

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

**Kavitandok retenciós mechanizmusának vizsgálata
fordított fázisú kromatográfiás rendszerben és a víz-
adszorpció tanulmányozása HILIC kromatográfiás
rendszerben**

PhD értekezés tézisei

Bartó Endre

Témavezetők:

Dr. Felinger Attila

egyetemi tanár

Dr. Kiss Ibolya

egyetemi adjunktus



2018, Pécs

1 Bevezetés

A kavitandók széleskörű kromatográfiás alkalmazásával ellentétben, a kromatográfiás vizsgálatuk nem elterjedt. Valamely vegyület folyadékkromatográfiás viselkedéséért azok a kölcsönhatások felelősek, amelyek a vegyület és a kromatográfiás fázisok között alakulnak ki. Ezekért pedig az adott vegyület szerkezete, mindenekelőtt funkciós csoportjai, valamint az álló- és mozgófázis anyagi minősége, elsősorban – de nem kizárólag – funkciós csoportjai tehetők felelőssé. A retenciós mechanizmust a retenciós tényező és a termodinamikai paraméterek közötti összefüggés segítségével vizsgálhatjuk. A retenciós tényező hőmérsékletfüggéséből kiszámítható a minták állófázishoz kötődésének entalpia-, entrópia-, valamint szabadentalpia-változása. A kromatográfiás állófázis és az oszlopra juttatott minta molekulái közötti kölcsönhatást, a megkötődési mechanizmust leggyakrabban az oszlop túlterhelésével, a nemlineáris izotermák meghatározásával jellemzik. Ezen izotermák meghatározására több módszer is létezik. Ilyenek például a frontális elemzés vagy az inverz módszer. A frontális elemzés a legelterjedtebb és a legpontosabb. Az inverz módszer a népszerűségét a kismennyiségű oldószer felhasználásnak és a viszonylag rövid kísérleti időnek köszönheti.

Az vizsgált vegyület moláris térfogatváltozása kapcsolatban van a minta és az állófázis között kialakuló kölcsönhatással. Ha a moláris térfogatváltozás negatív, vagyis az oldott anyag kisebb térfogatban tartózkodik az állófázison, mint a mozgófázisban, a vizsgált vegyület retenciója, a Le Chatelier elvének megfelelően, a nyomás növekedésével nő. Ezért a retenciós tényező nyomásfüggéséből kiszámítható a vizsgált anyag retenció során bekövetkezett moláris térfogatváltozása.

Általánosan elfogadott, hogy a HILIC rendszerben a retenciós mechanizmus a nagyrészt szerves mozgófázis és a vízben gazdag mozgófázis réteg közötti megoszlást foglalja magában az állófázis felszínén. Az mozgó fázisokból történő vízfelvételt frontális elemzéssel tanulmányozhatjuk, coulometriás Karl Fischer titrálással meghatározható az oszlopról távozó mozgófázis víztartalma. Ebből az állófázison adszorbeált víz mennyiségére következtethetünk.

2 Célok és áttekintés

A rezorcinarénok és kavítandók kromatográfiás viselkedésének a megértéséhez vizsgáltam ezen vegyületek retenciójának hőmérséklet és nyomásfüggését, ACN:H₂O és MeOH:H₂O mozgófázist alkalmazva. Továbbá az inverz módszert alkalmazva meghatároztam a megkötődés mechanizmusát jellemző izotermákat.

A rezorcinarénok és kavítandók retenciójának vizsgálatával párhuzamosan, víz adszorpciójának hőmérsékletfüggését is tanulmányoztam HILIC kromatográfiás rendszerben.

Főbb célkitűzések:

