IPC

2.2.1. Problematika oximelor

Intoxicațiile cu substanțe neurotoxice organofosforice (OPh) reprezintă un subiect foarte important atât în context militar, cât și civil. În țările Lumii a III-a, acest tip de intoxicații cauzate de utilizarea pesticidelor este estimat ca atingând 1 milion de cazuri accidentale anual. În context militar, substanțele neurotoxice organofosforice au fost utilizate ca “arme” în războaiele chimice (gaze paralizante). Din cauza ușurinței cu care aceste substanțe se pot prepara, a utilizării lor de către grupări teroriste, dar și din cauza numărului mare de otrăviri accidentale ale muncitorilor din agricultură, a fost necesară o dezvoltare cât mai rapidă a substanțelor folosite drept antidot.

Tratamentul pentru intoxicațiile cu substanțe OPh se bazează pe administrarea substanțelor anticolinergice (ca, de exemplu, atropina), în combinație cu oximele piridinice și diazepamul (depresor al sistemului nervos central). Oximele reactivează AChE inhibată prin îndepărtarea compușilor OPh din structura sa. Deoarece substanțele OPh prezintă o toxicitate mai mare și acționează mai rapid decât majoritatea medicamentelor, este foarte important ca acțiunea oximelor utilizate drept antidot să fie una foarte rapidă și eficientă în procesul de dezintoxicare.

Datorită rolului unor agenți biochimici de a transporta acești reactivatori printr-un mecanism bazat pe formarea de perechi ionice, s-a considerat că posibilitatea unui studiu a acestui mecanism de separare cromatografică ar putea oferi informații suplimentare pentru aceste procese biochimice din organisme vii.

2.2.2. Studiul unor oxime pe o fază staționară C18 Zorbax Eclipse XDB

2.2.2.1. Problematika studiului

Studiul a avut în vedere urmărirea principalilor parametri care influențează timpul de retenție cromatografică al unor compuși cationici din clasa oximelor și corelarea valorilor experimentale obținute cu modelele teoretice care explică mecanismul de retenție cromatografică cu formare de perechi ionice (modelul electrostatic sau cel al partiției).

Structurile celor opt compuși ce aparțin clasei oximelor studiați în diferite condiții cromatografice, prin mecanism cu formare de perechi ionice sunt redată în figura următoare.

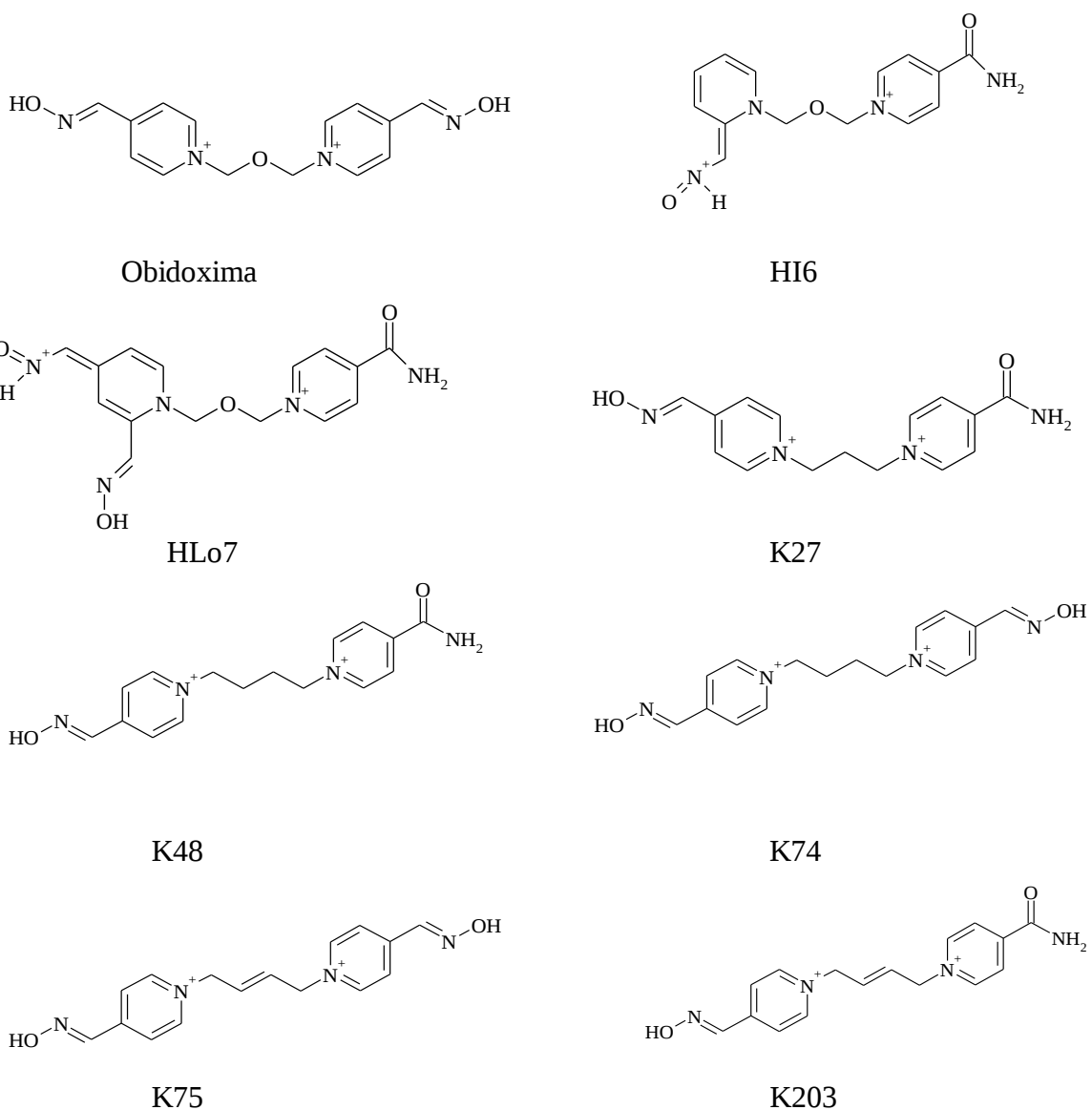


Fig.2.2.3. Structurile oximelor studiate prin RP-IPC pe coloana C18 Zorbax Eclipse XDB.

Studiul a fost realizat utilizând cromatograful de lichide Agilent Technologies, seria 1100, iar ca fază staționară s-a utilizat o coloană cromatografică C18 Zorbax Eclipse XDB (dimensiuni lungime 150 mm, diametrul intern 4,6 mm, dimensiunea particulelor 5 μm).

2.2.2.3. Rezultate și discuții

Influența concentrației modificatorului organic din faza mobilă asupra retenției cromatografice

Concentrația de metanol din faza mobilă influențează echilibrul de adsorbție al API pe siturile hidrofobe ale fazei staționare. De aceea, factorul de retenție cromatografică este dependent de conținutul de MeOH din faza mobilă.

În cromatografia de lichide în fază inversă, influența concentrației modificatorului organic asupra factorului de retenție este descrisă prin ecuația următoare:

$$\log(k') = \log(k')_w + \sum_{i=1}^2 \alpha_i C_m^i \quad (2.2.2)$$

unde α_i reprezintă parametrii regresiilor, C_m – concentrația modificatorului organic (în procente volumetrice).

Aceste dependențe au fost verificate atât în cazul unui pH acid (pH=2) utilizând 4 agenți formatori de perechi ionice (pentan-, hexan-, heptan- și, respectiv, octan-sulfonatul de sodiu), cât și pentru alte valori de pH (3, 4, 5 și, respectiv, 7), utilizând octansulfonatul de sodiu drept API.

➤ Pentru pH = 2 al componentei apoase, s-au obținut dependențe liniare, de tipul:

$$\log(k') = \log(k')_w + \alpha_1 C_m$$

pentru toți agenții formatori de perechi ionice utilizați.

Parametrii de regresie se regăsesc în Tabelul 2.2.1.a Intersecția acestor regresii liniare reprezintă valorile extrapolate ale logaritmilor zecimali ai factorilor de retenție pentru o fază mobilă ipotetică ce conține 100% apă, $\log(k')_w$, aceasta fiind proporțională cu constanta de partiție a perechii ionice respective între faza mobilă și cea staționară, pentru o anumită concentrație de API în faza mobilă și un anumit pH.

Tabel.2.2.1.a. Parametrii de regresie ai dependențelor liniare log(k') vs. %MeOH pentru cei 8 compuși analizați prin RP-IPC la un pH=2 al fazei apoase, utilizând diferiți agenți formatori de perechi ionice

API	Intersecția	Panta	R ²	API	Intersecția	Panta	R ²
Obidoxima				HI6			
PNT	2,3256	-0,0559	0,9792	PNT	2,3213	-0,0575	0,9669
HXN	3,4253	-0,0681	0,9788	HXN	3,0257	-0,0618	0,9879
HPT	3,3648	-0,0576	0,9843	HPT	3,2370	-0,0561	0,9937
OCT	4,2943	-0,0653	0,9993	OCT	4,0115	-0,0614	0,9992
HL07				K27			
PNT	2,5867	-0,0618	0,9557	PNT	2,3331	-0,0569	0,9732
HXN	3,5411	-0,0710	0,9526	HXN	3,6358	-0,0728	0,9548
HPT	3,3737	-0,0578	0,9824	HPT	3,5888	-0,0616	0,9909
OCT	4,1739	-0,0637	0,9993	OCT	-0,0624	4,1165	0,9993
K48				K74			
PNT	2,7684	-0,0658	0,9376	PNT	2,7407	-0,064	0,9476
HXN	3,1790	-0,0645	0,9884	HXN	3,2747	-0,0651	0,9823
HPT	3,1704	-0,0546	0,9760	HPT	3,5419	-0,0609	0,9780
OCT	4,0602	-0,0620	0,9993	OCT	4,1797	-0,0635	0,9997
K75				K203			
PNT	2,8053	-0,0656	0,9444	PNT	2,9373	-0,0693	0,9200
HXN	3,5753	-0,0711	0,9372	HXN	3,3307	-0,0674	0,9622
HPT	3,6113	-0,0621	0,9927	HPT	3,6699	-0,0640	0,9528
OCT	4,1274	-0,0629	0,9996	OCT	3,9957	-0,0611	0,9998

După cum se poate observa în tabelul de mai sus, au fost obținute corelații liniare nesatisfăcătoare în cazul utilizării pentan-, hexan și, respectiv, heptan- sulfonatului de sodiu drept agenți formatori de perechi ionice. Din acest motiv, datele experimentale au fost fitate cu ajutorul unei funcții sigmoide de tip Boltzmann (ecuația 2.2.3), în acest caz obținându-se factori de corelație mult mai mari ($R^2 > 0,99$), după cum se poate observa în Tabelul 2.2.1.b.

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{dx}}} \quad (2.2.3)$$

Ecuația Boltzman pentru $x = 0$ devine:

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{-x_0}{dx}}} \quad (2.2.4)$$

Dacă $\frac{x_0}{dx}$ este mare (>3) atunci numitorul acestei ecuații tinde la 1, iar y tinde la A_1 ; în

acest caz, din punct de vedere cromatografic, A_1 reprezintă $\log(k')_w$. Se poate observa faptul că această condiție este îndeplinită doar în cazul în care agenții formatori de perechi ionice utilizați sunt pentan-, hexan și, respectiv, heptan- sulfonatul de sodiu, nu și în cazul octansulfonatului de sodiu.

O altă observație ce poate fi făcută comparând parametrii obținuți din dependențele liniare și, respectiv, de tip Boltzmann, se referă la faptul că valorile $\log(k')_w$ obținute în cel de-al doilea caz sunt semnificativ mai scăzute.

