

Inverz módszerek kidolgozása a molekuláris kölcsönhatások vizsgálatára folyadékkromatográfiában

az OTKA 48887 számú kutatás szakmai zárójelentése

A kromatográfiás elválasztások során lejátszódó folyamatok megértéséhez alapvető fontosságú a kromatográfiás oszlopban lejátszódó fizikai-kémiai folyamatok feltárása, hiszen azok alapvetően befolyásolják a csúcsok aszimmetriáját és szélesedését, és így az elválasztás hatékonyságát, alkalmazhatóságát. Preparatív kromatográfiában pedig az optimális elválasztási körülmények, az oszlop terhelhetősége alapvetően a kölcsönhatások jellegétől, az adszorpciós (vagy megoszlásos) izoterma alakjától függ.

A kromatográfiás állófázis és az oszlopra juttatott minta molekulái közötti kölcsönhatást, a megkötődési mechanizmust a leggyakrabban az oszlop túlterhelésével, a nemlineáris izotermák meghatározásával jellemzik. A legpontosabb és legnépszerűbb kromatográfiás izoterma-meghatározási eljárás a *frontális elemzés*, amely során az oszlopra folyamatosan, egyre növekvő koncentrációban, a koncentrációt lépcsőszerű ugrásokkal növelve pumpáljuk a mintát. Az így nyert áttörési görbékhez rendelhető idők alapján határozhatjuk az állófázisban megkötött minta mennyiségét, és abból a nemlineáris izotermát. A frontális elemzés hátránya, hogy vegyszer- és időigényes művelet.

Az elmúlt években sikeresen alkalmaztunk egy új izoterma meghatározási módszert, amely *inverz módszer* néven ismert. Ez az eljárás tiszta anyagok izotermájának meghatározására már másfél évtizede ismert, elegyadszorpció során a versengő izotermák meghatározására azonban nem sikerült alkalmazni. Az inverz módszer alkalmazásával a frontális elemzéshez viszonyítva jelentős a vegyszer- (minta és eluens), a költség- és az időmegtakarítás.

A kromatográfiás állófázisok sok esetben nagyon kis mennyiségben tartalmaznak erős kötőhelyeket. Ezek jellemzése az oszlop túlterhelésével bonyolult (sok esetben lehetetlen) feladat, mivel a kismennyiségű adszorpciós gócot a terheléssel nagyon hamar telítjük, és azok hatása csak nagyon kis koncentrációk mellett válik nyilvánvalóvá. Így, ezekben az esetekben célszerűbb lineáris (analitikai) kromatográfiával, megfelelő retenciós modellt felhasználva jellemezni a retenciós mechanizmust, illetve az állófázison jelenlévő kötőhelyek típusát, mennyiségét.

A kromatográfia sztochasztikus modellje, amely molekuláris szinten modellezi a kromatográfiás folyamatot, jól alkalmazható az elválasztási folyamat jellemzésére homogén és heterogén felületeken egyaránt.

A kromatográfia sztochasztikus modelljét Giddings és Eyring dolgozta ki 1954-ben, és azt évtizedek óta alkalmazzák a kromatográfiás csúcsok leírására, modellezésére. A heterogén

megkötődési folyamatok miatt a korábban kidolgozott modellek rendkívül bonyolultak, kezelhetetlenek voltak.

A jelen pályázat támogatásának segítségével a sztochasztikus modellt olyan elválasztások modellezésére is felhasználtuk, amelyeknél az állófázis heterogenitása miatt torzult csúcsalakok figyelhetők meg. Fordítottfázisú folyadékkromatográfiában az ionos vegyületek nem csak az apoláris, kémiaiilag kötött funkciós csoportokkal, hanem a kis mennyiségben jelen lévő szilanol csoportokkal is kölcsönhatásba lépnek, mégpedig az utóbbi kölcsönhatás energiája nagyobb, kinetikai állandója kisebb. Az állófázis ilyen jellegű heterogenitása miatt a bázikus vegyületek csúcsai szélesek, elhúzódnak. Célunk az volt, hogy különböző C₁₈-as állófázisokra meghatározzuk a bázikus anyagokkal kölcsönhatásba lépő szilanolcsoportok relatív mennyiségét, a megkötődési energiákat, kinetikai állandókat. A szilanolaktivitás pH- és hőmérsékletfüggése az elválasztások optimalizálása, a retenciós folyamat megértése szempontjából fontos információ, amelyhez csúcsalak-elemzés fontos adalékot nyújt.