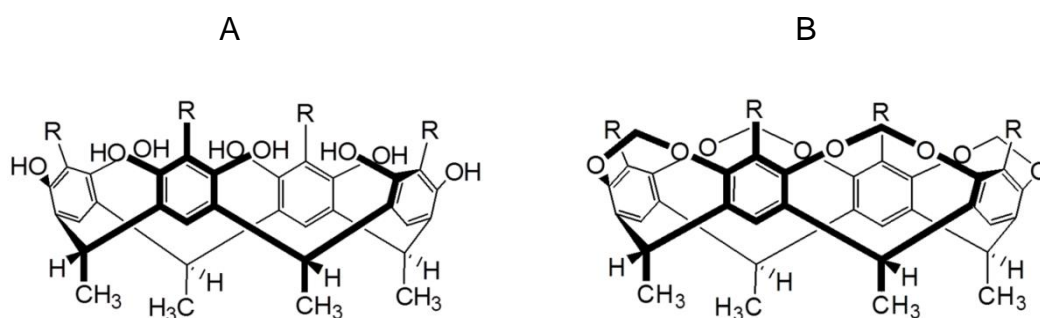
- a rezorcinarénok (HRM, MCM) és kavítandók (HCM, MCM) kromatográfiás viselkedésének tanulmányozása. A retenció termodinamikai paramétereinek (entalpia- és entrópiaváltozása, valamint a folyamat hajtóerejét meghatározó szabadenergia-változás) meghatározása, különböző fordított fázisú állófázisokon,
- az egyensúlyi adszorpció izoterma paramétereinek meghatározása inverz módszer segítségével és az izoterma meghatározással, illetve a termodinamikai paraméterek meghatározása által kiszámítható Henry állandók összehasonlítása,
- a kavítandók különböző állófázison történő megkötődésére jellemző moláris térfogatváltozás meghatározása,
- vízadszorpció hőmérsékletfüggésének a tanulmányozása HILIC kromatográfiás rendszerben.

3 Kísérleti körülmények

3.1 Felhasznált vegyszerek és minták

A kísérletekben használt acetonitril, metanol, tetrahidrofuran és víz HPLC tisztaságúak voltak. A tiokarbamid, toluolal, polisztirol, és a Coulomat AG reagens a Sigma-Aldrich-től volt beszerezve (Steinheim, Germany). A vízadszorpciós kísérletekben felhasznált vizet a Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) víztisztító rendszerrel tisztítottuk. Az általunk vizsgált mintákat a Pécsi Tudományegyetem Szervetlen Kémia Tanszékén állították elő.

Két típusú makrociklusos vegyületet vizsgáltunk, a felső részen hidrogént (HRM) vagy metil-csoportot (MRM) tartalmazó rezorcinaréneket és a merevebb szerkezetű, kavítandót (HCM) és 2-metil-kavítandót (MCM).



1. ábra: A vizsgált rezorcinarén és kavítandó származékok szerkezeti képletei. (A) R = H → HRM; R = CH₃ → MRM és (B) R = H → HCM és R = CH₃ → MCM.

Az alkalmazott oszlopok:

- Hypersil BDS C8 and C18 (100 × 4.6 mm; szemcseméret 3 μm)
- XTerra RP8 and RP18 (100 × 4.6 mm; szemcseméret 3.5 μm)
- Cogent Silica C (150 × 4.6 mm; szemcseméret 4 μm)
- Cogent Phenyl hydride (150 × 4.6 mm; szemcseméret 4 μm)

A makrociklusos vegyületek vizsgálatánál a holtidőt tiokarbamiddal határoztuk meg, míg a vízadszorpció vizsgálatokor toluolt használtunk.

3.2 A termodinamikai mérések körülményei

A méréseket az Agilent 1290 Infinity HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) kromatográfiás berendezés segítségével végeztem. A berendezés tartalmaz

egy bináris pumparendszert, kolonna termosztátot, automata mintaadagolót, UV-VIS detektort.

Mozgófázis összetételek: ACN:H₂O 55:45 (v/v%), MeOH:H₂O 72:28 és 88:12 (v/v%). Az áramlási sebesség 1 ml/perc volt. A méréseket 15, 25, 35, and 45 °C-on végeztük. Az injektálási térfogat 2 µl volt és mindegyik esetben háromszor ismételtük meg az injektálást. A detektálás 230 nm-en történt. A minták a mozgófázisban voltak feloldva 0,5 mg/ml-es koncentrációban.

3.3 A retenció nyomásfüggésének mérési körülményei

A méréseket az Agilent 1290 Infinity HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) kromatográfiás berendezés segítségével végeztem. A berendezés tartalmaz egy bináris pumparendszert, kolonna termosztát, automata mintaadagolót, UV-VIS detektort.