Tabel.2.2.1.b. Parametrii de regresie ai dependențelor sigmoide $\log(k')$ vs. %MeOH pentru cei 8 compuși analizați prin RP-IPC la un pH =2 al fazei apoase, utilizând diferiți agenți formatori de perechi ionice

API	A_1	x_0	dx	x_0/dx	R^2	API	A_1	x_0	dx	x_0/dx	R^2
Obidoxima						HI6					
PNT	0,4108	107,980	20,599	5,2420	0,9994	PNT	0,0990	103,160	16,784	6,1463	0,9982
HXN	1,1672	112,460	22,038	5,1030	0,9968	HXN	0,7805	72,025	14,579	4,9403	0,9997
HPT	0,9467	63,954	9,016	7,0931	0,9995	HPT	1,2022	60,874	11,192	5,4391	0,9965
OCT	6,0601	111,420	60,724	1,8349	0,9996	OCT	4,9546	101,890	51,894	1,9634	0,9996
HLo7						K27					
PNT	0,0708	106,620	15,153	7,0362	0,9973	PNT	0,2188	99,312	17,662	5,6229	0,9988
HXN	0,6647	112,580	15,848	7,1037	0,9900	HXN	0,6577	108,910	15,350	7,0951	0,9949
HPT	0,5312	59,972	3,983	15,0562	0,9942	HPT	0,7796	65,745	8,408	7,8198	0,9997
OCT	7,4638	146,320	82,468	1,7743	0,9995	OCT	2,3232	63,005	16,569	3,8026	0,9996
K48						K74					
PNT	- 0,0683	106,520	12,927	8,2401	0,9956	PNT	0,0639	107,570	14,169	7,5919	0,9958
HXN	0,6468	65,863	11,218	5,8712	0,9997	HXN	1,0665	92,074	19,553	4,7089	0,9984
HPT	0,8830	102,090	16,060	6,3568	0,9945	HPT	0,4665	60,786	3,419	17,7784	0,9932
OCT	2,8941	65,995	22,916	2,8799	0,9995	OCT	5,6258	75,566	47,859	1,5789	0,9980
K75						K203					
PNT	0,0292	106,430	13,669	7,7862	0,9963	PNT	- 0,1564	108,460	11,441	9,4799	0,9944
HXN	0,4826	110,690	12,998	8,5159	0,9917	HXN	0,6285	103,640	15,817	6,5524	0,9980
HPT	0,9003	66,771	9,872	6,7636	0,9994	HPT	0,6770	123,300	12,098	10,1918	0,9966
OCT	3,0411	65,586	23,539	2,7863	0,9998	OCT	9,6697	129,460	101,490	1,2756	0,9980

➤ Pentru fiecare pH al componentei apoase s-au verificat dependențele logaritmicilor zecimali factorilor de retenție în funcție de concentrația modificatorului organic. S-a observat

faptul că acestea au fost liniare, în cazul valorilor de pH = 2, 3, 4 și, respectiv, 5. În cazul pH = 7, au fost obținute dependențe polinomiale. Parametrii de regresie obținuți pot fi urmăriți în Tabelul 2.2.2.

Tabel.2.2.2. Parametrii de regresie obținuți pentru oximele studiate prin RP-IPC pentru pH= 2, 3, 4 și, respectiv, 5 (a); pentru pH= 7 (b) în cazul utilizării octansulfonatului de sodiu (10 mM) drept API

a.

pH	log k_w	a_1	R^2	pH	log k_w	a_1	R^2
Obidoxima				HI6			
2	4,1259	-0,0641	0,9996	2	3,8788	-0,0608	0,9995
3	4,0428	-0,065	0,9999	3	3,8638	-0,0632	0,9989
4	4,1081	-0,0652	0,9977	4	3,8708	-0,0616	0,998
5	3,3309	-0,0533	0,9935	5	3,2657	-0,0542	0,9971
HLo7				K27			
2	4,0510	-0,0633	0,9997	2	3,9946	-0,0621	0,9998
3	4,0464	-0,0658	0,9994	3	4,0119	-0,0649	0,9994
4	4,0086	-0,0641	0,9973	4	4,0132	-0,0639	0,9979
5	3,2905	-0,0537	0,9977	5	3,3561	-0,0543	0,9981
K48				K74			
2	3,9508	-0,0619	0,9998	2	4,0997	-0,0639	0,9999
3	3,9648	-0,0647	0,9992	3	4,1265	-0,0668	0,999
4	3,9573	-0,0635	0,9981	4	4,1325	-0,066	0,9981
5	3,3279	-0,0544	0,9982	5	3,5249	-0,0572	0,9985
K75				K203			
2	4,0586	-0,0634	0,9998	2	3,9173	-0,0615	0,9998
3	4,0739	-0,0662	0,9992	3	3,9212	-0,0641	0,9992
4	4,0869	-0,0654	0,9979	4	3,9345	-0,0633	0,9974
5	3,4367	-0,0558	0,9982	5	3,1898	-0,052	0,9965

b.

pH 7

Analit	log k_w	a_1	a_2	R^2	$(C_m)_{\min}$	$\log(k')_{\min}$
OBI	7,3202	-0,2234	0,0016	0,9988	69,8	-0,4779
HI6	5,9708	-0,1911	0,0015	0,9993	63,7	-0,1157
HLo7	6,0495	-0,1916	0,0014	0,9997	68,4	-0,5060
K27	7,6263	-0,2342	0,0019	0,9994	61,6	0,4092
K48	7,5766	-0,2325	0,0018	0,9993	64,6	0,0688
K74	7,1518	-0,2109	0,0016	0,9995	65,9	0,2020

K75	7,0474	-0,2088	0,0015	0,9995	69,6	-0,2188
K203	7,9774	-0,2473	0,0020	0,9997	61,8	0,3327

Din punct de vedere matematic, dependența polinomială de ordinul II obținută pentru pH= 7 prezintă un minim, $\log(k')_{\min}$, ce se poate obține din condiția $\frac{\partial \log(k')}{\partial C_m} = 0$. Minimul de pe curbă este caracterizat de o anumită valoare a concentrației de modificator organic, $(C_m)_{\min}$ și o valoare minimă a $\log(k')$, obținute utilizând următoarele ecuații:

$$(C_m)_{\min} = -\frac{\alpha_1}{2\alpha_2} \quad (2.2.5)$$

$$\log(k')_{\min} = \alpha_0 - \frac{\alpha_1^2}{4\alpha_2} \quad (2.2.6)$$

După cum se poate observa atât din Tabelul 2.2.2, perechile ionice formate prezintă o proprietate deosebită a dependențelor logaritmilor zecimali ai factorilor de retenție de concentrația de modificator organic din faza mobilă și anume faptul că minimum acestora se află în intervalul de concentrație (0; 100); pentru majoritatea compușilor organici neionici $(\log k')_{\min}$ se situează în afara acestui interval.

Influența concentrației API asupra retenției cromatografice

Conform modelului electrostatic ce explică retenția compușilor prin mecanism cu formare de perechi ionice, pentru cazul de față în care analitul este divalent, iar API, monovalent, dependența factorului de retenție de concentrația API este de forma:

$$\ln k' = \chi + \ln c_{API} \quad (2.2.9)$$

, unde χ este o constantă ce depinde de hidrofobicitatea și sarcina electrică a ionilor analitului și, respectiv, al API, de modificatorul organic și de tăria ionică.

Au fost urmărite aceste dependențe în cazul utilizării a trei agenți formatori de perechi ionice și anume hexan-, heptan și, respectiv, octan-sulfonatul de sodiu, la un pH acid al componentei apoase. Graficele ce reprezintă aceste dependențe au demonstrat o corelație liniară bună (cu $R^2 > 0,99$), având pantele cu valori cuprinse între 0,6 și 0,8. Pentru o compoziție a fazei mobile ce conține 50% modificator organic, parametrii de regresie se regăsesc în Tabelul 2.2.3.

Tabelul 2.2.3 Parametrii de regresie obținuți pentru dependențele $\ln C_{API}$ vs. $\ln(k')$ pentru compușii analizați prin RP-IPC

API	Intersecția (χ)	Panta	R^2	API	Intersecția (χ)	Panta	R^2
Obidoxima				HI6			
HXN	-1,5116	0,7612	0,9972	HXN	-1,6752	0,7414	0,9973
HPT	-1,0319	0,8527	0,9954	HPT	-1,1168	0,8109	0,9973
OCT	0,6710	0,6274	0,9984	OCT	0,3752	0,6684	0,9993
HLo7				K27			
HXN	-1,6055	0,7638	0,9976	HXN	-1,6273	0,7718	0,9975
HPT	-1,4062	0,8198	0,9948	HPT	-1,0574	0,8311	0,9944
OCT	0,4110	0,6946	0,9975	OCT	0,3495	0,7315	0,9974
K48				K74			
HXN	-1,6382	0,7561	0,9971	HXN	-1,4993	0,7587	0,9970
HPT	-1,0359	0,7929	0,9957	HPT	-0,9279	0,7926	0,9968
OCT	0,2693	0,7254	0,9958	OCT	0,4147	0,7103	0,9927
K75				K203			
HXN	-1,5254	0,7531	0,9973	HXN	-1,6314	0,7440	0,9976
HPT	-0,9187	0,7720	0,9977	HPT	-0,9833	0,7545	0,9981
OCT	0,4304	0,6900	0,9938	OCT	0,3077	0,698	0,9938

Din tabelul de mai sus se poate observa faptul că pantele regresiilor liniare obținute pentru oximele studiate prin RP-IPC se situează între 0,6 și 0,8. Conform Tabelului 2.1. redat în capitolul teoretic, valoarea pantelor ar fi trebuit să fie unitară, ceea ce sugerează faptul că, în cazul de față, există unele devieri de la modelul electrostatic.

Aceste dependențe pot fi utilizate pentru a estima valoarea extrapolată a factorului de retenție al analitului în prezența API, atunci când API este în concentrație de 1 mol/L; pentru aceasta concentrație, valoarea $\ln C_{API}$ devine 0, iar valoarea $\ln k_{API}$ devine χ .

Influența hidrofobicității API din faza mobilă asupra retenției cromatografice

Efectul hidrofobicității API din faza mobilă a fost studiat urmărind influența numărului de atomi de carbon din molecula API asupra timpilor de retenție ai perechilor ionice formate cu diferiți API, pentru o fază mobilă ce conține 55% modificator organic.

Influența pH-ului asupra retenției cromatografice

Valoarea pH-ului componentei apoase a fazei mobile este un parametru foarte important în cromatografia de lichide bazată pe mecanism cu formare de perechi ionice. A fost studiată

influența acestui parametru pe un domeniu cuprins între 45 și 70 % modificador organic, pentru 5 valori de pH pentru componenta apoasă.

Au fost obținute forme sigmoide ale dependențelor factorilor de retenție în funcție de valoarea pH-ul componentei apoase pentru mai multe compoziții ale fazei mobile, mai ales în cazurile în care conținutul de modificador organic din faza mobilă a fost sub 60% (45, 50, 55 și, respectiv, 60% MeOH).

În **Fig.2.2.35** este ilustrat un exemplu al formei obținute pentru K48 (pentru 50% MeOH). Se poate observa faptul că valorile experimentale situate în intervalul de pH 3-7 pot fi fitate cu ajutorul funcției Boltzmann. Acest comportament de retenție poate fi explicat bine prin modelul partiției. Dacă intervalul de pH se extinde, se poate observa o curbă sigmoială dublă, care poate fi explicată prin posibilitatea formării unei perechi duble (în raport 1:2), de tipul $A^{2+}(API^{-})_2$. Această dublă pereche formată de analit cu anionul alchil-sulfonat este mai hidrofobă decât o pereche ionică simplă (în raport 1:1), de tipul $A^{2+}API^{-}$, și se poate forma la pH-uri foarte acide.

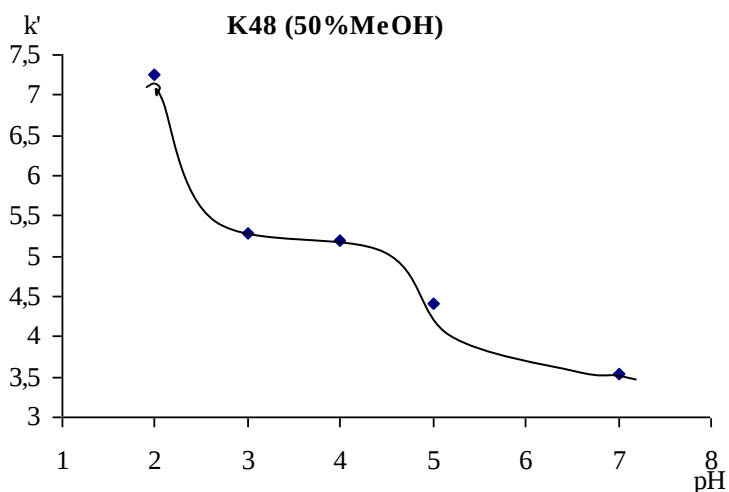


Fig.2.2.35. Dependențele (k') de pH-ul componentei apoase obținute pentru K48 prin RP-IPC pe coloana Zorbax Eclipse XDB C18, F.M. 50% Aq (10 mM OCT) + 50% MeOH

Comportamentul de retenție observat se poate explica prin faptul că pH-ul poate influența echilibrul tautomer redat în **Fig. 2.2.37**, ducând spre stabilizarea uneia dintre structurile ilustrate. La pH-uri foarte acide obidoxima, având structura I, are posibilitatea de a forma o pereche dublă cu ionii agentului formator de perechi ionice. Pe măsură ce pH-ul componentei apoase crește, echilibrul se deplasează spre stabilizarea structurii II, structură ce prezintă o grupare nitrozo- și un cation N^+ care are posibilitatea de a forma o pereche ionică cu ionii API. La un pH neutru al componentei apoase, structura III se stabilizează. În acest caz, analitul nu mai formează perechi

ionice, participând la procesul de retenție ca moleculă liberă conform unui mecanism de fază inversă; între structurile hidrocarbonate din molecula acestuia și lanțurile hidrocarbonate ale fazei staționare C18 au loc interacții hidrofobe, observându-se o scădere a timpului de retenție cromatografică.

