

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

**Gyors folyadékkromatográfiás fordított fázisú állófázisok
kémiai és kinetikai jellemzése**

PhD értekezés tézisei

Zelenyánszki Dóra

Témavezető:

Dr. Felinger Attila

egyetemi tanár



PÉCS, 2021

1. Bevezetés

Az elválasztástechnikai eljárások közül az egyik leggyakrabban alkalmazott analitikai módszerre vált a folyadékkromatográfia (LC), mind a kutatás, mind a rutinvizsgálatok során. Az utóbbi évek során számos technikai fejlesztésnek köszönhetően az eddig elérhető nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiai (HPLC) készülékek mellett egyre nagyobb teret nyert az ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiai (UHPLC) készülékek használata is. Az alapvető különbség a két műszer között, hogy míg a HPLC-nél a felső nyomás korlátja 400 bar volt, addig az UHPLC készülékek 1000-1200 barig is üzemelnek.

Erre azért volt szükség, mert ha kisebb szemcseátmérőjű ún. szub-2 μm ($2 \mu\text{m}$ alatti) tölteteket használunk, akkor a nyomás növekedni fog. A nyomásesés mérséklése érdekében UHPLC-s rendszereknél általában rövid folyadékkromatográfiai oszlopokat használnak.

Így az elemzési idő is csökkenthető az elválasztások során a rövidebb oszlopkialakítás és az alkalmazható magasabb optimális lineáris sebességeknek köszönhetően, emellett azonban az oszlop hatékonysága nem feltétlenül nő. Az elválasztás hatékonyságának növelése érdekében hosszabb oszlopokra van szükség, melyek használata magasabb elméleti tényérszámot eredményez, de ebben az esetben ismét számolnunk kell a nyomás, illetve a mozgófázis sűrűlódási hőjének növekedésével, így az oszlop és a készülék korlátaival.

A készülékek fejlődésével párhuzamosan az állófázisok területén is folyamatos újításokkal állnak elő a gyártók a felhasználók igényeinek kielégítésére. A részecskeméreték folyamatos csökkentése mellett fontos megemlíteni, hogy a nem-porózus, a perfúziós és a teljesen porózus töltetek mellett megjelentek a héjszerkezetű és az monolit típusú állófázisok is.

Az állófázisok szerkezetének fejlődése mellett nagy hangsúlyt fektetnek még arra, hogy a töltetek szélesebb pH tartományban is használhatóak legyenek, erre a célra először a Waters fejlesztett olyan szilikagél alapú állófázist (XTerra), amely a vázában metilénsoportokat is tartalmazott. Ezek az oszlopok bázikus körülmények között sokkal stabilabbnak bizonyultak, mint a korábbi szilikagélek. Később szintén a Waters használt etilénnel kapcsolt trietoxi-szilánt a szol-gél kialakításához. Ezeket az oszlopokat XBridge néven hozták forgalomba.

Kirkland és munkatársai két szomszédos szilanolcsoport segítségével egy speciális kötésű fázist fejlesztettek ki. Ezt a terméket az Agilent Technologies Zorbax Extend néven forgalmazza és számos oszlopkonfigurációban kapható. A Phenomenex is kifejlesztett egy eljárást, hogy állófázisaik kiterjesztett pH tartományon belül is alkalmazhatóak legyenek. A szilikagél gyártásának utolsó szakaszában egy szerves réteggel új kompozit részecskét hoznak létre.

Így a részecske mechanikai szilárdsága és hatékonysága megmarad, miközben a szerves héj megvédi a részecskét.

Az is fontos fejlesztési szempont volt, hogy bázikus vegyületek elválasztása is lehetséges legyen fordított folyadékkromatográfiás körülmények között. Ehhez ma már rendelkezésünkre állnak az ún. bázis-deaktivált fordított fázisú állófázisok, melyeknél a szilikagél felületi módosítása során hátramaradt szabad szilanolcsoportok számát utószilanizálással csökkentik minimálisra.