Mozgófázis összetételek: MeOH:H₂O 72:28 (HRM) és 88:12 (MCM) (v/v%). Az áramlási sebesség 0,1 ml/perc volt. A méréseket 25 °C-on végeztük. Az injektálási térfogat 2 µl volt és minden esetben háromszor ismételtük meg az injektálást. A detektálás 230 nm-en történt. A minták a mozgófázisban voltak feloldva 0,1 mg/ml-es koncentrációban. A vizsgálatokat 1-320 bar nyomásesés mellett végeztük.

3.4 A túlterheléses mérések körülményei

A méréseket egy Shimadzu kromatográfiás berendezés segítségével végeztem. A berendezés része volt két LC-10AD pumpa és egy SPD-M10A VP diódasoros detektor UV-VIS detektor.

Mozgófázis összetételek: MeOH:H₂O 72:28 és 88:12 (v/v%). Az áramlási sebesség 1 ml/perc volt. A méréseket 25 °C-on végeztük. Manuálisan történt az injektálás. Az injektálási térfogat 200 µl volt és minden esetben háromszor ismételtük meg az injektálást. A minták a mozgófázisban voltak feloldva: az MCM MeOH:H₂O 88:12 (v/v%) oldatban volt feloldva, koncentrációja 0.6 g/l volt. A HRM MeOH:H₂O 72:28 (v/v%) oldatban volt feloldva, 3 g/l-es koncentrációban.

3.5 A vízadszorpció meghatározásának mérési körülményei

A méréseket egy ECOM (Prague, Czech Republic) kromatográfiás berendezés segítségével végeztem. A frakciógyűjtés CF-1 Fraction Collector (Spectrum Chromatography, Houston, TX, USA) alkalmazásával valósult meg.

Mozgófázis összetételek: MeOH:H₂O 72:28 (HRM) és 88:12 (MCM) (v/v%). Az áramlási sebesség 1 ml/perc volt. A méréseket 40, 60, 80 100 °C-on végeztük. A frakciók vízmeghatározására egy 831 KF Coulometer készüléket használtam 728 Ti Stand mágneses keverővel (Metrohm, Herisau, Switzerland). Egy LC0101 (ECOM, Prague, Czech Republic) kolonnatermosztátot használtam.

4 Eredmények

A mérési eredmények szerint a rezorcinarének (HRM, MRM) és a kavítandók (HCM, MCM) retenciója között nagy különbség tapasztalható. Egyes esetekben a kavítandók retenciós tényezője százszor nagyobb volt, mint a rezorcinarének retenciós tényezője. A metilezett származékok (MRM, MCM) retenciója két-négyszer nagyobb volt a felső peremen a metil csoportot nem tartalmazó vegyületek retenciójához képest (HRM, HCM). Az eredmények alapján nyilvánvaló, hogy a rezorcinarének és a kavítandók megkötődése a mozgófázisból az állófázison, entalpiavezérelt folyamat.

Metanol-víz mozgófázist alkalmazva a szolvatált vegyületek és a felületen adszorbeált metanol molekulák között hidrogénkötések domináltak. Ezért nagyobb volt a hidroxilcsoportokat tartalmazó rezorcinarének retenciója MeOH: H₂O rendszerben, mint az acetonitrilt tartalmazó mozgófázis alkalmazásakor. Az ACN: H₂O mozgófázist alkalmazva az entrópiaváltozás értékének növekedése a MeOH:H₂O rendszerben kapott entrópiaváltozás értékéhez képest, a vastagon adszorbeált acetonitril rétegnek köszönhető. Ez szignifikáns volt apoláris kavítandók esetében. Az XTerra oszlop poláris beágyazott csoportjainak hatása az ACN:H₂O mozgófázist alkalmazva nyilvánulhatott meg. Ezzel ellentétben nem volt különbség a BDS és az XTerra oszlopon mért rezorcinarének entalpiaváltozás értékei között a metanol tartalmú mozgófázist alkalmazva.

A rezorcinarének és kavítandók retenciós viselkedését nemlineáris kromatográfiás módszerekkel is vizsgáltam. Az inverz módszert alkalmaztam az adszorpciós izotermák meghatározására. A Langmuir-izotermát választva az izoterma paramétereit meghatároztam. A HRM és MCM számított adszorpciós-deszorpciós egyensúlyi állandó háromszor és kétszer nagyobb a C₁₈-on, mint a C₈ oszlopon.