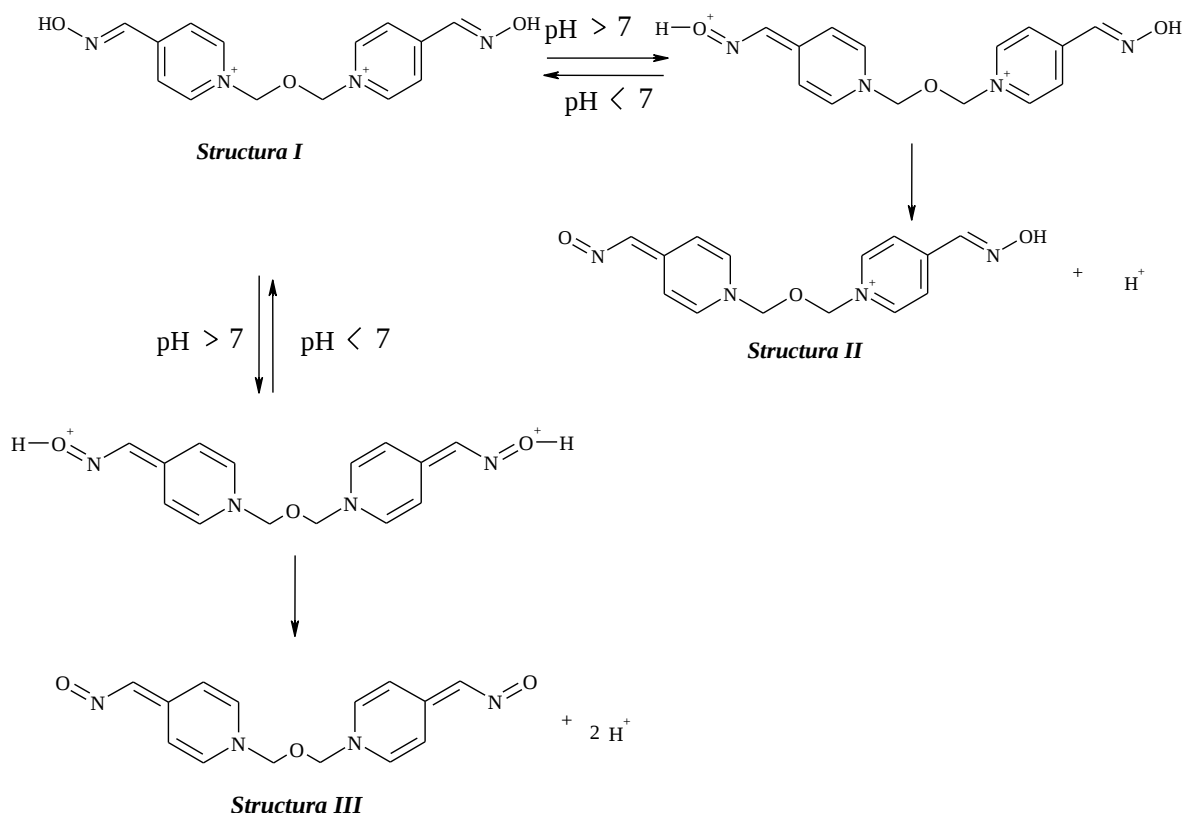


Fig.2.2.37 Echilibre tautomere ale obidoximei în funcție de pH-ul soluției.

2.2.2.4. Concluzii asupra studiului

Parametrii de retenție obținuți pentru oximele studiate prin mecanism cu formare de perechi ionice pot fi explicați atât prin modelul electrostatic, cât și prin cel al partiției.

Au fost observate dependențe ale logaritmulor zecimali ai factorilor de retenție în funcție de concentrația modifierului organic liniare, în cazul valorilor de pH 2, 3, 4 și, respectiv, 5; în cazul pH = 7, au fost obținute dependențe polinomiale. Un rol important în explicarea acestui comportament de retenție cromatografică observat îl joacă morfologia fazei staționare, alături de echilibrele tautomere în care pot fi implicați compușii investigați.

În ceea ce privește efectul pH-ului asupra retenției cromatografice, rezultatele obținute au fost în acord cu modelul partiției mai ales în cazurile în care conținutul de modifier organic din faza mobilă a fost sub 60%, observându-se o funcție sigmoidală dublă.

2.2.3. Studiul oximelor pe o fază staționară C18 Zorbax ODS

2.2.3.1. Problematica studiului

În acest subcapitol a fost studiat comportamentul cromatografic al unor compuși cationici, utilizați ca reactivatori ai AchE, prin mecanism cu formare de perechi ionice, pe o fază staționară C18 Zorbax ODS.

Compușii investigați în acest studiu aparțin clasei oximelor, bromura de pralidoximă (PAM) și clorura de obidoximă (OBI); iodura de piridostigmină (PDST) nu aparține acestei clase, dar a fost studiată în urma utilizării sale anterioare ca reactivator al AChE.

Studiul a avut în vedere urmărirea principalilor parametri care influențează timpul de retenție cromatografică al oximelor și corelarea valorilor experimentale obținute cu modelele teoretice care explică mecanismul de retenție cromatografică cu formare de perechi ionice (modelul electrostatic sau cel al partiției). Compușii au fost studiați prin mecanism cu formare de perechi ionice utilizând drept agenți formatori de perechi ionice substanțe din clasa alchil-sulfonaților.

2.2.2.3. Rezultate și discuții

Influența concentrației modificatorului organic din faza mobilă asupra retenției cromatografice

În cazul de față, au fost urmărite dependențele logaritmicilor zecimali ai factorilor de retenție în funcție de concentrația MeOH din faza mobilă utilizând trei agenți formatori de perechi ionice : hexan-, heptan- și, respectiv, octan-sulfonatul de sodiu, concentrația acestora în componenta apoasă a fazei mobile fiind de 15 mM (**Fig.2.2.49**)

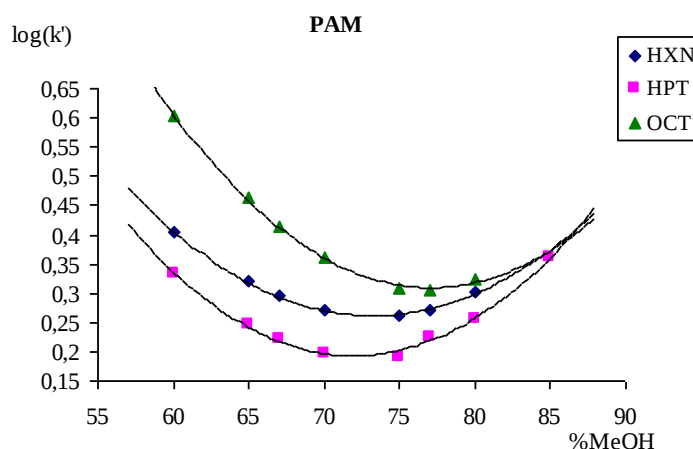


Fig.2.2.49. Dependențele $\log(k')$ vs %MeOH obținute pentru soluția de PAM analizată prin RP-IPC pe coloana C18 Zorbax ODS, F.M. Aq (0,1% H_3PO_4 + 15mM API) + MeOH.

După cum se poate observa, aceste dependențe sunt polinomiale, în formă de U, fapt mai rar raportat în literatura de specialitate, dar caracteristic în cazul aldoximelor cationice sau lichidelor ionice. Minimele acestor dependențe au fost situate în intervalul studiat de fază mobilă, după cum se poate observa în Tabelul 2.2.5.

Această formă caracteristică mai puțin întâlnită este descrisă printr-o ecuație polinomială de ordinul al II-lea:

$$\log(k') = \log(k')_w + \alpha_1 C_m + \alpha_2 C_m^2 \quad (2.2.15)$$

unde $\log k_w$ reprezintă intersecția, adică valoarea extrapolată a $\log(k')$ ce corespunde unei faze mobile ipotetice ce conține 100% componentă apoasă, α_1 și α_2 sunt parametrii regresiei polinomiale de ordinul al II-lea.

Din punct de vedere matematic, această dependență are un minim ce se poate obține din condiția $\frac{\partial \log(k')}{\partial C_m} = 0$. Acest minim de pe curbă este caracterizat de o anumită valoare a concentrației de modificador organic, $(C_m)_{\min}$ și o valoare minimă a logaritmului factorului de retenție, notată $\log(k')_{\min}$, obținute utilizând ecuațiile (2.2.5) și (2.2.6).

După cum se poate observa din reprezentările grafice, perechile ionice formate prezintă o proprietate deosebită a dependențelor logaritmilor zecimali ai factorilor de retenție de concentrația de modificador organic din faza mobilă și anume faptul că minimul acestora se află în intervalul de concentrație (0; 100).

Dependențele discutate anterior pot fi utilizate pentru estimarea unor descriptori moleculari. Unul dintre cei mai discutați parametri este $\log(k')_w$, parametru relaționat cu caracterul hidrofob atribuit perechii ionice formate între analit și agentul formator de perechi ionice.

Forme similare ale dependențelor retenției de concentrația modificadorului organic din faza mobilă au fost obținute și în cazul utilizării unor concentrații mai scăzute ale agentului formator de perechi ionice din componenta apoasă a fazei mobile. În Tabelul 2.2.5 se pot observa parametrii acestor regresii, dar și valorile calculate ale $(C_m)_{\min}$ și $\log(k')_{\min}$.

Tabelul.2.2.5. Parametrii dependențelor $\log(k')$ vs. C_{MeOH} obținuți în cadrul analizei aldoximelor pe coloana Zorbax ODS prin RP-IPC

Analit	Conc.API	$\log k_w$	$\log(k')_{\min}$	α_1	A_2	R^2	$(C_m)_{\min}$
API: Hexansulfonat de sodiu							
PAM	15mM	4.655	0.261	-0.1199	8.18×10^{-4}	0.9967	73.3
	10mM	3.854	0.294	-0.1024	7.36×10^{-4}	0.9946	69.5
	5mM	3.349	0.447	-0.0875	6.59×10^{-4}	0.9968	66.4
OBI	15mM	5.447	0.347	-0.1684	1.39×10^{-3}	0.9961	60.6
	10mM	3.848	0.483	-0.1206	1.08×10^{-3}	0.9996	55.8
	5mM	2.609	0.690	-0.0789	8.10×10^{-4}	0.9986	48.7
PDST	15mM	2.787	0.577	-0.0727	5.98×10^{-4}	0.9973	60.8
	10mM	2.454	0.580	-0.065	5.63×10^{-4}	0.9995	57.7
	5mM	2.118	0.716	-0.0519	4.80×10^{-4}	0.9965	54.0
API: Heptansulfonat de sodiu							
PAM	15mM	5.348	0.193	-0.1432	9.94×10^{-4}	0.9978	72.0
	10mM	4.786	0.315	-0.1256	8.81×10^{-4}	0.9979	71.2
	5mM	3.937	0.502	-0.1022	7.60×10^{-4}	0.999	67.3
OBI	15mM	6.366	0.526	-0.1841	1.45×10^{-4}	0.9976	63.5
	10mM	6.044	0.587	-0.1785	1.46×10^{-4}	0.99197	61.1
	5mM	4.403	0.828	-0.1315	1.21×10^{-4}	0.9998	54.4
PDST	15mM	3.187	0.548	-0.0845	6.76×10^{-4}	0.9967	62.5
	10mM	3.184	0.617	-0.0837	6.82×10^{-4}	0.9973	61.4
	5mM	3.047	0.764	-0.0799	6.99×10^{-4}	0.9916	57.1
API: Octansulfonat de sodiu							
PAM	15mM	6.327	0.296	-0.1561	1.01×10^{-3}	0.9968	77.3
	10mM	5.738	0.337	-0.1464	9.92×10^{-4}	0.9979	73.8
	5mM	5.182	0.497	-0.1331	9.45×10^{-4}	0.9964	70.4
OBI	15mM	12.725	0.657	-0.3439	2.45×10^{-3}	0.9952	70.2
	10mM	9.440	0.746	-0.2598	1.94×10^{-3}	0.9986	66.9
	5mM	8.287	0.960	-0.2391	1.95×10^{-3}	0.9979	61.3
PDST	15mM	5.089	0.680	-0.1316	9.82×10^{-4}	0.999	67.0
	10mM	4.218	0.679	-0.1093	8.43×10^{-4}	0.9995	64.8
	5mM	3.595	0.796	-0.0921	7.58×10^{-4}	0.9955	60.8

O posibilă explicație pentru comportamentul de retenție observat se referă la schimbarea interacțiilor ce pot avea loc între analitul cationic și faza staționară. În prima parte a intervalului studiat de fază mobilă (până la atingerea minimului de pe curba sub formă de U obținută) se

poate observa un mecanism de retenție în fază inversă, între perechile ionice formate de analit cu agentul formator de perechi ionice și structurile hidrocarbonate ale fazei staționare având loc interacții hidrofobe. În faze mobile sărace în componentă apoasă (după minimul curbei), concentrația agentului formator de perechi ionice scade treptat defavorizând astfel formarea de perechi ionice cu analitul de interes; acesta participă în continuare la procesul de retenție ca moleculă liberă putând interacționa puternic cu grupările silanol reziduale ale fazei staționare, observându-se astfel o creștere a timpilor de retenție cromatografică (**Fig.2.2.52**).