2. Célkitűzések

Kutatásom főbb céljai a következők voltak:

1. Tanaka-teszt lépéseit követve meghatározzuk az állófázison a hidrofób retenciót (k_{AB}), a felületi borítottságot (α_{CH2}), a sztérikus szelektivitást ($\alpha_{i/o}$) és a H-hidas kötésekre való hajlamot (α_{CP}) fordított fázisú gyors folyadékkromatográfiás oszlopok esetében.
2. Az állófázisokon visszamaradt szilanolcsoportok hatása különböző tesztvegyületek segítségével vizsgálható. A hagyományos tesztek esetén egyre jobb eredményeket produkálnak ezek az új típusú, bázis-deaktivált (base-deactivated) állófázisok, éppen ezért érdemes több tesztkomponenst kiválasztani a vizsgálatok során, amelyek érzékenyebbek a szilanolcsoportokra. A retenció (k) és aszimmetria ($USP T_f$) értékeket mindegyik oszlop esetében meghatározásra kerülnek.
3. A kapott értékek alapján összehasonlítom a különböző típusú állófázisokat.
4. 3-3 teljesen (5, 10, 15 cm hosszú) porózus és héjszerkezetű töltettel rendelkező oszlopot vizsgálok oszlopforgatásos módszer segítségével:
 - első lépésként az oszlopok hatékonyságának vizsgálata (H_{min}), az optimális áramlási sebesség meghatározása
 - a mintakomponens (kismolekula) diffúziós együtthatójának megállapítása „peak parking”, vagyis csúcsparkoltatásos/ megállított áramlásos módszerrel
 - oszlopforgatásos mérések elvégzése az oszlopok különböző „szeleteinél”
 - a csúcsszélesítő hatások összevetése a különböző oszlopok esetében (töltetágy heterogenitása, oszlopvégek hatása)
 - összefüggést keresek az oszloptöltés hatása és a töltetágy heterogenitása között
5. Héjszerkezetű oszlop esetében vizsgálni fogom, hogy az oszlopforgatásos módszer kivitelezhető-e nagy molekulákkal is. Ezzel ki tudnám zárni a pórusokon belüli diffúzió hatását a csúcsszélesedésre.
6. Korábban már használt oszlopok fritjeit fogom vizsgálni elektronmikroszkóppal, hogy kiderítsem van-e bármilyen roncsoló hatása a töltésnek a fritek szerkezetére és a szemcsék épségére.

3. Alkalmazott módszerek

Munkám során a kromatográfiás méréseket egy Waters Acquity I Class UPLC készüléken végeztem el.

Tanaka-teszt

Tanaka és munkatársai által bevezetett módszer a C₁₈-as fordított fázisú állófázisok jellemzésére használható. A módszer segítségével megbecsülhető a töltet alkiláncainak mennyisége, hidrofób jellege, szterikus szelektivitása és a hidrogén-hidas kötési képessége és a felületen maradt szabad szilanolcsoportok mennyisége. Ezt a vizsgálatot a töltet roncsolása nélkül különböző tesztvegyületek injektálásával lehet megvalósítani. A mintakomponensek retenciós tényezői, elválasztási tényezői és a kromatográfiás csúcsok aszimmetriája ad információt a töltetek említett tulajdonságairól.

Csúcsparkoltatás

A csúcsparkoltatásos mérések során egy retenció nélküli komponenst injektálunk a vizsgált oszlopra. Ahogy a mintasáv eléri az oszlop közepét megállítjuk az áramlást adott időkre (parkolási idő), ezalatt a minta szabadon tud diffundálni axiális irányba. A parkolási idő és a csúcsszélesség között lineáris összefüggés figyelhető meg és az ábrázolt egyenes meredekségéből a minta effektív diffúziós együtthatója kiszámolható.

Az oszlopforgatásos módszer

Az oszlopforgatásos módszerrel vizsgálható a töltet axiális heterogenitása, így az oszlopvégek közti különbségek is. A mérések során egy retenció nélküli markert (tiokarbamid, inzulin) mintát injektálunk adott irányból az oszlopra. Ahogy a mintasáv megtett egy adott távolságot az oszlopban, megállítottuk az áramlást és az oszlopot megfordítottuk. A fordítás után az áramlást visszakapcsolva a minta az oszlop ugyanazon végén eluálódik, mint ahol belépett. Az oszlopforgatás ideje alatt a mintasáv szabadon diffundál axiális irányban, ezért a csúcsparkoltatásos mérések során meghatározott effektív diffúziós koefficiensből adódó variancia értékekkel az oszlopfogatás varianciaértékeit korrigálni kell.

