

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

Adszorpció és megoszlás leírása fordított fázisú folyadékkromatográfiában

PhD értekezés

Vajda Péter

Témavezető:

Dr. Felinger Attila

egyetemi tanár



PÉCS, 2011

1. Bevezetés

Az elválasztási folyamat során alkalmazott mintakoncentrációk alapján megkülönböztethetünk lineáris-, és nemlineáris-kromatográfiát. A lineáris kromatográfia vagy analitikai kromatográfia az általánosan használt eljárás kis koncentrációjú komplex minták elválasztására, szennyeződések, alkotórészek kimutatására. A nemlineáris kromatográfia nagy koncentrációjú minták tisztításával foglalkozik.

A linearitás vagy nemlinearitás valójában az adott komponens izotermájának alakjára utal. Minden izoterma a kísérleti körülményektől függő koncentrációtartományban egy lineáris szakasszal indul amelyet, a mintakoncentrációt növelve, egy görbült szakasz követ. Az izotermák alapvetően megszabják a vonatkozó alkotó viselkedését kromatográfiás rendszerekben. Előrejelzést adnak mekkora koncentrációig áll fenn a lineáris viselkedés, és mely koncentrációküszöbtől kell figyelembe venni az izoterma görbületéből adódó hatásokat.

A nemlineáris oszlopkromatográfia alkalmazásával részletes betekintést nyerhetünk az oszlopban lévő tölteten vagy más szóval adszorbensen végbemenő visszatartási mechanizmusokról. Az információkat az egyes komponensek egyensúlyi izotermáinak meghatározásával és értelmezésével nyerhetjük ki. Az izoterma lineáris része azonban meglehetősen kevés információt szolgáltat, ezért a retenciós mechanizmusok pontos felderítéséhez a mintavegyület koncentrációjának meg kell haladnia a lineáris tartományt, azaz az oszlopot túl kell terhelnünk. A túlterhelés hatására a lineáris tartományban tapasztalható Gauss-görbe alakú csúcsok megváltoznak. A retenció folyamatának és a fellépő csúcstorzulások tanulmányozásának, valamint mindezen tényezők számítógépes modellezésének a preparatív kromatográfiás eljárások költség- és anyagfelhasználásának optimalizálásában rejlik jelentősége.

Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia gyakorlatában jelentős szerepet töltenek be a fordított fázisú oszlopok. A nagy mechanikai stabilitású porózus szilikagél mikroszemcsék előállítására és felületük módosítására különböző apoláris szerves vegyületekkel, leggyakrabban n-alkánokkal nagy változatosságot és széles körű alkalmazhatóságot biztosít a fordított fázisú folyadékkromatográfiás oszlopokon végrehajtott elválasztásokhoz. A mintakomponensek visszatartása a felületre kémiaiilag kötött szerves fázis és az ennél minden esetben polárisabb oldószer közötti megoszláson alapul.

Ezen értekezésben fordított fázisú, oktadecilcsoportokkal módosított porózus szilikagél alapú folyadékkromatográfias oszlopokat vizsgálunk. Tárgyaljuk gyakran használt víz-szerves oldószerek megoszlási viszonyait az egyes tölteteken. Tesztmolekulák nemlineáris viselkedését tanulmányozva bemutatjuk milyen folyamatok játszanak szerepet visszatartásukban. Túlterhelt elúciós csúcsok leírásával szemléltetjük az adszorbens felületi tulajdonságainak hatását nagy koncentrációjú preparatív folyamatokra.

2. Kutatási célkitűzések

Kutatásaink céljával tűztük ki a gyakorlatban leggyakrabban használt C₁₈-as láncokkal módosított szilikagél alapú töltetek felületi borítottságának és a szabad szilanolcsoportok hatásának vizsgálatát oldószeranyagok adszorpciójára és kis molekulatömegű tesztvegyületek retenciós tulajdonságaira.