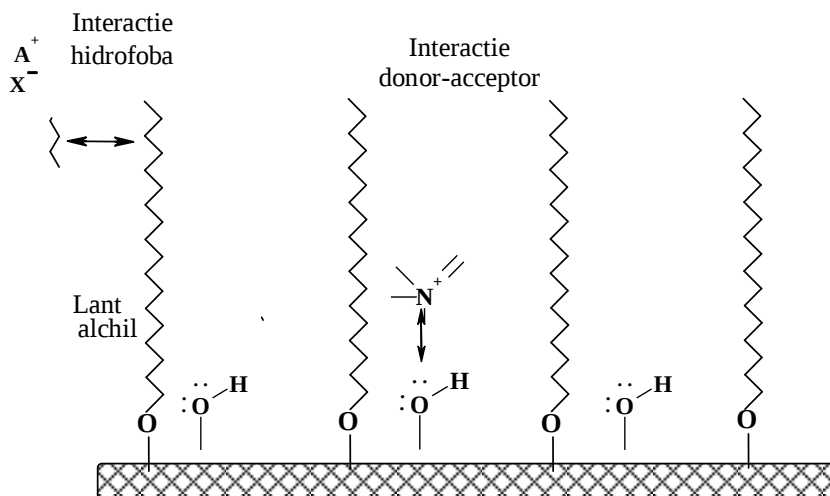


Fig.2.2.52. Interacții posibile ce pot avea loc între analiții cationici și faza staționară C18 Zorbax ODS, studiați prin mecanism RP-IPC.

Influența concentrației API asupra retenției cromatografice

Conform modelului electrostatic ce explică retenția compușilor prin mecanism cu formare de perechi ionice, dependența factorului de retenție de concentrația API este de forma:

$$\ln k' = \chi - \left(\frac{Z_{API} Z_A}{Z_{API}^2 + 1} \right) \cdot \ln c_{API}$$

Au fost urmărite aceste dependențe în cazul utilizării a trei agenți formatori de perechi ionice și anume hexan-, heptan și, respectiv, octan-sulfonatul de sodiu, dar nu s-au obținut dependențe liniare pentru niciunul dintre compușii investigați prin RP-IPC.

Influența pH-ului asupra retenției cromatografice

În general, în mecanismul de retenție bazat pe formarea de perechi ionice, pH-ul joacă un rol foarte important în protonarea grupărilor amino, crescând astfel capacitatea de interacție a analitului cu agentul de formare a perechilor ionice.

În cazul de față, pH-ul poate influența echilibrul tautomeric redat în **Fig. 2.2.61**, ducând spre stabilizarea uneia dintre structurile ilustrate.

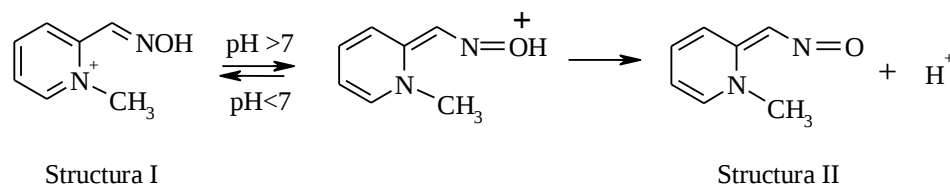


Fig.2.2.61. Structuri de rezonanță ale pralidoximei.

În ceea ce privește forma dependențelor funcționale ale $\log k'$ versus concentrația modifierului organic, s-au dovedit a fi unele obișnuite la pH neutru, fără a ilustra un “minim”, ca în cazul experimentelor realizate în mediu acid. Acest lucru se poate explica prin faptul că, în condiții neutre, este favorizată disocierea grupării sulfonice a agentului formator de perechi ionice. Caracterul ionic intrinsec al acestuia determină distribuția lui spre faza mobilă, reducându-i considerabil adsorbția pe faza staționară nepolară. În acest mod, formarea perechii ionice în faza mobilă determină o retenție mai scăzută în mediu neutru decât în cel acid.

Morfologia fazei staționare joacă un rol considerabil în ceea ce privește comportamentul de retenție cromatografică, implicând atât partiția în fază inversă, cât și modelele electrostatice ale mecanismului de formare a perechilor ionice.

2.2.3.4. Concluzii asupra studiului

Acest studiu a evidențiat un comportament de retenție cromatografică neobișnuit al compușilor studiați prin mecanism RP-IPC la un pH acid al fazei mobile. Au fost obținute dependențe ale logaritmului factorilor de retenție în funcție de concentrația modifierului din faza mobilă sub forma de U, cu minimele situate în intervalul (50 – 80)% MeOH. La un pH neutru al componentei apoase, această formă a dependențelor nu a mai fost observată. Acest comportament de retenție neobișnuit poate fi explicat dacă se iau în considerare efectele tautomeriei în care sunt implicați compușii în cauză în funcție de pH-ul fazei mobile și în funcție de efectele modifierului organic, dar și ținându-se cont de modificările suprafeței fazei staționare aduse de adsorbția orientată a agentului formator de perechi ionice; de asemenea, o influență asupra retenției cromatografice o pot avea grupările silanol reziduale ale fazei staționare, ce pot interacționa cu analiții de interes.

2.3. Alegerea acizilor biliari ca formatori de perechi ionice în RP-IPC

2.3.3. Rezultate și discuții

În acest capitol a fost studiat comportamentul de retenție al unor aldoxime cationice utilizate drept reactivatori ai acetilcolinesterazei (AChE) prin mecanism de pereche ionică utilizând acizii biliari, sub formă de săruri de sodiu (cu structurile prezentate în **Fig. 2.3.1.**) ca agenți formatori de perechi ionice.

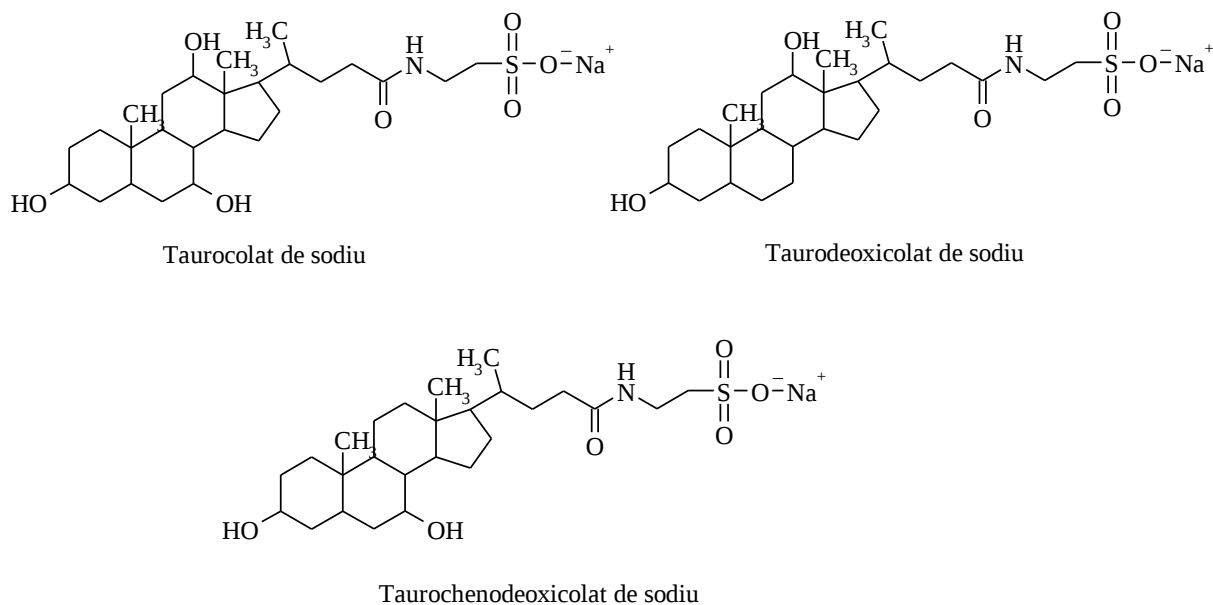


Fig.2.3.1. Structurile sărurilor biliare utilizate ca API în studiul aldoximelor prin RP-IPC.

Cu toate că substanțele cationice utilizate drept reactivatori ai AChE (pralidoxima, obidoxima și piridostigmina, cu structurile date în **Fig. 2.2.1.**) prezintă un caracter polar puternic, ele sunt caracterizate în RP-LC pe faze staționare uzuale (C8 sau C18) printr-o retenție puternică datorită unei posibile interacții cu matricea silicică. În mod surprinzător, retenția lor scade prin adăugarea în faza mobilă a unui agent formator de perechi ionice (alchil-sulfonați cu 5 până la 8 atomi de C). Acest studiu demonstrează faptul că și utilizarea sărurilor biliare drept API are consecințe similare.

Influența concentrației de modificador organic din faza mobilă

Dependențele funcționale ale logaritmului zecimal al factorilor de retenție cromatografică de concentrația de modificador organic din faza mobilă obținute pentru compușii analizați prin mecanism de pereche ionică la un pH acid al fazei mobile sunt redată în **Fig.2.3.2.** Datele de retenție cromatografică au fost obținute utilizând drept API taurodeoxicolatul de sodiu.

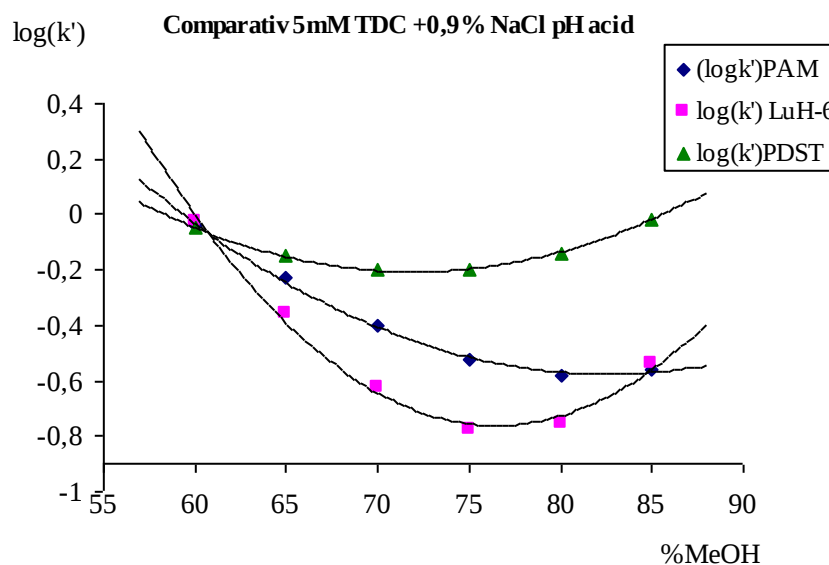


Fig.2.3.2. Dependențele $\log(k')$ vs. %MeOH obținute pe o coloană C18 Zorbax ODS utilizând o fază mobilă compusă din MeOH și Aq (0.1% H_3PO_4 + 5 mM TDC + 0,9% NaCl)

După cum se poate observa, aceste dependențe sunt polinomiale, în formă de U, fapt mai rar raportat în literatura de specialitate, dar caracteristic în cazul aldoximelor cationice sau lichidelor ionice. Minimele acestor dependențe au fost situate în intervalul studiat de fază mobilă.