A *b* izoterma paraméter kapcsolódik a vizsgált vegyületek adszorpciós energiájához, miszerint a minták és az oktadecil láncok között nagyobb az adszorpciós energia értéke, mint a minták és az oktil láncok között. A HRM esetében a telítési kapacitás kétszerese volt a C₈ oszlopon, mint a C₁₈-as állófázison, de ez az érték az MCM esetében a C₈-as állófázison volt kisebb. A Henry állandó értéke az MCM esetében körülbelül 28-szor nagyobb volt, mint a HRM esetében, C₁₈ oszlopon. A C₈ oszlopon kapott Henry állandó értéke az MCM esetében 15-ször nagyobb, mint az HRM ese-

tében. A lineáris és nemlineáris kromatográfiával kiszámított Henry állandókat összehasonlítva jó egyezést kapunk.

A fordított fázisú kromatográfiában általában a nyomás növekedésével a retenció is nő. A polárisabb HRM és az apoláris MCM retenciós tényezői az oszlopnomás növekedésével növekedtek mindegyik állófázis esetén. A HRM moláris-térfogatváltozása $-\Delta V_m = 9-19$ ml/mol között volt, és ez az érték MCM esetében

$-\Delta V_m = 5-12$ ml/mol. A rezorcinarén nagyobb moláris térfogatváltozásai többnyire a szolvatációs réteg nagyobb mértékű elvesztésének és a konformációs változásoknak köszönhetők. A vizsgált vegyületek moláris térfogatváltozása a Hypersil BDS oszlopon kétszer akkora értéket vesz fel, mint az XTerra C₈ vagy C₁₈ oszlopokon

A vízadszorpciós kísérletekben a hidrofobicitás hőmérsékletfüggését tanulmányoztam két különböző típusú HILIC állófázison. Az oszlop teljes telítettsége esetén az adszorbeált víz a pórustérfogat 4,02–7,57% -át teszi ki, ami megközelítőleg megfelel az adszorbens felületének 0,24–0,68-as vízréteggel való lefedettségének. A Silica C oszlopon az adszorbeált monomolekuláris vízréteg enyhe növekedést mutat hőmérséklet növekedésével, míg a Phenyl Hydrid oszlop esetén az adszorbeált monomolekuláris vízréteget nem befolyásolja a szignifikánsan hőmérséklet.

5 Tézispontok

- 1 A meghatározott termodinamikai paraméterek alapján nyilvánvaló, hogy a rezorcinarénok és kavitandok mozgó fázisból állófázisra való jutása entalpiavezérelt folyamat, mivel az összes minta esetén az entalpia hozzájárulása szignifikánssabbnak bizonyult, mint azok entrópiikus hozzájárulása az átviteli folyamathoz.
- 2 ACN:H₂O rendszerben a rezorcinarénok és a kavitandok retenciója közötti nagy különbséget a kavitandok megkötődésének magasabb entrópiikus hozzájárulása is mutatja. Az entrópiai hozzájárulásának magasabb értéke nagyobb retenciót eredményez. Különösen az MCM esetében tapasztalható, mivel itt az entrópiaváltozás értéke egy nagyságrenddel nagyobb, a HRM és MRM esetében meghatározott entrópiaváltozás értékénél
- 3 A MeOH:H₂O elegyet alkalmazva mozgófázisként megállapítható hogy a vizsgált vegyületek megkötődésének entalpia- és entrópiaváltozás értéke abszolút értékben növekedett az ACN:H₂O-hoz képest.
- 4 A meghatározott adszorpciós-deszorpciós egyensúlyi állandó értéke HRM esetében háromszor, MCM esetében kétszer nagyobb volt C₁₈, mint a C₈ oszlopon.
- 5 Megállapítást nyert, hogy a moláris térfogatváltozás mind az apoláris, mind a polárisabb minták esetében kétszer nagyobb volt a Hypersil BDS oszlopokon, mint az XTerra oszlopokon, és függetlenek volt az álló fázisok alkil láncának hosszától.
- 6 A hidrofóbicitási kísérlet hőmérsékletfüggése esetén kiszámoltuk az adszorbeált monomolekuláris vízréteget. Ez lehetővé teszi a különböző oszlopokon és különböző hőmérsékleti értékek mellett meghatározott többlet víz felvételének az összehasonlítását.