Kísérleteink során a folyadékkromatográfia gyakorlatában gyakran használt szerves oldószer-víz elegyek megoszlási viszonyait vizsgáltuk a tiszta oldószer és a szilárd-folyadék határretegben. Az oldószer adszorpciójának leírását követően egy gyengén savas (fenol) és egy bázikus karakterű (anilin) tesztvegyület segítségével írtuk le a szilanolcsoportok, illetve a hidrofób láncoknak a retenciós folyamatban betöltött szerepét. Kutatási céljaink áttekintése:

1. A C₁₈-as töltetek folyadékfázisban történő vizsgálata inverz méretkizárásos kromatográfia alkalmazásával. A mozgó-, és állófázis térfogatának, illetve az oszlopban lévő töltet pórustérfogatának meghatározása.
2. A fordított fázisú folyadékkromatográfias oszlopokon lejátszódó oldószeradszorpció felderítése, az egyes szerves oldószer retenciós tulajdonságainak jellemzése többletizotermáik alapján. A pórusok nedvesedésének viszonyainak feltárása különböző polaritású oldószeranyagok vizsgálatával.
3. Szerves oldószer-víz elegyek adszorpció izotermáinak meghatározása, az adszorpció folyamat modellezése. Az egyes szerves oldószer megkötődésében szerepet játszó adszorpció centrumok feltérképezése.
4. Az alkalmazott mozgófázis szerves összetevőjének hatásainak leírása fenol egyensúlyi izotermáira, túlterhelt elúciós csúcsaira. A töltetek telítési kapacitásának, és az adszorpció egyensúlyi állandók változásának meghatározása utószilanizált oszlopokon.
5. A szabad szilanolcsoportok szerepének felderítése fenol és anilin visszatartásának mechanizmusára, egyensúlyi izotermáikra, túlterhelt elúciós csúcsaikra..
6. Túlterhelt elúciós csúcsok alakjának előrejelzése különböző felületi borítottságú oszlopokon egyensúlyi izotermák paraméterek alapján. A túlterhelt elúciós csúcsalak és a felületi borítottság összefüggésének feltérképezése, elválasztások modellezése különböző felületi borítottságú oszlopokon.

3. Anyagok és eszközök

A dolgozatban vizsgált kromatográfiás töltetek ugyanazon Kromasil-100 porózus szilikagél (Akzo Nobel, Bohus, Svédország) kémiai módosításával készültek. A szilikagél fizikai tulajdonságait az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat. A Kromasil-100 szilikagél főbb fizikai-kémiai tulajdonságai

átlagos szemcseátmérő [d_p]	5 μm
fajlagos felület [S_{BET}]	313 m^2/g
átlagos pórusátmérő [D]	101 \AA
fajlagos pórustérfogat [V_p]	0,87 g/cm^3
szilanolcsoportok felületi koncentrációja [α_{OH}]	7,1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$

A szilikagél kémiai módosítása, a szilanizálás légmentesen zárt reaktorban játszódott le. A nyers szilikagélt vákumban szárítottuk (10^{-3} Pa) 190°C -on 12 órán keresztül. A különböző felületi borítottságú töltetek szintéziséhez a nyers szilikagélhez dimetil-oktadecil-klórszilánt (Wacker GmbH, München, Németország) és morfolint (Sigma-Aldrich, Steinheim, Németország) adunk megfelelő mennyiségben. A szilanizálás befejeztével a reaktánsokat szűréssel különítettük el a terméktől, toluollal, metanollal majd hexánnal mosva. A mosási fázist a termék szárítása követi. A fent leírt módszerrel ötféle felületi borítottságú töltetet állítottunk elő $0,33\text{-}3,27 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ tartományban.

Utószilanizálás során a szárított C_{18} -as láncokkal módosított tölteteket morfolin jelenlétében kisebb térigényű klórmetilszilánnal reagáltatjuk. A reakció 12 óráig tartott, majd a fent leírt szűrés, mosás és szárítási fázis következett.

A fenti módon szintetizált 11 féle folyadékkromatográfiás oszloppal végeztük kísérleteinket.