Giddings és Eyring az 1950-es évek közepén megalkotta a kromatográfia ún. *molekuláris dinamikus* modelljét. Elméletükben korszakalkotó újdonságnak tekinthető az a felfogás, hogy a valószínűségszámítás eszközeivel, differenciálegyenletek alkalmazása nélkül alkották meg a kromatográfia folyamatának – a kromatogramok kialakulásának – modelljét. A modell alkalmazásával az elválasztás, a molekulák vándorlásának folyamata, a sávok szélesedése, a csúcsfelbontás kialakulása rendkívül egyszerűen magyarázható és érzékeltethető. Abban az időben a kromatográfia tényérelmélete, a differenciális tömegmérleg-egyenleteken alapuló kinetikai és egyensúlyi modellek már jól ismertek és elterjedtek voltak.

Folyadékkromatográfiában, különösképpen azokban az esetekben, amikor porózus tölteteket használunk, a molekuláris folyamat sokkal bonyolultabb, mint az eredeti modellben szereplő adszorpció–deszorpció lépések véletlen sorozata. Ennélfogva az így kapott átlagos tartózkodási idők az állófázisban és a mozgófázisban nem adszorpciós és deszorpciós időállandók, hanem anyagátadási időállandók. Jól ismert, hogy porózus állófázisokban a pórusokat nem áramló, hanem stagnáló folyadékfázis tölti ki. A pórusokban a stagnáló folyadékfázisban és az állófázis felületén egyidejű diffúzió játszódik le. A molekuláknak az áramló és a stagnáló folyadékfázis között is át kell lépniük, amikor belépnek a pórusokba. Így a molekuláris dinamikus modell paraméterei olyan összevont anyagátadási állandók, amelyek mindezen részfolyamatok hatását tartalmazzák.

Alkil-benzolok retencióját fordított fázisú folyadékkromatográfiában tanulmányozva megállapítottuk, hogy egy 15 cm hosszú oszlopon a megkötődések átlagos száma 13 ezer és 20 ezer között változott a vizsgált molekulák retenciójától függetlenül. Ez azt jelenti, hogy a molekulák átlagos tartózkodási ideje a mozgófázisban 3 és 5 ms között van. Az állófázison töltött tartózkodási idő (egyetlen lépésre vonatkoztatva) viszont egyértelműen függ a retenció erősségétől, és a várakozásoknak megfelelően bizonyítja, hogy a retenció és a szelektivitás az állófázison lejátszódó folyamatok következménye. Míg toluolra $\tau_s = 8$ ms a tipikus

tartózkodási idő, pentil-benzolra már $\tau_s = 47$ ms értéket kapunk. Könnyen kiszámolhatjuk, hogy egy $3,9 \times 150$ mm méretű oszlopban kb. 18 milliárd $5 \mu\text{m}$ átmérőjű töltet részecske van. Ha ezt összevetjük a megkötődések számával, azt látjuk, hogy egy molekula az állófázisnak csak kis töredékét látja a vándorlása során: nagyjából minden egymilliomodik részecskén kötődik meg. Ugyanakkor, ha a hagyományos $1 \text{ cm}^3/\text{perc}$ áramlási sebességet tekintjük, azt kapjuk, hogy a $\tau_m = 3\text{--}5$ ms idő alatt – amit a molekulák átlagosan a mozgófázisban töltenek – a mozgófázis $7\text{--}12 \mu\text{m}$ távolságot tesz meg. Ez a távolság a részecskék átmérőjének másfél–kétszerese. Ha figyelembe vesszük azt, hogy a tartózkodási idők eloszlása exponenciális, arra a következtetésre jutunk, hogy a megkötődési lépések mintegy felében a molekula visszatér ahhoz az állófázis részecskéhez, amelyet éppen elhagyott, a lépések másik felében pedig újabb részecskéken kötődik meg.