Dependențele discutate anterior pot fi utilizate pentru estimarea unor descriptori moleculari. Logaritmul factorului de retenție cromatografică extrapolat la 0% sau 100% solvent organic poate fi folosit în estimarea a diferiți descriptori de hidrofobicitate ai perechilor ionice formate de compușii în cauză cu cele trei săruri biliare. Acești descriptori pot fi utilizați în modelarea procesului de traversare a membranelor a aldoximelor respective, cu scopul explicării utilizării acestora în terapia intoxicațiilor cu compuși organofosforici inhibitori ai acetilcolinesterazei. Unul dintre cei mai discutați parametri este $\log(k')_w$, parametru relaționat cu caracterul hidrofob atribuit perechii ionice formate între analit și acidul biliar respectiv. Valoarea logaritmului zecimal al factorului de retenție pentru o fază mobilă exclusiv organică, $C_{\text{MeOH}} = 100\%$, reprezintă un alt parametru important, întrucât estimează afinitatea ionului singur, A^+ , pentru faza staționară, în absența agentului formator de perechi ionice.

Parametrii de regresie obținuți pentru compușii analizați sunt redați în Tabelul 2.3.1.

Tabelul 2.3.1. Parametrii de regresie și valori de retenție extrapolate obținute pentru dependențele descrise de ecuația (2.3.1.), pentru compușii studiați prin RP- IPC.

API: taurodexicolat de sodium							
Analit	$\log k_w$	α_1	α_2	R^2	$(\log k)_{C_0=100}$	$(\log k)_{\min}$	$C_{(\text{MeOH})_{\min}}$
PAM	6.868	-0.180	$1.10 \cdot 10^{-3}$	0.9972	-0.201	-0.577	84.6
LuH-6	15.76	-0.432	$2.82 \cdot 10^{-3}$	0.9966	+0.758	-0.785	76.6
PDST	5.352	-0.154	$1.08 \cdot 10^{-3}$	0.9979	+0.599	-0.138	71.3
API: taurocolat de sodium							
PAM	6.298	-0.176	$1.12 \cdot 10^{-3}$	0.9967	-0.089	-0.616	78.6
LuH-6	14.73	-0.411	$2.72 \cdot 10^{-3}$	0.9970	+0.779	-0.795	75.6
PDST	4.921	-0.148	$1.06 \cdot 10^{-3}$	0.9937	+0.679	-0.245	69.8
API: taurochenodexicolat de sodium							
PAM	7.090	-0.182	$1.16 \cdot 10^{-3}$	0.9978	+0.519	-0.048	78.4
LuH-6	16.06	-0.440	$2.94 \cdot 10^{-3}$	0.9983	+1.419	-0.402	74.8
PDST	5.301	-0.147	$1.02 \cdot 10^{-3}$	0.9994	+0.769	+0.005	72.1

Influența hidrofobității API asupra retenției cromatografice

Contribuția adusă caracterului hidrofob al perechilor ionice formate de către agentul formator de perechi ionice poate fi urmărită, comparativ, în **Fig. 2.3.3.** Se poate observa faptul că caracterul hidrofob al perechilor ionice crește în ordinea creșterii hidrofobității API și, anume, taurocolat < taurodeoxicolat < taurochenodeoxicolat, dar această ordine se poate modifica pentru compoziții ale fazei mobile apropiate de 0% sau 100% modificador organic, după cum reiese și din calculele înscrise în Tabelul 2.3.1.

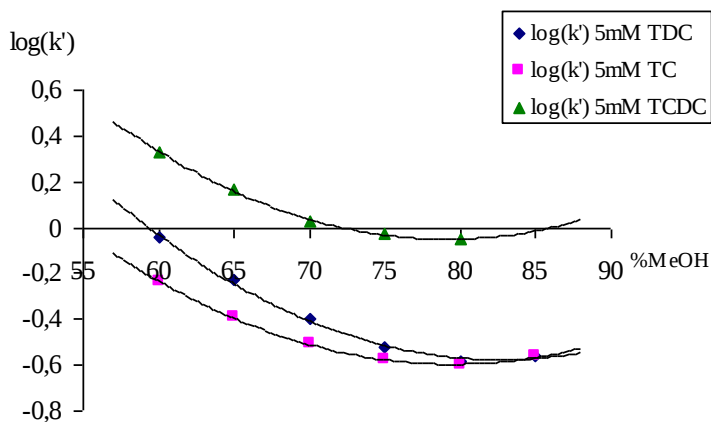


Fig.2.3.3. Dependențele $\log(k')$ vs. %MeOH obținute prin RP-IPC pentru o soluție de PAM utilizând TC, TDC și, respectiv, TCDC (5mM în componenta apoasă) drept agenți formatori de perechi ionice.

Influența pH-ului asupra retenției cromatografice

Valoarea pH-ului componentei apoase a fazei mobile poate influența echilibrul tautomer pentru două dintre substanțele studiate; reprezentarea acestui echilibru, în cazul pralidoximei, este redată în Fig.2.2.61. Schimbarea pH-ului componentei apoase de la un pH acid la unul neutru a dus la schimbarea dependenței $\log k'$ vs. C_{MeOH} dintr-o dependență polinomială de ordinul al II-lea (pH acid) la o dependență liniară (pH neutru), după cum se poate observa în **Fig.2.3.4**. La pH = 7 dependența liniară poate fi explicată prin faptul că, la această valoare a pH-ului, nu se mai formează o pereche ionică între analit și sarea acidului biliar, ceea ce înseamnă că este posibil ca aceasta să își schimbe structura. După cum se poate observa în Fig.2.2.61, structura II a pralidoximei nu este capabilă de a forma pereche ionică cu sărurile biliare existente în componenta apoasă a fazei mobile, schimbându-se astfel comportamentul de retenție al compusilor analizați.

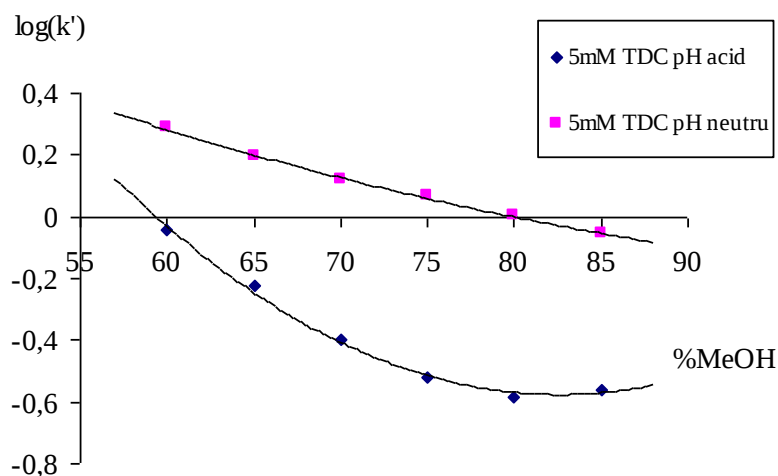


Fig.2.3.4. Dependentele $\log(k')$ vs. %MeOH obținute prin RP-IPC pentru o soluție de PAM la pH=2 și, respectiv, pH = 7.

Influența tăriei ionice asupra retenției cromatografice

Efectul tăriei ionice asupra retenției compusilor analizați este unul destul de neobișnuit și anume, s-a observat faptul că factorii de retenție pentru cele trei substanțe studiate, pentru toți cei trei agenți formatori de perechi ionice utilizați, au crescut în cazul experimentelor în care nu a fost adăugată NaCl 0,9% în componenta apoasă a fazei mobile. Forma de U a dependențelor $\log(k')$ vs. C_{MeOH} s-a menținut atât în cazul utilizării NaCl în faza mobilă, cât și în experimentele în care sarea nu a fost folosită. Pentru exemplificarea acestui comportament de retenție

cromatografică se poate urmări **Fig. 2.3.5.**, care redă dependențele retenției cromatografice a pralidoximei, în cazul utilizării TDC drept agent formator de perechi ionice.

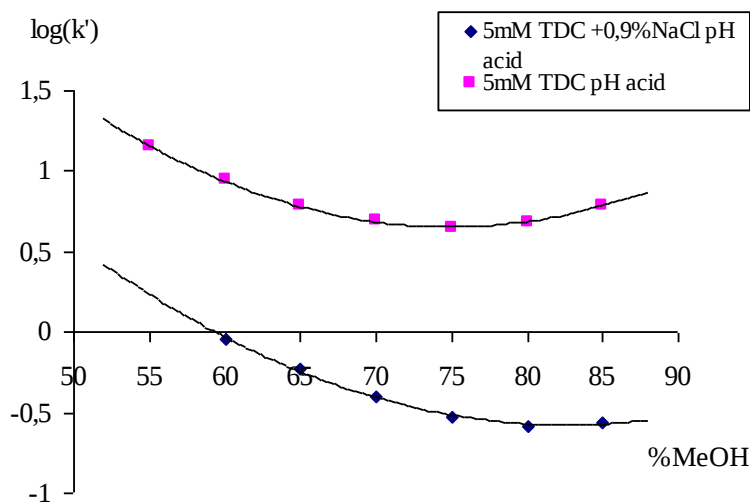


Fig.2.3.5. Dependențele $\log(k')$ vs. %MeOH obținute prin RP-IPC pentru o soluție de PAM, în prezența și, respectiv, absența NaCl din faza mobilă.

2.3.4. Concluzii asupra studiului

Studiul a demonstrat faptul că substanțele cationice analizate, utilizate drept reactivatori ai AChE, pot forma perechi ionice cu sărurile acizilor biliari. Din punct de vedere al comportamentului de retenție cromatografică a acestor compuși, s-au observat dependențe polinomiale, de gradul al II-lea, ale logaritmilor zecimali ai factorilor de retenție în funcție de concentrația de metanol din faza mobilă, fapt rar întâlnit în literatura de specialitate. Dependențele sub forma de U observate la pH acid al fazei mobile au devenit liniare la pH neutru. Explicația pentru un asemenea comportament neobișnuit de retenție trebuie să țină seama atât de echilibrele tautomere în care sunt implicate aldoximele cationice în funcție de pH-ul componentei apoase, cât și de morfologia fazei staționare.

2.4. Aplicarea mecanismului RP-IPC pe alți compuși cationici (clasa lichidelor ionice)

2.4.1. Problematika studiului

Studiul de față a urmărit comportarea cromatografică a șase compuși din clasa lichidelor ionice (**Fig.2.4.4.**) prin RP-IPC, utilizând drept agenți formatori de perechi ionice compuși din clasa alchil-sulfonaților. A fost analizată influența compoziției fazei mobile și, de asemenea, influența agenților formatori asupra retenției cromatografice.