4. Eredmények

A Tanaka-teszt során kapott eredmények szerint a vizsgált fordított fázisú C₁₈-as oszlopok (InertSustain, InertSustainSwift, InertCore, MotoTower, Kinetex, Kixetex EVO) meglehetősen hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek (az alkiláncok mennyiségét, a hidrofóbicitást, a sztérikus szelektivitást, a hidrogénkötési képességet tekintve), bár az állófázisok alapvetően különböznek - mint pl. monolit, tömörmagvú vagy teljesen porózus töltetek. A magasabb $\alpha_{C/P}$ értéke utalna a szilikagél felületén maradt szabad szilanolcsoportokra, de a vizsgált oszlopok esetében ez az érték is meglehetősen hasonló volt. Annak érdekében, hogy helyesen határozzuk meg a szilanolcsoportok mennyiségét, érzékenyebb tesztvegyületeket kellett használni. Ezen mérések segítségével különbséget tudtunk megfigyelni az oszlopok között. A legjobb csúcsalakokat az InertSustain és az InertSustainSwift segítségével sikerült elérni, amelyek teljesen porózus részecskékkel rendelkeznek. A Monotower oszlop is kimagasló eredményeket nyújtott az érzékenyebb tesztvegyületekkel. Ez valószínűleg annak egyedi pórusszerkezetének köszönhető. A tömörmagvú/mag-héj típusú oszlopok - például az InertCore, a Kinetex és a Kinetex EVO – bizonyultak a legkevésbé eredményesnek a tesztek során.

Az oszlopforgatásos mérések során minden esetben azt tapasztaltuk, hogy a csúcsok szimmetrikusabbak és keskenyebbek lesznek az áramlás megfordulásával. Ez a sokcsatornás diszperziós hatás és a radiális áramlási profil heterogenitásának kiküszöböléséből adódik.

Az oszlopok végének hatékonysága és a töltetágy hatékonysága - vagyis a lokális tányérmagasságok - különbözik egymástól; az oszlopok heterogének, de a különbség elhanyagolható, és nem lehetünk biztosak abban, hogy az oszlop be- vagy kimenete teljesít-e jobban. A lokális tányérmagasság értéke növekszik az oszlop hosszának növekedésével. Összehasonlítva ezeket a lokális tányérmagasságokat az oszlopra vonatkozó teljes tányérmagasság értékekkel, megállapíthatjuk a fritek és a frit közelében lévő töltetszerkezet hatása nagyobb a Cortecs oszlopoknál. Ezen kívül megállapíthatjuk, hogy a rövidebb oszlopok jobb hatékonysággal tölthetőek. Az eredmények azt mutatják, hogy az oszlop hossza befolyásolja a heterogenitást, és minél rövidebb az oszlop, annál jelentősebb a frit hatása. Ennek megfelelően, habár a rövidebb oszlopok töltetágya homogénebb, és a tányérmagasság értékeik is kisebbek, mint a hosszabb oszlopoké, a rövid oszlopok általános hatékonysága rosszabb, mint a hosszú oszlopoké, mivel a fritek relatív hozzájárulása a rövid oszlopoknál lényegesebb.

A makromolekulák molekuláris diffúziója sokkal kisebb, mint a kis molekuláké. Így a sugárirányú heterogenitás a töltetágyban kisebb mértékben befolyásolja migrációjukat és következésképpen nagyobb csúcskompressziós hatás figyelhető meg makromolekulák esetén, ha az áramlás megfordul. Az makromolekulákkal végzett oszlopforgatásos kísérlet segítségével mérhető volt az oszlopvégek közti különbség és a lokális tányérmagasság értékek közötti különbség is, attól függően, hogy milyen irányban használtuk az oszlopot. Viszont a Taylor – Aris diszperzió miatt a kísérleti körülményeket jelentősen meg kellett változtatni a kis molekulákkal végzett vizsgálatokéhoz képest, tehát a kísérletek sokkal hosszabbak, mint tiokarbamiddal vagy más kis molekulatömegű markerek esetén.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok során az oszlopok fritjein roncsolásra utaló nyomot nem találtunk a szerkezetükben. Viszont jól látható volt, hogy milyen heterogén ez a préselt fritszerkezet, amibe a töltetrészecskék is bele tudtak jutni, ezzel növelve a mérések során a falhatást, ami fokozza a fritek sávszélesítő hatását.