A kromatográfiás kísérleteinket Agilent 1100-as folyadékkromatográfon (Palo Alto, CA) végeztük, mely bináris pumpából, $100 \mu\text{l}$ mintahurokkal felszerelt automata mintaadagoló-ból, oszloptermostátból és diódasoros detektorból épült fel. Méréseinket $1 \text{ cm}^3/\text{perc}$ áramlási sebességgel, és állandó 298 K -es hőmérsékleten végeztük.

4. A tudományos eredmények összefoglalása

1. KÜLÖNBÖZŐ FELÜLETI BORÍTOTTSÁGÚ FORDÍTOTT FÁZISÚ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS OSZLOPOK JELLEMZÉSE INVERZ MÉRETKIZÁRÁSOS KROMATOGRÁFIÁVAL.
 - (a) A termodinamikai számításokhoz nélkülözhetetlen oszloptérfogatokat tetrahidrofuránban oldott monodiszperz polisztirol standardokkal határoztuk meg. Kis molekulatömegű (580-6930 Da) polisztirolokkal az oszlopban lévő teljes folyadékfázis térfogatát (V_{mf}), nagyobb méretű (10100-3250000 Da) – ezáltal a mikro- és makropórusokból egyaránt kizáródó – molekulákkal az oszlopok szemcsék közti térfogatait (V_{ex}) határoztuk meg.
 - (b) A méretkizárásos kromatográfia sztochasztikus modelljének alkalmazásával kimutattuk, hogy a C_{18} -as láncok felületi borítottságának növekedésével a pórus-sugár (r_p) exponenciálisan csökken, míg az oszlop teljes porozitása (ϵ_T) ezzel párhuzamosan lineárisan csökken.
 - (c) Az oszlopok fizikai tulajdonságainak leírásával igazoltuk, hogy az oszlopok szemcsék közötti térfogata alig változik a szilikagél kémiai módosítása során. Ezzel szemben az oszlopok pórustérfogata a töltet széntartalmának növekedésével lineárisan csökken. A poláris szilikagél felszín módosítása a pórusok polaritását és térfogatát erőteljesen befolyásolja.
2. BINER SZERVES OLDÓSZER – VÍZ ELEGYEK MEGOSZLÁSÁNAK LEÍRÁSA FELÜLETI TÖBBLETIZOTERMÁIK ALAPJÁN.
 - (a) Metanol, acetonitril, izopropil-alkohol és tetrahidrofurán-víz elegyek hidrofób felzínnel történő kölcsönhatásait írtuk le. Kimutattuk, hogy víz adszorpciója csak a szerves oldószert nagy koncentrációban tartalmazó elegyek esetében mutatható ki, amely a szerves oldószert víz-oktanol megoszlási hányadosának ($\log P$) növekedésével, azaz hidrofobicitásának növekedésével egyre kifejezettebbé válik. Megállapítottuk, hogy a vízadszorpcióra utaló negatív felületi többlet a felületi borítottság csökkenésével ugyancsak növekszik.
 - (b) Kimutattuk, hogy a szerves oldószert maximális feldúsulása közepes felületi borítottságú ($1,11-1,68 \mu\text{mol}/\text{m}^2$) tölteteken figyelhető meg. Rámutattunk, hogy a nagy felületi borítottság nem feltétlenül jelent nagyobb hatékonyságot.

- (c) Tetrahidrofurán és acetonitril esetében kimutattuk, hogy a hidrofób felszínnel történő kölcsönhatás erősebb több molekularétegnyi távolságra ható, míg alkoholok esetében a vízmolekulákkal kialakuló hidrogénhidak miatt kisebb erősségű, csak 1-2 molekularétegnyi távolságra ható.
- (d) Igazoltuk, hogy utószilanizálás hatására a szerves oldószer negatív többlete jelentősen csökken, azaz az utószilanizálás hatékonyan gátolja víz feldúsulását az állófázis mélyebb rétegeiben.