Fenol retencióját tanulmányozva arra a megállapításra jutottunk, hogy a vízben gazdag mozgófázis esetén megfigyelhető aszimmetrikus csúcsalak jól leírható két rendkívül különböző erősségű megkötődés eredőjeként. Azt tapasztaltuk, hogy a két kötőhely közötti energiakülönbség mintegy 11 kJ/mol . A két kötőhely jellege, relatív szerepük a teljes retencióban jó egyezést mutat az oszlop túlterhelése mellett – egyensúlyi izotermák meghatározásával – kapott információval [A. Felinger: *Determination of rate constants for heterogeneous mass transfer kinetics in liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1126 (2006) 120–128, 2006]

Az állófázis heterogenitására általában a felületi szilanolcsoportok hatása a kézenfekvő magyarázat. Nem bázikus molekulák (mint pl. a fenol) esetében a heterogenitás magyarázható azzal, hogy a felület bizonyos részein a hidrofób ligandumok szabályosan helyezkednek el, a felület más helyein pedig rendezetlen szerkezetet vesznek fel. Más feltételezések szerint a nagyszámú alacsony energiájú kötőhely a hidrofób állófázis és a mozgófázis közötti megoszlási egyensúlynak felel meg. Az ilyen jellegű megkötődéseknél a fenol molekulák behatolnak az apoláris hidrofób ligandumok közé és a megkötődés mechanizmusa a két fázis közötti megoszlási jelenségen alapul. A kisebb számú erős megkötődés viszont azzal magyarázható, hogy a molekulák bizonyos esetekben nem hatolnak be az apoláris ligandumok közé, hanem azok csúcsán, a fázisok határfelületén adszorbeálódnak. [I. BacsKay, A. Felinger: *Macroscopic and microscopic analysis of mass transfer in reversed phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 1216, 1253–1262, 2009]

Ionkromatográfiában a fentiekhez hasonló vizsgálatok alapján megállapítható, hogy anionok $9 \mu\text{m}$ szemcseátmérőjű divinil-benzol alapú ioncsereelő gyantán történő elválasztása során a megkötődések száma 10 ezer és 25 ezer között változik 4×250 mm oszlopban. A megkötődések száma csökken a pH növelésével. Az átlagos megkötődési idő valamivel nagyobb, mint fordított fázisú folyadékkromatográfiában: 10 és 100 ms között van egyértékű anionokra, illetve 55 és 400 ms között van többértékű anionokra. Ez a különbség annak tulajdonítható, hogy az ioncsere folyamatra nagyobb a megkötődés energiája, mint fordított

fázisú kromatográfiában. [K. Horváth, M. Olajos, A. Felinger, P. Hajós: *Retention Controlling and Peak Shape Simulation in Anion Chromatography Using Multiple Equilibrium Model and Stochastic Theory*, J. Chromatogr. A, 1189, 42–51, 2008]

A macrociklusos antibiotikum-alapú királis állófázisok egyre népszerűbbek aminosavak és aminosav-származékok királis elválasztására. D- és L-triptofán, illetve metionin megkötődését tanulmányoztuk az adszorpciós izotermák kimérése, illetve a sztochasztikus modellezés alapján. Azt tapasztaltuk, hogy az oszlop túlterhelése után jelentős ideig érvényesül egy „memória-hatás”, amely mindkét enantiomer retencióját megnöveli. A csúcsalakok vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a D- és az L-enantiomer is legalább két különböző enantioszelektív gócon kötődik meg. [M. Bechtold, A. Felinger, M. Held, S. Panke: *Adsorption behavior of a teicoplanin-aglycone bonded stationary phase under harsh overload conditions*, J. Chromatogr. A, 1154, 277-286, 2007]