5. Tézispontok

1. A Tanaka teszt eredményei alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a különböző típusú állófázisok jelentős különbségeket mutatnak az érzékeny tesztvegyületek alkalmazásakor. Különbségek figyelhetők meg a szilanolcsoportok jelenlétét illetően és a jövőben érdemes lenne más hasznosítható érzékeny tesztvegyületeket is azonosítani. Azt is megállapítottam, hogy mivel gyártónként eltérőek az állófázisokhoz használt szilikagélek (széntartalom, fajlagos felület, porozitás) nem látok lehetőséget arra, hogy kidolgozható lenne egy univerzális tesztelési módszer a későbbiekben.
2. A UHPLC-s oszlopokkal való mérések során is csúcskompressziós hatást figyeltem meg. A megfordított áramlásnál megfigyelt csúcsok mindig keskenyebbek és szimmetrikusabbak voltak, mint az áramlás megfordítása nélkül kapott csúcsok. Ez a sokcsatornás diszperziós hatás kompenzációjából és az áramlás sugárirányú heterogenitásából származik.
3. Az oszlopforgatásos mérések után összehasonlítva a lokális tányérmagasságokat az oszlopra vonatkozó teljes tányérmagasság értékekkel, megállapítottam, hogy a fritek és a frit közelében lévő töltetszerkezet hatása nagyobb volt a Cortecs oszlopoknál. Ezen kívül megállapítottam, hogy a rövidebb oszlopok jobb hatékonysággal tölthetőek. Az eredmények azt mutatják, hogy az oszlop hossza befolyásolja a heterogenitást, és minél rövidebb az oszlop, annál jelentősebb a frit hatása. Ennek megfelelően, habár a rövidebb oszlopok töltetágya homogénebb, és a tányérmagasság értékeik is kisebbek, mint a hosszabb oszlopoké, a rövid oszlopok általános hatékonysága rosszabb, mint a hosszú oszlopoké, mivel a fritek relatív hozzájárulása a rövid oszlopoknál lényegesebb. Az eredmények alapján az is megállapítható, hogy a csúcsszélesedés 70-80 %-át a készülék hozzájárulása és az oszlopvégek okozzák, míg a maradék 20-30%-os szélesedés származik a töltetágy hatásából (ez alól kivételt képez az XBridge 15 cm-es oszlop, ahol ez az arány kb. 50-50%-os).
4. Az makromolekulákkal végzett oszlopforgatásos kísérlet segítségével is mérhető volt az oszlopvégek közti különbség és a lokális tányérmagasság értékek közötti különbség is, attól függően, hogy milyen irányban használtuk az oszlopot. Megállapítottam, hogy az oszlop bemeneti végének kialakítása (illesztés, frit és a töltetszerkezet az oszlop végén) nagyobb mértékben járult hozzá a varianciához,

mint az oszlop kimeneti vége. Valószínűleg ez a különbség az oszloptöltési eljárásból fakad, mivel az oszlop végek közelében a részecskesűrűségnek és a szerkezeti felépítésének különböznie kell. Továbbá a két oszlopvég okozta a sávszélesedés nagyobb volt, mint a töltetágy sávszélesítő hatása. Továbbá a csúcskompresszió mértéke jelentősnek bizonyult, viszont a Taylor-Aris diszperzióból adódóan a mérések sokkal bonyolultabbakká, hosszabbá váltak, mint a kismolekulák esetében, így a jövőbeni oszlopforgatásos mérésekhez továbbra is célszerűbb a kismolekulás opciót választani.

5. Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal megvizsgáltam, hogy az oszloptöltés okoz-e bármilyen károsodást a frit és a töltet szerkezetében. Magában a frit anyagában és a töltet részecskéin elváltozásokat nem észleltem, viszont jól látható volt, hogy a töltetrészecskék bejutnak a frit szerkezetébe, növelve a falhatást és ezzel a sávszélesedést.

6. Megjelent közlemények

A PhD értekezés alapjául szolgáló publikációk

1. D. Zelenyánszki, A. Mester, A. Felinger
Flow-Reversal experiments with macromolecules to measure column end efficiency and bed heterogeneity
Chromatographia, 82 (2019), 1303–1309 **IF: 1,596**
2. D. Zelenyánszki, N. Lambert, F. Gritti, A. Felinger
The effect of column packing procedure on column end efficiency and on bed heterogeneity – experiments with flow-reversal
J. Chromatogr. A 1603 (2019), 412 – 416. **IF: 4,049**
3. D. Zelenyánszki, N. Lambert, N. Tanaka, A. Felinger
Chemical characterization of stationary phases for fast liquid chromatography – with focus on the residual silanol groups
J. Chromatogr. A - beküldés latt **IF: 4,759**
4. D. Zelenyánszki, A. Felinger
The impact of column hardware on efficiency in liquid chromatography
LCGC Europe 33 (2020), 498-504 **IF: 0,529**