6 Megjelent közlemények

6.1 A PhD értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények

I. Prauda, **E. Bartó**, and A. Felinger, "Influence of pressure on the retention of resorcinarene-based cavitands," *Journal of Chromatography A*, vol. 1535, pp. 123-128, 2018. Impact Factor: 3.981

E. Bartó, A. Felinger, and P. Jandera, "Investigation of the temperature dependence of water adsorption on silica-based stationary phases in hydrophilic interaction liquid chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 1489, pp. 143-148, 2017. Impact Factor: 3.981

E. Bartó, I. Prauda, F. Kilár, I. Kiss, and A. Felinger, "Investigation of retention mechanism of resorcinarene based cavitands by linear and nonlinear chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 1456, pp. 152-161, 2016. Impact Factor: 3.926

E. Bartó, I. Prauda, F. Kilár, I. Kiss, and A. Felinger, "Retention behavior of resorcinarene-based cavitands on C₈ and C₁₈ stationary phases," *Journal of Separation Science*, vol. 38, no. 17, pp. 2975-2982, 2015. Impact Factor: 2.741

E. Bartó, A. Felinger, F. Kilár, I. Prauda, and I. Kiss, "The Temperature Dependence of the Retention Factor of Cavitands on C₁₈ and C₈ Reversed Stationary Phases in HPLC," *Műszaki Szemle*, vol. 63, pp. 17-22, 2013.

6.2 A PhD értekezés témájában készült nem referált konferencia absztraktok

E. Bartó, I. Prauda, F. Kilár, I. Kiss, and A. Felinger; Kavítandok nemlineáris izotermájának meghatározása különböző fordított fázisú állófázisokon az inverz módszer segítségével; 20th International conference on chemistry, November 6-9, Kolozsvár (Cluj-Napoca, Romania), 2014

E. Bartó, I. Prauda, F. Kilár, I. Kiss, and A. Felinger; Kavítandok retenciós tényezőjének hőmérséklet függése különböző fordított fázisú állófázisokon; 19th International conference on chemistry, November 21-24, Nagybánya (Baia-Mare, Romania), 2013

E. Bartó, I. Prauda, F. Kilár, I. Kiss, V. Sándor and A. Felinger; Study of resorcin[4]arene derivatives in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography coupled Mass Spectrometry; 10th János Szentágothai Transdisciplinary Conference and Student Competition, November 4-5, Pécs (Hungary) 2013

E. Bartó, A. Felinger, and P. Jandera; Investigation of Temperature Dependence of Adsorption of Water from Aqueous Acetonitrile on Silica Based Stationary Phases; 10th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, September 6-8, Siófok (Hungary) 2015

E. Bartó, I. Prauda, F. Kilár, I. Kiss, and A. Felinger; Kavítandok retenciós jelenségének túlterheléses vizsgálata különböző állófázisokon; Elválástudományi Vándorgyűlés, October 12-14, Egerszalók (Hungary) 2014

E. Bartó, I. Prauda, F. Kilár, I. Kiss, and A. Felinger; Investigation of the retention phenomena of cavitands by column overload; 30th International Symposium on Chromatography, September 14-18, Salzburg (Austria) 2014

E. Bartó, I. Prauda, F. Kilár, I. Kiss, and A. Felinger; Temperature dependence of the retention factors of resorcinarene based cavitands on C₈ and C₁₈ reversed stationary phases; 30th international symposium on microscale bioseparations, April 27 – May 1, Pécs (Hungary) 2014

E. Bartó, I. Prauda, F. Kilár, I. Kiss, V. Sándor and A. Felinger; Analysis of resorcin[4]arene-based cavitand on different stationary phases; 9th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, September 4-6, Siófok (Hungary) 2013

E. Bartó, I. Prauda, F. Kilár, I. Kiss, V. Sándor and A. Felinger; Analysis of cavitand derivatives with High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry; 39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, June 16-20, Amsterdam (Netherlands) 2013

E. Bartó, I. Prauda, F. Kilár, I. Kiss, and A. Felinger; Application of Cavitand Derivatives on High Performance Liquid Chromatography; 10th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, April 25-27, Pécs (Hungary) 2013