3. SZERVES OLDÓSZEREK HIDROFÓB FELSZÍNEKEN TÖRTÉNŐ MEGKÖTŐDÉSÉNEK LEÍRÁSA EGYENSÚLYI IZOTERMÁIK ALAPJÁN.

- (a) Acetonitril, etanol, izopropil-alkohol és tetrahidrofurán adszorpciós viselkedését írtuk le egyensúlyi izotermáik alapján vizes elegyeikből. Kimutattuk, hogy nagy felületi borítottságú oszlopokon minden szerves oldószer adszorpciója heterogén folyamat, bi-Langmuir izotermával írható le. Alkoholok esetében már közepes felületi borítottságnál, ezzel szemben tetrahidrofurán esetében csak a leginkább poláris állófázis esetében C_1 alakul át a heterogén adszorpció homogén, Langmuir-egyenlettel leírhatóvá.
- (b) Az egyes szerves oldószermolekulák adszorpciós energiaeloszlásának számításával megerősítettük a heterogén adszorpció homogénné alakulását a felületi borítottság, illetve az oszloptöltet hidrofobicitásának csökkenésével. Az energiaeloszlások elemzésével rámutattunk, hogy az oktadecil láncok felületi borítottságának csökkenésével a nagy-, illetve a kis-energiájú adszorpciós helyek kötési energiái egyre közelebb kerülnek egymáshoz, míg végül az adszorpció egyetlen gócra korlátozódik.
- (c) Etanol adszorpciójának példáján bemutattuk az utószilanizálás hatását az adszorpció energiaeloszlására. Kimutattuk, hogy az utószilanizálás hatására: (i) nagy felületi borítottságú oszlopon a bimodális energiaeloszlás megmarad, az adszorpciós energiák nagyobb energia felé tolódnak, és a nagy energiájú adszorpciós góc telítési kapacitása jelentősen lecsökken. (ii) Az utószilanizálás a kisebb felületi borítottságú tölteteken eliminálja a nagyenergiájú adszorpciós gócot, a megmaradó kisenergiájú adszorpciós helyet nagyobb energiájúvá alakítva.
- (d) Az izoterma adatpontokhoz illesztett izoterma egyenletek paramétereinek elemzésével megerősítettük, hogy a maximális telítési kapacitás a közepes felületi borítottságú töltetknél figyelhető meg.

4. A SZERVES OLDÓSZER HATÁSA A FENOL VISSZATARTÁSÁNAK MECHANIZMUSÁRA UTÓSZILANIZÁLT FORDÍTOTT FÁZISÚ OSZLOPOKON.

- (a) Kimutattuk, hogy a metanol-víz elegyből tapasztalható I-es, Langmuir-típusú adszorpció II-es típusú többrétegű adszorpcióvá alakul át a metanol más szerves oldószerre cserélésekor (acetonitril, izopropil-alkohol vagy tetrahidrofurán). Megállapítottuk, hogy az I-es típustól való eltérés mértéke a szerves molekula polaritásának függvénye.
- (b) Rámutattunk, hogy a referenciaként használt metanol-víz elegyhez képest a töltetek telítési kapacitása lecsökken. A csökkenés acetonitril, illetve izopropil-alkohol alkalmazásakor kisebb mértékű, míg jelentősebb csökkenés figyelhető meg tetrahidrofurán-víz elegy alkalmazásakor.
- (c) A frontális elemzés adatai alapján meghatározott izoterma-paraméterek segítségével modelleztük a fenol túlterhelt elúciós csúcsait. A kromatográfia egyensúlyi-diszperzív modelljének segítségével összehasonlítottuk a kísérletileg nyert és a számított csúcsalakokat, majd a különbséget minimalizálva a két csúcs között numerikusan meghatároztuk a mért elúciós csúcs leírásához legmegfelelőbb izoterma-paramétereket.

5. A SZILANOLAKTIVITÁS HATÁSA ANILIN ÉS FENOL RETENCIÓS TULAJDONSÁGÁIRA. A FENIL-AMIN ÉS A FENIL-HIDROXIL CSOPORTOK KÖLCSÖNHATÁSÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA A FELÜLETEN LÉVŐ SZABAD POLÁRIS CSOPORTOKKAL.