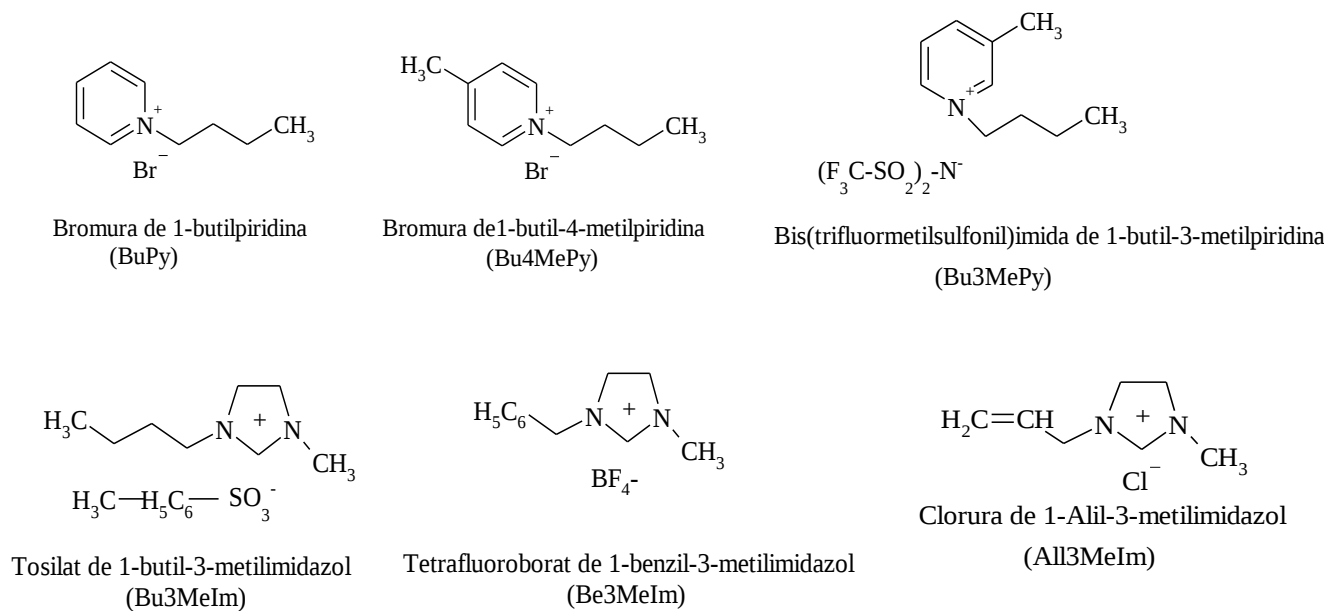


Fig.2.4.4. Structurile celor șase compuși din clasa lichidelor ionice studiate prin RP-IPC.

2.4.3. Rezultate și discuții

Influența concentrației modificatorului organic asupra retenției cromatografice

Au fost urmărite dependențele funcționale ale factorilor de retenție cromatografică (k') ale LI de compoziția fazei mobile, într-un interval cuprins între 50% și 80% MeOH (v/v). Aceste dependențe sunt utilizate în studii QSRR (relații cantitative între structura și retenția analiților), având aplicații în dezvoltarea metodelor cromatografice de analiză a compușilor în cauză.

În cazul LI studiate, reprezentările grafice ale logaritmulor zecimale ai factorilor de retenție în funcție de concentrația procentuală de modificator organic din faza mobilă (în procente volumetrice) au avut o formă de “U”, cu minimumul situat în intervalul studiat de fază mobilă. Aceasta formă caracteristică mai puțin întâlnită este descrisă printr-o ecuație polinomială de ordinul al II-lea:

$$\log(k') = \alpha_0 + \alpha_1 C_{\text{MeOH}} + \alpha_2 C_{\text{MeOH}}^2 \quad (2.4.1)$$

, unde α_0 reprezintă intersecția, adică valoarea extrapolată a (k') ce corespunde unei faze mobile ipotetice ce conține 100% componentă apoasă (pentru $C_{\text{MeOH}} = 0 \rightarrow \alpha_0 = \log k_w$), α_1 și α_2 sunt parametrii regresiei polinomiale de ordinul al II-lea.

Valorile parametrilor regresiei polinomiale și valorile calculate ale $\log(k')_{\min}$ sunt redată în tabelul următor.

Tabel 2.4.1. Parametrii regresiei polinomiale (2.4.1.) și parametrii calculați caracteristici pentru aceste ecuații.

Analit	$\alpha_0 = \log k_w$	α_1	α_2	R^2	$(C_{MeOH})_{min}$	$\log k_o$
Agent formator de perechi ionice: hexansulfonat de sodiu (HXN)						
BuPy	3.161	-0.0782	6.021×10^{-4}	0.9996	64.9	1.362
Bu4MePy	4.458	-0.1086	7.879×10^{-4}	0.9890	68.9	1.477
Bu3MePy	4.627	-0.1113	7.985×10^{-4}	0.9948	69.7	1.482
All3MeIm	2.559	-0.0726	5.978×10^{-4}	0.9998	60.7	1.277
Bu3MeIm	3.221	-0.0792	5.889×10^{-4}	0.9983	67.2	1.190
Be3MeIm	4.359	-0.1118	8.052×10^{-4}	0.9900	69.4	1.231
Agent formator de perechi ionice: heptansulfonat de sodiu (HPT)						
BuPy	3.819	-0.0955	7.138×10^{-4}	0.9996	66.9	1.407
Bu4MePy	4.762	-0.1151	8.199×10^{-4}	0.9995	70.2	1.451
Bu3MePy	4.871	-0.1161	8.222×10^{-4}	0.9998	70.6	1.483
All3MeIm	3.045	-0.0826	6.483×10^{-4}	0.9971	63.7	1.268
Bu3MeIm	4.413	-0.1107	8.032×10^{-4}	0.9997	68.9	1.375
Be3MeIm	5.118	-0.1305	9.216×10^{-4}	0.9994	70.8	1.284
Agent formator de perechi ionice: octansulfonat de sodiu (OCT)						
BuPy	4.806	-0.1170	8.248×10^{-4}	0.9992	70.9	1.354
Bu4MePy	5.619	-0.1334	9.115×10^{-4}	0.9997	73.2	1.394
Bu3MePy	5.387	-0.1260	8.623×10^{-4}	0.9994	73.1	1.410
All3MeIm	3.977	-0.1022	7.431×10^{-4}	0.9996	68.8	1.188
Bu3MeIm	5.367	-0.1316	9.129×10^{-4}	0.9996	72.1	1.336
Be3MeIm	5.621	-0.1389	9.457×10^{-4}	0.9993	73.4	1.188

Pentru o fază mobilă ce conține 100% modificator organic, valoarea extrapolată a dependențelor (2.4.1.), notată $\log(k')_o$, corespunde adsorbției cationului lichidului ionic respectiv din metanol pe faza staționară hidrofobă C18. Această adsorbție s-a dovedit a fi semnificativă, după cum se poate observa din valorile $\log(k')_o$, fără a depinde de agentul de perechi ionice utilizat.

Rezultatele demonstrează faptul că LI studiate pot fi adsorbite puternic la suprafața fazei staționare C18. Adsorbția se datorează atât interacțiilor puternice între silanolii reziduali de la suprafața silicei și lichidele ionice studiate, cât și interacțiilor hidrofobe între structurile hidrofobe ale cationilor și lanțurile hidrocarbonate ale fazei staționare.

În cazul unei faze mobile ipotetice ce conține 100% componentă apoasă ($\log(k')_w = \alpha_0$), adsorbția corespunde perechii ionice formate între LI și anionii alchil-sulfonat. Hidrofobicitatea

acestor perechi ionice depinde de lungimea catenei hidrocarbonate a API, după cum se poate observa și din valorile $\log(k')_w$ obținute în Tabelul 2.4.1. În același timp, rezultatele sunt în concordanță cu predicțiile teoretice ale hidrofobicității cationilor metil-imidazolici : benzil > butil > alil.

Influența tăriei ionice asupra retenției cromatografice

Experimentele realizate la o concentrație constantă de API în întreaga compoziție a fazei mobile (15 mmoli/ L) au demonstrat curbe cu formă similară, de U, dar cu „minime” decalate spre o concentrație mai mare de MeOH în faza mobilă. Un astfel de exemplu se poate observa în **Fig.2.4.7.**, unde a fost studiat comportamentul de retenție cromatografică al All3MeIm la o concentrație constantă de HXN în întreaga compoziție a fazei mobile.

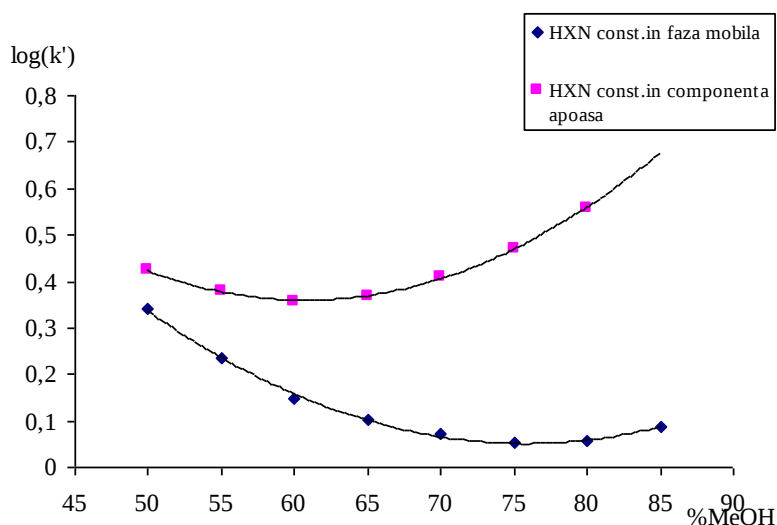


Fig.2.4.7. Dependente funcționale comparative în cazul All3MeIm pentru o fază mobilă ce conține : 15 mmoli/L HXN în componenta apoasă, respectiv, 15 mmoli/L HXN în întreaga fază mobilă

2.4.4. Concluzii asupra studiului

Acest studiu a arătat faptul că lichidele ionice piridinice și imidazolice analizate pot fi adsorbite la suprafața fazei staționare C18 datorită interacțiilor ion-dipol cu silanolii reziduali ai acestei faze, dar și datorită interacțiilor hidrofobe dintre structurile hidrofobe ale acestor cationi și lanțurile hidrocarbonate ale suprafeței fazei staționare. Interacțiile polare pot fi diminuate de prezența unui agent formator de perechi ionice adăugat în faza mobilă.

Dependențele funcționale ale retenției cromatografice a acestor compuși de compoziția fazei mobile utilizate au urmat o ecuație polinomială de ordinul al II-lea, reprezentările grafice având o formă caracteristică de U, cu minimumul poziționat în intervalul 60- 75% MeOH.

Pentru a crește retenția și a obține o separare bună a impurității C, fenpipramidei și pitofenonei, a fost adăugat în faza mobilă un agent formator de perechi ionice, hexansulfonatul de sodiu (10 mM). Cu toate că și metamizolul conține o grupare amino în structura sa, acesta nu a format perechi ionice cu hexansulfonatul de sodiu deoarece se crează repulsii electrostatice cu gruparea sulfonică din molecula proprie. Pentru creșterea retenției metamizolului și pentru a îmbunătăți simetria de pic a fost, de asemenea, adăugat în componenta apoasă un lichid ionic (tetrafloroboratul de 1-butil-1-metil-pirolidină). Lichidul ionic a intervenit în procesul de formare

de perechi ionice al impurității C, fenpipramidei și pitofenonei cu hexansulfonatul de sodiu scăzând retenția perechilor ionice respective, dar nu a avut un efect semnificativ asupra separării sau eficienței cromatografice, după cum se poate observa în figura următoare.

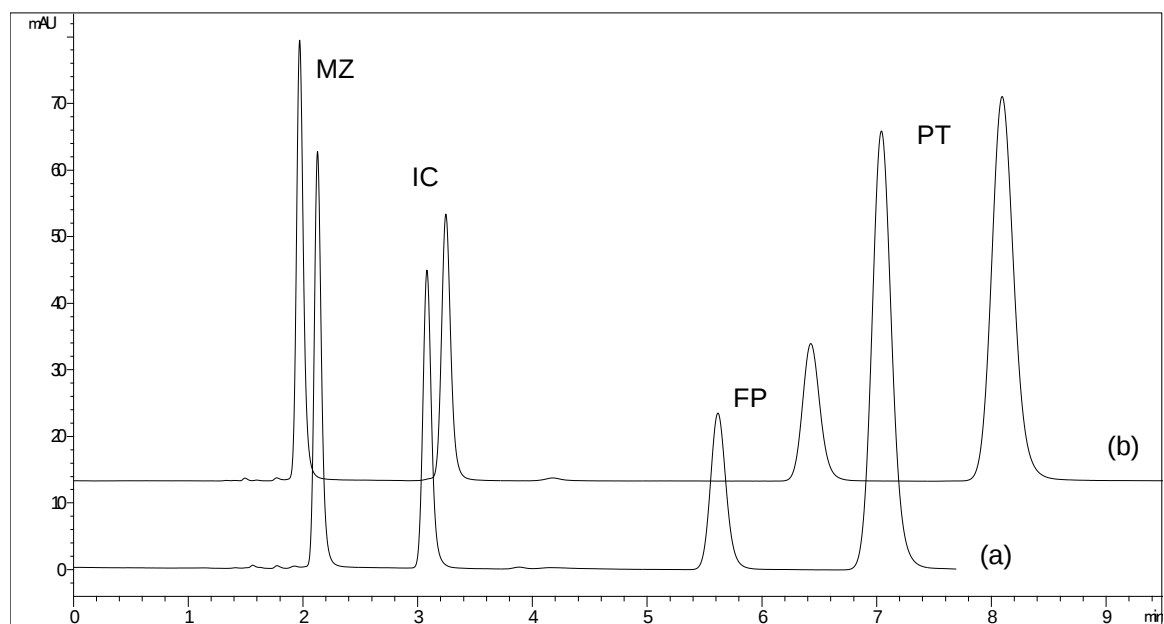


Fig 2.5.3. Cromatograme comparative ale compușilor analizați pentru cazul în care componenta apoasă a fazei mobile conține: (a) hexansulfonat de sodiu (10mM) și lichid ionic (10 mM); (b) 10 mM hexansulfonat de sodiu

Optimizarea metodei HPLC a necesitat anumite studii de retenție utilizând diferite faze mobile. În acest sens a fost studiat efectul concentrației lichidului ionic și agentului formator de perechi ionice adaugați în componenta apoasă a fazei mobile asupra retenției cromatografice și asupra formelor de pic ale analiților de interes. Concentrația optimă a lichidului ionic și cea agentului formator de perechi din faza mobilă au fost stabilite în urma unui studiu de retenție a analiților cu variația concentrației acestor aditivi.