A PhD értekezés témájában készült nem referált konferencia absztraktok

1. Zelenyánszki D., Lambert N., Tanaka N., Felinger A.
A szilanol-hatás vizsgálata fordított fázisú folyadékkromatográfiában alkalmazott állófázisok esetében
V. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia 2016. Pécs; Magyarország 198-199. o.
2. D. Zelenyánszki, N. Lambert, N. Tanaka, A. Felinger
Chemical characterization of stationary phases for fast liquid chromatography
16th ISSSB (CEEPUS) International Symposium and Summer School on Bioanalysis 2016. Varsó; Lengyelország, P-29
3. Zelenyánszki D., Lambert N., Tanaka N., Felinger A.
Fordított fázisú folyadékkromatográfiás állófázisok jellemzése
Elvásztástudományi Vándorgyűlés 2016. Kecskemét; Magyarország, P-42

4. D. Zelenyánszki , N. Lambert, N. Tanaka, A. Felinger
Chemical characterization of stationary phases for fast liquid chromatography
17th ISSSB (CEEPUS) International Symposium and Summer School on Bioanalysis 2017. Ohrid;
Macedónia, O-09
5. A. Mester, D. Zelenyánszki, A. Felinger
Comparison of various reversed phase stationary phases by manual and automatized flow-reversal
method
17th ISSSB (CEEPUS) International Symposium and Summer School on Bioanalysis 2017. Ohrid;
Macedónia, O-17
6. A. Mester, D. Zelenyánszki, A. Felinger
Comparison of various reversed phase stationary phases by flow-reversal method
XI. Balaton Symposium on High Performance Separation Methods 2017. Siófok; Magyarország, P-46
7. N. Lambert, D. Zelenyánszki, A. Felinger
Characterization of stationary phases for fast liquid chromatography
XI. Balaton Symposium on High Performance Separation Methods 2017. Siófok; Magyarország, L-42
8. D. Zelenyánszki, N. Lambert, F. Gritti, A. Felinger
Effect of column packing procedure on the column end structure and bed heterogeneity – experiments
with flow-reversal
32nd International Symposium on Chromatography (ISC) 2018. Cannes-Mandelieu, Franciaország, PS-
07-15
9. Zelenyánszki D., Lambert N., Gritti F., Felinger A.
Az oszloptöltés hatása gyors folyadékkromatográfiás állófázisok heterogenitására – kísérletek
„oszlopforgatásos” módszerrel
Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2018. Tapolca; Magyarország, E-28
10. D. Zelenyánszki, A. Mester, A. Felinger
Flow-reversal experiments with macromolecules to measure column end efficiency and bed
heterogeneity
V. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia 2016. Pécs; Magyarország, 170. o.
11. D. Zelenyánszki, N. Lambert, F. Gritti, A. Felinger
Effect of column packing procedure on the column ends structure and on bed heterogeneity -
experiments with flow-reversal
International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques
(HPLC) 2019. Milánó; Olaszország, P-440

12. D. Zelenyánszki, A. Felinger

Efficiency, bed heterogeneity and column and structure of segmented columns – experiments with flow-reversal

XII. Balaton Symposium on High Performance Separation Methods 2019. Siófok; Magyarország, P-14

A PhD értekezés témáján kívül készült nem referált konferencia absztraktok

1. Simon J., Rédei Cs., Zelenyánszki D., Felinger A.

Komplex mintakeverékből származó komponensek eredetének meghatározása és vizsgálata alterációs analízissel

Elvásztástudományi Vándorgyűlés 2018. Tapolca; Magyarország, E-22

2. Simon J., Rédei Cs., Zelenyánszki D., Felinger A.

Two-dimensional correlation and alteration analysis in chromatography International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC) 2019. Milánó; Olaszország, OC-154

3. Simon J., Rédei Cs., Zelenyánszki D., Felinger A.

Exploring two- and three-dimensional chromatographic data with alteration analysis

XII. Balaton Symposium on High Performance Separation Methods 2019. Siófok; Magyarország, L-16