- (a) Kimutattuk, hogy metanol víz elegyet használva a fenil-amin csoportok hatására a már említett I-es típusú adszorpciós izoterma fenol esetében II-es típusú izotermává alakul. Az adszorbeálódott molekulák közti kölcsönhatás erősségét növeli, ha a metanolt acetonitrilre cseréljük.
- (b) Megállapítottuk, hogy acetonitril hatására a szabad szilanolcsoportok jobban hozzáférhetőkké válnak a mintamolekulák számára. Acetonitril-víz elegyben az anilin adszorpciós egyensúlyi állandója közel duplájára emelkedik a metanol-víz elegyben tapasztaltakhoz képest, míg a fenol adszorpciós energiája közel megegyező mindkét oldószerrelegyből.
- (c) Az adszorbeálódott molekulák közti kölcsönhatást elemezve kimutattuk, hogy mind a felületi borítottság csökkenése, mind a metanol acetonitrilre cserélése elősegíti többrétegű adszorpció kialakulását.

6. NEMLINEÁRIS ELVÁLASZTÁSOK ÉS ELÚCIÓS CSÚCSOK MODELLEZÉSE EGYENSÚLYI IZOTERMA PARAMÉTEREK ALAPJÁN.

- (a) Numerikus számítások segítségével modelleztük anilin és fenol túlterhelt elúciós csúcsainak alakváltozását a felületi borítottsággal, illetve a szerves oldószer változásával.
- (b) Meghatároztuk a függvénykapcsolatot az oktadecil láncok felületi borítottsága és az egyes izoterma paraméterek között. A függvény kapcsolat segítségével lehetőség nyílik tetszőleges, akár hipotetikus felületi borítottságú oszlopon egykomponensű, illetve kétkomponensű túlterhelt rendszerek számítógépes modellezésére, az elválasztás tervezésére.

5. Tézispontok

1. Inverz méretkizárásos kromatográfia alkalmazásával feltártuk az egyes folyadékkromatográfiás oszlopok fizikai tulajdonságait, a felületi módosítás ezekre gyakorolt hatásait.
2. Kimutattuk, hogy szerves-oldószer-víz elegyek használatakor az elegyösszetétel, és a szerves molekula polaritásának függvényében az apoláris felületen jelentős szerves oldószer feldúsulás figyelhető meg. Kevésbé poláris szerves oldószerek esetében kis vízkoncentrációjú elegyekből vízadszorpciót figyeltünk meg.
3. Meghatároztuk acetonitril, etanol, izopropil-alkohol és tetrahidrofurán egyensúlyi izotermáit vizes elegyeikből. Számításaink során rámutattunk, hogy az adszorpció heterogenitása egyértelműen a szabad szilanolcsoportok jelenlétéhez köthető.
4. Fenol retenciós viselkedésének összehasonlításával különböző oldószerelegyekből meghatároztuk a szerves módosító hatását az oldott anyag visszatartásának mechanizmusára. Kísérleteink felfedték, hogy az erősebb eluensek az adszorbens nagy energiájú adszorpció helyeit hozzáférhetetlenné teszik a vizsgált tesztvegyület számára. A hozzáférhető adszorpció helyek számának csökkenése a fenol visszatartását jelentősen mérsékli, izotermájának alakját módosítja.
5. Gyengén bázikus (anilin) és gyengén savas (fenol) tesztmolekulák összehasonlításával feltártuk a fenil-amin és a szabad szilanolcsoportok erős kölcsönhatásának természetét, az egyensúlyi izotermákra gyakorolt hatását.
6. Egyensúlyi izoterma paraméterek segítségével modelleztük túlterhelt elúciós csúcsok alakjának és pozíciójának függését az alkalmazott folyadékkromatográfiás oszlop felületi borítottságától.