S-a observat faptul că o creștere a concentrației agentului formator de perechi ionice (HXN) duce la o creștere polinomială a retenției IC, FP și PT, acestea formând perechi ionice cu anionul API, dar și o scădere polinomială a retenției metamizolului din cauza repulsiilor electrostatice dintre API și grupările sulfonice dissociate din molecula acestuia (**Fig.2.5.4**)

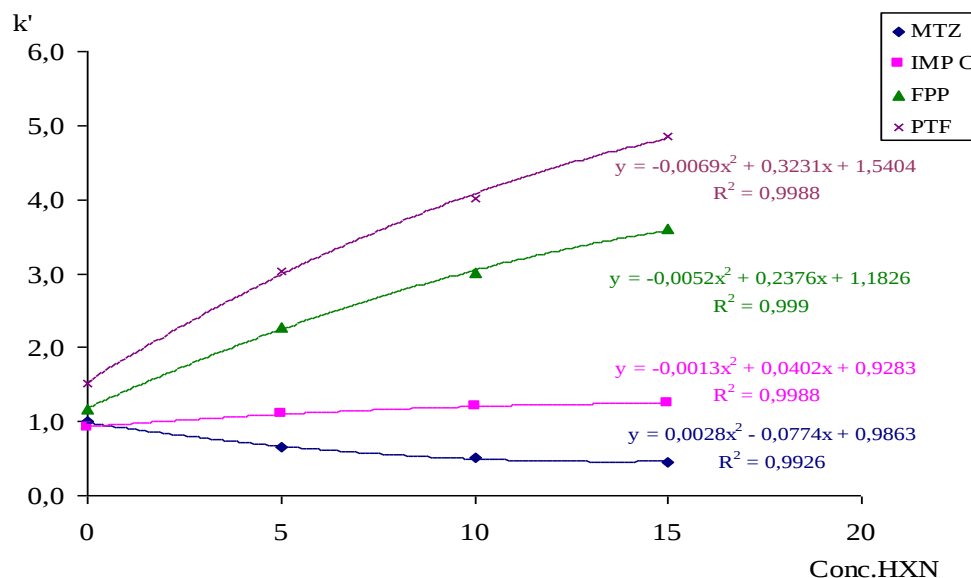


Fig.2.5.4. Dependențele funcționale k' vs. Conc. API din faza mobilă obținute prin RP-IPC pentru compușii de interes. Componenta apoasă (pH 3) conține, de asemenea, 0,2% TEA și 10 mM 1Bu1MePirr.

O altă observație făcută este aceea că lipsa agentului formator de perechi ionice duce la schimbarea ordinii de eluție între MZ și IC, iar picurile celor doi analiți nu se mai separă (Fig.2.5.5)

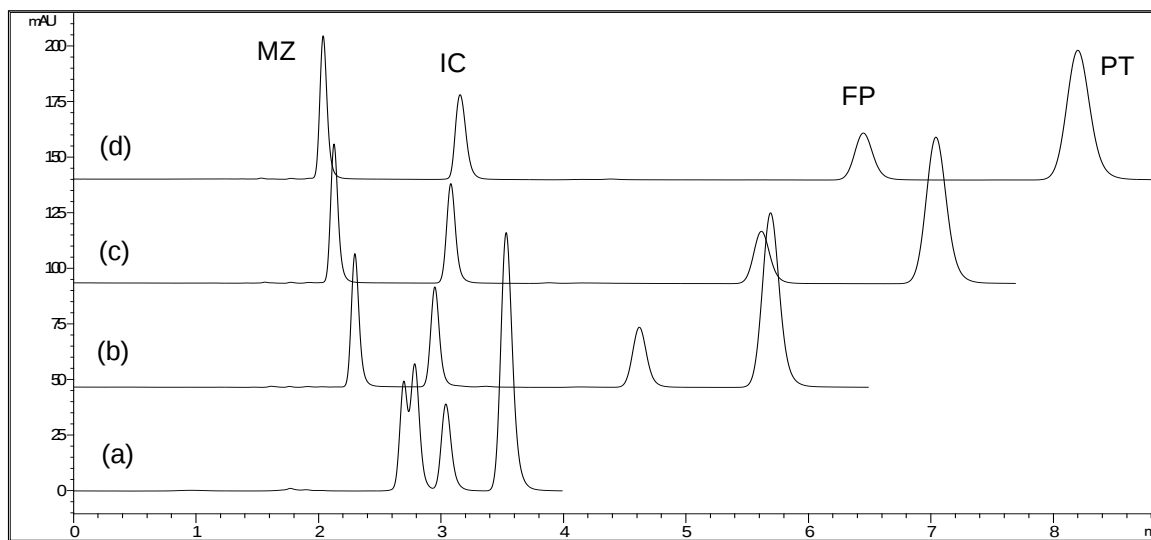


Fig.2.5.5. Cromatograme obținute pentru diferite concentrații de HXN: (a) 0 mM, (b) 5 mM, (c) 10 mM, (d) 15 mM. Componenta apoasă a fazei mobile (pH 3) conține, de asemenea, 10 mM 1Bu1MePirr. și 0,2% TEA.

De asemenea, a fost studiat efectul lichidului ionic adăugat în componenta apoasă a fazei mobile asupra retenției cromatografice și simetriei de pic a MZ. Au fost realizate componente apoase ce conțin 0, 5, 10 și, respectiv, 15 mM 1Bu1MePirr., fără a adăuga agent formator de perechi ionice în faza mobilă. Simetria de pic a MZ a crescut semnificativ odată cu creșterea

concentrației lichidului ionic. Factorul de retenție a rămas, practic, neschimbat odată cu creșterea concentrației L.I., ceea ce sugerează faptul că MZ nu formează perechi ionice cu acest aditiv. Lichidul ionic generează o creștere a retenției MZ doar dacă se adaugă în faza mobilă și un agent formator de perechi ionice.

Extracția lichid-lichid în 1-octanol a fost necesară pentru a înlătura excesul de metamizol din soluție și pentru a permite o bună sensibilitate a analizei fenpipramidei, care se găsește într-o concentrație foarte scăzută comparativ cu ceilalți compuși din soluția injectabilă de Algifen. Utilizând acidul picric drept agent formator de perechi ionice s-au extras, odată cu fenpipramida, atât pitofenona, cât și impuritatea C a metamizolului, ambele conținând în structurile lor grupări amino. În urma acestei extracții selective, 48% din cantitatea de fenpipramidă și doar 0,4% din cea de metamizol s-au regăsit în 1-octanol. Cu toate că doar jumătate din cantitatea de FP se extrage în solventul organic, problemele de selectivitate și sensibilitate au fost înlăturate datorită extracției slabe a metamizolului (acest procent însemnând, practic, o diluție de 250 ori a acestui compus). Un exemplu de cromatogramă obținută după extracția în 1-octanol, pentru o probă reală de Algifen, este ilustrată în **Fig.2.5.6**. Se poate observa și apariția picului corespunzător acidului picric, dar acesta nu interferează cu semnalul obținut pentru fenpipramidă.

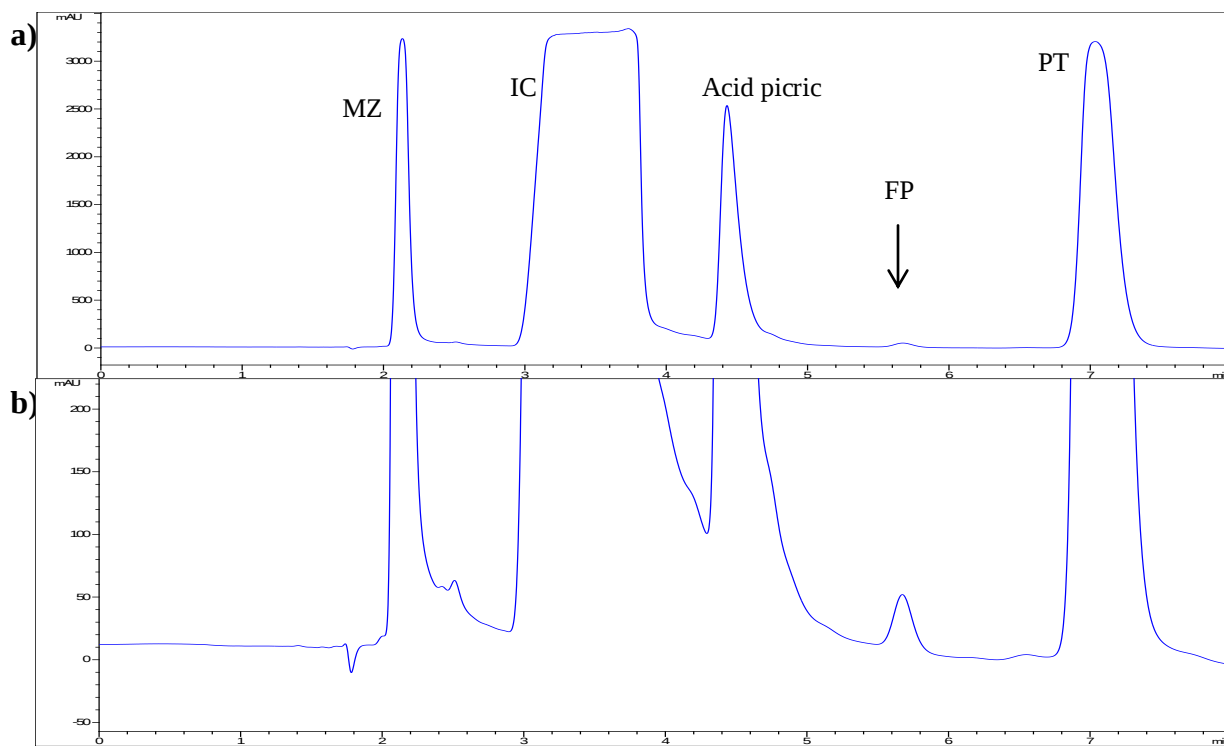


Fig.2.5.6. Cromatograma la scală normală (a) / detaliată (b) obținută în urma injectiei a 20 μ L soluție extrasă în 1-octanol pentru o probă reală de Algifen

2.5.1.4. Concluzii asupra studiului

A fost dezvoltată o metodă RP-LC rapidă, sensibilă, selectivă și precisă pentru determinarea simultană a MZ, FP, PT și IC din soluția injectabilă de Algifen®. Pentru creșterea sensibilității și selectivității metodei pentru determinarea FP, prezentă într-o concentrație foarte scăzută în acest medicament, s-a realizat o extracție lichid-lichid în 1-octanol. FP a fost extrasă sub formă de pereche ionică, cu acid picric în 1-octanol, iar stratul organic a fost injectat direct în coloana cromatografică (20 μ L) fără alte etape de pregătire a probei. Această extracție durează 15 minute și oferă rezultate precise, evitând posibile erori datorate unor etape ca evaporarea solventului sau redizolvarea reziduului uscat. Metoda a fost validată și este aplicabilă celor patru compuși investigați regăsiți în soluția injectabilă de Algifen®.