6. Megjelent közlemények

A PhD értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények

1. P. Vajda, Sz. Bocian, B. Buszewski, A. Felinger:
Influence of the solvation process on solute adsorption in reversed phase liquid chromatography.
Journal of Chromatography A, (2011) 1218 1954–1965.
IF: 4,101 (2010)
2. P. Vajda, Sz. Bocian, B. Buszewski, A. Felinger
Examination of the surface heterogeneity of reversed-phase packing materials with solvent adsorption.
Journal of Separation Science (2010) 33 3644–3654 .
IF: 2,551 (2010)
3. Sz. Bocian, P. Vajda, A. Felinger, B Buszewski
Effect of End-Capping and Surface Coverage on the Mechanism of Solvent Adsorption.
Chromatographia, (2010) 71 S5-S11.
IF: 1,098 (2010)
4. Sz. Bocian, P. Vajda, A. Felinger, B Buszewski
Excess adsorption of commonly used organic solvents from water on nonend-capped c18-bonded phases in reversed-phase liquid chromatography.
Analytical Chemistry, (2009) 81 6334-6346.
IF: 5,214 (2009)

A PhD értekezés témájában készült nem referált konferencia absztraktok

1. A. Felinger, P. Vajda, Sz. Bocian, B. Buszewski
Stationary phase characterization in reversed phased liquid chromatography with studying the adsorption of organic solvents.
ISC 2008 - 27th International Symposium on Chromatography, September 21 -25, 2008
University of Münster, Germany

2. B. Buszewski, Sz. Bocian, A. Nowaczyk, P. Vajda, A. Felinger
A new approach on the solvation processes in reversed-phase liquid chromatography.
34th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, HPLC 2009, June 28 – July 2., Dresden, Germany
3. P. Vajda, Sz. Bocian, B. Buszewski, A. Felinger
Effect of the end-capping on the retention of organic modifiers in RPLC.
8th Balaton Symposium, 15th International Symposium on Separation Sciences, 2-4 September 2009, Siófok, Hungary
4. P. Vajda, Sz. Bocian, B. Buszewski, A. Felinger
The Effect of the Solvation Processes on Solute Adsorption.
35th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, June 19-24 2010, Boston, MA USA

A Phd értekezés témáján kívül készült publikációk

1. P. Vajda, A. Felinger, A. Cavazzini
Adsorption equilibria of proline in hydrophilic interaction chromatography.
Journal of Chromatography A, (2010) 1217 5965–5970.
IF: 4,101 (2010)
2. B. Buszewski, Sz. Bocian, G. Rychlicki, P. Vajda, A. Felinger
Study of solvent adsorption on chemically bonded stationary phases by microcalorimetry and liquid chromatography.
Journal of Colloid and Interface Science, (2010) 349 620-625.
IF: 3,019 (2010)
3. Sz. Bocian, P. Vajda, A. Felinger, B. Buszewski
Solvent excess adsorption on the stationary phases for reversed-phase liquid chromatography with polar functional groups.
Journal of Chromatography A, (2008) 1204 35–41.
IF: 3,756 (2008)
4. Vajda P, Felinger A
Adszorpciós izotermák és adszorpciós energiaeioszlások meghatározása folyadékromatográfiában.
Magyar Kémiai Folyóirat (2007) 113 31-35.

A PhD értekezés témáján kívül készült nem referált konferencia absztraktok

1. P. Vajda, Sz. Bocian, B. Buszewski, A. Felinger
Effect of polar functional groups and mixed ligands on the retention behavior of organic solvents from water in RPLC.
21st International Symposium, Exhibit and Workshops on Preparative / Process Chromatography: Ion Exchange, Adsorption/Desorption Processes and Related Separation Techniques, June 15 - 18, 2008, San Jose, CA, USA
2. P. Vajda, Sz. Bocian, A. Felinger, B. Buszewski
Inverse method for solvent adsorption determination in reversed-phased liquid chromatography.
9th Symposium on Instrumental Analysis, June 29 - July 2, 2008 Pécs, Hungary
3. Sz. Bocian, P. Vajda, A. Felinger, B. Buszewski
Study of Preferential Adsorption of Mobile Phase Components on Chemically Modified Silica.
14th International Symposium on Separation Sciences, 30 September-3 October 2008, Primosten, Croatia
4. P. Vajda, A. Cavazzini, A. Felinger
Adsorption equilibria of proline in hydrophilic interaction chromatography.
16th International Symposium on Separation Sciences, September 6-10 2010, Rome, Italy