2.5.2. Determinarea unor derivați ai 4,4'-bipiridilului prin RP-IPC

Scopul acestui studiu a fost acela de a dezvolta o metodă pentru a modifica suprafața electrodului de carbon vitros utilizând un compus alchil-monoaminat derivat al 4,4'-bipiridilului, pentru determinarea Ag(I) prin voltametrie cu puls diferențial (DPV). Pentru aceasta a fost modificat 4,4'-bipiridilul (BiPy) introducând o grupare amino în scopul atașării acesteia de suprafața electrodului prin legarea încrucișată cu glutaraldehida. În prima fază, grupările 4-nitrobenzen au fost grefate pe electrod prin reducerea electrochimică a sării diazonice corespunzătoare; apoi grupările nitro de la suprafața electrodului au fost reduse la grupări aminice prin aplicarea unui potențial catodic. Ulterior, grupările aminice de la suprafața electrodului au fost activate cu glutaraldehidă și, în final, N-(2-aminoetil)-4,4'-bipiridina (ABP) a fost legată de siturile active ale glutaraldehidei. Electrocul astfel obținut a fost utilizat pentru preconcentrarea și determinarea Ag(I) prin DPV din diferite probe de apă.

Studiul RP-IPC al ABP sintetizate

Sinteza ABP (cu structura prezentată în **Fig.2.5.7**) a inclus un studiu al acestui compus prin cromatografie în fază inversă cu formare de perechi ionice. Acest studiu a constatat în analiza compusului rezultat din reacția BiPy cu cloretilamina (CEA) în diferite condiții de reacție.

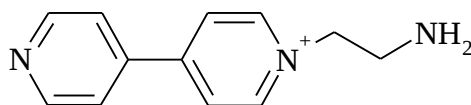


Fig. 2.5.7. Structura N-(2-aminoetil)-4,4'-bipiridinei

O primă etapă a analizei a constat în urmărirea dependențelor factorilor de retenție ai amestecului obținut în funcție de concentrația modificatorului organic din faza mobilă. S-a observat faptul că amestecul conține atât BiPy nereacționată, cât și compusul de sinteză, ABP; în ceea ce privește acest compus de sinteză dependența urmărită indică faptul că timpii de retenție și, respectiv, factorii de retenție corespunzători, cresc odată cu creșterea concentrației ACN din faza mobilă (**Fig.2.5.8**).

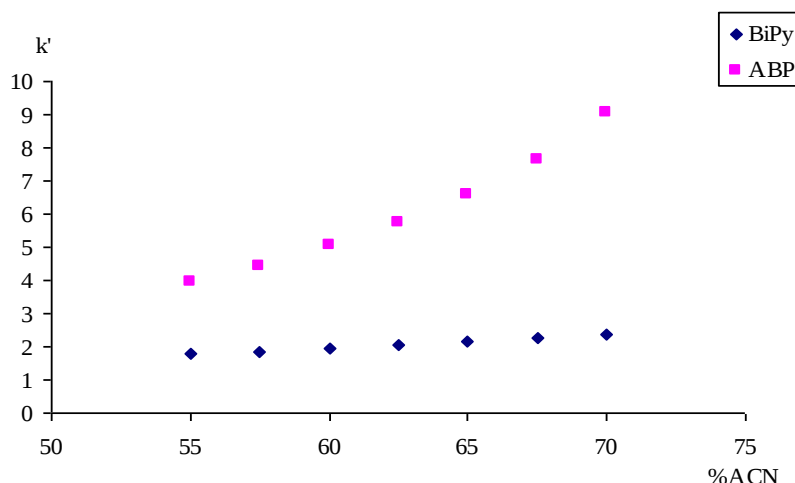


Fig2.5.8. Dependențele funcționale k' vs. %ACN obținute în analiza amestecului BiPy cu CEA prin RP-IPC

ABP a fost sintetizată cu scopul de a introduce o grupare amino în structura BiPy. Această grupare a fost utilizată pentru a lega compusul de suprafața electrodului de carbon vitros. Acest electrod modificat obținut s-a dovedit a fi un electrod stabil ce poate fi regenerat pentru cel puțin 30 de analize succesive)

Concluzii

Compusul sintetizat, N-(2-aminoetil)-4,4'-bipiridina, este un compus cationic care a fost analizat prin RP-IPC, utilizând hexansulfonatul de sodiu drept agent formator de perechi ionice.

În urma studiului s-a observat faptul că ABP are o retenție largă și o eficiență scăzută pe faza staționară C18 utilizată. Pe intervalul studiat de concentrație a modificatorului organic din faza mobilă (55%– 70%) s-a observat o creștere a retenției compusului odată cu creșterea concentrației de acetonitril, o posibilă explicație pentru acest comportament de retenție fiind faptul că modificatorul organic utilizat este un solvent slab pentru compusul în cauză.

2.6. Concluzii generale

În cadrul acestei teze au fost studiate comportamentele de retenție ale unor compuși polari sau cationici prin cromatografie de lichide în fază inversă, prin mecanism cu formare de perechi ionice (RP-IPC). Această tehnică de analiză este una foarte utilizată în special pentru separarea amestecurilor de compuși ionici sau disociabili găsiți adesea în prezența unor analiți neutri. Tehnica se bazează pe adăugarea unor agenți formatori de perechi ionice în faza mobilă cu scopul de a crește retenția componentelor ionici ai probei de analizat.

Studiile au cuprins analiza unor compuși puternic polari, ca cei din clasa biguanidinelor, sau a unora cationici, aparținând clasei oximelor sau lichidelor ionice, urmărindu-se explicarea comportamentelor de retenție pe baza unor modele teoretice de retenție RP-IPC propuse și dezvoltate de-a lungul timpului de cercetătorii în domeniu. În încercarea de a explica modul în care agenții formatori de perechi ionice influențează separările cromatografice, au fost utilizate mai multe modele, dintre care cele mai importante sunt cel al partiției și modelul electrostatic. În cazul modelului partiției, faza staționară este privită ca o peliculă de lichid hidrocarbonat peste suportul de silicagel, mecanismul de retenție constând în partiția moleculelor de analit între faza organică (stratul de lichid hidrocarbonat din faza staționară) și faza mobilă, parțial apoasă; în acest caz, procesul cromatografic este asemănat cu un proces de partiție lichid-lichid. Modelul electrostatic de retenție presupune formarea unui potențial la suprafața dintre faza mobilă și faza staționară hidrofobă, rezultat din adsorbția selectivă a ionilor amfifili ai agentului formator de perechi ionice. Retenția analiților ionici depinde atât de hidrofobicitatea acestora, cât și de potențialul electric al suprafeței. Avantajul major al acestei teorii de retenție electrostatică pentru cromatografia cu formare de perechi ionice îl constituie faptul că se regăsește în chimia fizică și oferă ecuații pentru testarea practică și predicția/ estimarea retenției. Fiecare dintre aceste modele poate explica comportamentul analiților de interes în anumite condiții experimentale și este posibil ca mecanismul de retenție să fie o combinație între aceste propuneri.

Comportamentul de retenție al analiților ionici sau disociabili în RP-IPC este un proces complex care depinde de numeroși parametri experimentali cum ar fi concentrația și hidrofobicitatea agentului formator de pereche ionică, concentrația modifierului organic din faza mobilă, natura modifierului organic, tăria ionică, natura fazei staționare, pH-ul componentei apoase a fazei mobile, temperatura sistemului. În cadrul tezei au fost urmărite influențele acestor parametri asupra retenției cromatografice și s-a încercat explicarea comportamentelor de retenție pe baza modelelor teoretice menționate anterior. Cu toate că aceste

modele teoretice ne oferă o perspectivă diferită asupra interacției dintre analit și faza staționară, ele pot fi utilizate în mod complementar pentru a explica diferite efecte pe care le pot avea parametrii experimentali asupra procesului de retenție în RP-IPC. În general, a fost observat faptul că efectele naturii agentului formator de perechi ionice și a concentrației sale în faza mobilă sunt bine explicate prin modelul electrostatic, dependențele prezise de acest model teoretic fiind utilizate cu succes în analiza compușilor. Cu ajutorul modelului partiției pot fi explicate bine efectele concentrației modifierului organic și pH-ului componentei apoase, obținându-se corelații bune pentru dependențele dintre parametrii experimentali și rezultatele cromatografice obținute.

În ceea ce privește oximele studiate prin RP-IPC, acestea au prezentat un comportament de retenție neobișnuit, puternic influențat de natura fazei staționare utilizate și de pH-ul componentei apoase a fazei mobile. În acest sens, s-au observat dependențe polinomiale, sub forma de U, ale logaritmulor factorilor de retenție în funcție de concentrația modifierului organic din faza mobilă în cazul în care acestea au fost studiate pe o fază staționară neinertizată, Zorbax ODS, la un pH acid al fazei mobile. Acest comportament de retenție nu a mai fost observat în cazul utilizării fazei staționare Eclipse XDB, la un pH acid, dar s-au regăsit în cazul desfășurării experimentelor la pH neutru al fazei mobile. Comportamentul de retenție neobișnuit observat în studiile efectuate poate fi explicat dacă se iau în considerare efectele tautomeriei în care sunt implicați compușii în cauză în funcție de pH-ul fazei mobile și în funcție de efectele modifierului organic, dar și ținându-se cont de modificările suprafeței fazei staționare aduse de adsorbția orientată a agentului formator de perechi ionice; de asemenea, o influență asupra retenției cromatografice o pot avea grupările silanol reziduale ale fazei staționare, ce pot interacționa cu analiții de interes.

O altă observație ce poate fi făcută în urma studiilor întreprinse în cadrul acestei teze este aceea că, în cazul analiților care prezintă dependențe liniare ale logaritmulor factorilor de retenție în funcție de concentrația modifierului organic din faza mobilă (compușii aparținând clasei biguanidinelor și oximele studiate pe coloana Eclipse XDB), comportamentul de retenție se poate explica pe baza modelelor teoretice menționate; în cazul analiților pentru care s-au obținut dependențe sub forma neobișnuită, de U (oximele și lichidele ionice studiate pe faza staționară Zorbax ODS), comportamentul de retenție nu s-a încadrat în aceste modele teoretice.

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE ÎN CADRUL TEZEI

1. V. Voicu, A. Medvedovici, M. Rădulescu, E. E. Iorgulescu, V. David, *Unusual retention behavior of some cationic-type aldoximes used as AChE reactivators under ion-pairing liquid chromatographic mechanism*. Analytical Letters, 43 (7-8), 1267-1276 (2010).
2. M. Rădulescu, V. Voicu, A. Medvedovici, V. David, *Retention study of some cation-type compounds using bile acid sodium salts as ion pairing agents in liquid chromatography*. Biomedical Chromatography, 25 (8), 873-878 (2011).
3. A. Medvedovici, I. D. Sora, M. Rădulescu, V. David, *Discontinuous double mechanism for the retention of some cation-type oximes on hydrophilic stationary phase in liquid chromatography*. Analytical Methods, 3 (2), 241-244 (2011).
4. M. Rădulescu, E. E. Iorgulescu, C. Mihailciuc, V. David, *Comparative study of the retention of pyridinium and imidazolium based ionic liquids on octadecylsilica stationary phase under ion pairing mechanism with alkylsulphonate anions*. Revue Roumaine de Chimie, 57 (1), 61-67 (2012).
5. M. Rădulescu, V. David, *Partition versus electrostatic model applied to the ion-pairing retention process of some guanidine based compounds*. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 35(14), 2042-2053 (2012).
6. T. Galaon, M. Rădulescu, A. Medvedovici, V. David, *Use of an immiscible diluent in ionic liquid / ionic pair LC for the assay of an injectable analgesic*. Central European Journal of Chemistry, 10(4), 1360-1368 (2012).
7. M.-C. Radulescu, A. Chira, M. Rădulescu, B. Bucur, M. P. Bucur, G. L. Radu, *Determination of Silver(I) by Differential Pulse Voltammetry Using a Glassy Carbon Electrode Modified with Synthesized N-(2-Aminoethyl)-4,4'-Bipyridine*, Sensors, 10, 11340-11351 (2010)

Comunicări științifice

1. A. Medvedovici, V. A. Voicu, M. Rădulescu, V. David, *Hydrophobic/hydrophilic character of some cation-type aldoximes studied by liquid chromatography under ion-pairing and HILIC partition mechanisms*, 11th International Congress of Clinical Pharmacology, Therapeutics and Toxicology, Oradea, Romania (2010)
2. T. Galaon, M. Rădulescu, A. Medvedovici, V. David, *Liquid-liquid extraction of Fenpiverine in 1-octanol followed by direct injection in LC and simultaneous quantitation of Fenpiverine, Metamizole, Metamizole impurity C and Pitofenone in an injectable drug by ion-pair RP-LC*, Recent Developments in Pharmaceutical Analysis, 14th International Meeting, Pavia, Italia (2011)
– poster