Méretszerinti kizárásos kromatográfiában alkalmazva a molekuláris dinamikus modellt, figyelembe tudjuk venni azt, hogy milyen valószínűséggel tud egy nagyméretű polimer molekula belépni az állófázis pórusaiba, illetve a molekula és a pórus méretétől hogyan függ a molekula tartózkodási ideje a pórusban [6]. Ennek a jelenségnek a vizsgálata azért is fontos, mivel kevés adat áll rendelkezésre arról, hogy pórusokban a sztérikusan gátolt diffúzió idejét hogyan befolyásolja a molekulák és a pórusok relatív mérete. A molekuláris dinamikus modell alkalmazásával – polimer standardok sorozatának kromatogramjait vizsgálva – megállapítottuk, hogy a géلكromatográfia szelektivitása általában a pórusokba történő belépéseknek a molekulaméret-függőségéből származik. Csak a pórusok átmérőjéhez hasonló méretű polimer molekulák esetében van szerepe a pórusokban lejátszódó folyamatnak az elválasztás szelektivitásának létrejöttében. [A. Felinger: *Molecular dynamic theories in chromatography*, J. Chromatogr. A, 1184, 20–41, 2008]

A folyadékkromatográfiában megfigyelt retenció mértékét nagymértékben befolyásolja a szerves oldószerek adszorpciója. Különböző, a kereskedelmi forgalomban kapható fordított fázisú töltetek adszorpciós tulajdonságait jellemeztük a szerves oldószerek (metanol, acetonitril) többletizotermái alapján. Megállapítottuk, hogy az acetonitril adszorpciója többrétegű. [B. Buszewski, S. Bocian, A. Felinger: *Excess isotherms as a new way for characterization of the columns for reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 1191, 72–77, 2008]

A többletizotermák az állófázisok megkülönböztetésére és osztályozására is alkalmasak. A felületi szilanol-csoportok jelenléte és hozzáférhetősége a víz adszorpció következtében megjelenő „negatív többlettel” bizonyítható. [Sz. Bocian, A. Felinger, B. Buszewski: *Comparison of Solvent Adsorption on Chemically Bonded Stationary Phases in Reversed Phase Liquid Chromatography*, Chromatographia, 68, S19-S26, 2008]

Poláris funkciós csoportokat is tartalmazó fordított fázisú töltetek esetén a poláris ligandum nagymértékben meghatározza a szerves oldószerek adszorpcióját. Az oldószer adszorpciója függ a

ligandum méretétől és polaritásától. A poláris csoportok az állófázist heterogénné teszik, és ez komoly hatással van a kromatogramokban megfigyelt csúcsok alakjára és szélességére. [Sz. Bocian, P. Vajda, A. Felinger, B. Buszewski: *Solvent excess adsorption on the stationary phases for reversed-phase liquid chromatography with polar functional groups*, J. Chromatogr. A, 1204 35–41, 2008]

Frontális elemzéssel meghatároztuk a fenol adszorpciós izotermáját egy új típusú C30-as fordított fázisú folyadékkromatográfiás állófázison, illetve megkerestük a legjobban illeszkedő izoterma modellt. Annak eldöntésére, hogy milyen jellegű a megkötődés heterogenitása, kiszámítottuk az adott kísérleti rendszerre jellemző affinitási energia-eloszlását. Ezt egy numerikus módszerrel, a várhatóérték-maximalizálással határoztuk meg, amelyet egyre kiterjedtebben alkalmaznak heterogén adszorpciós felületek jellemzésére. A vizsgált izoterma modellek közül a bi-Langmuir-modell a legmegfelelőbb arra, hogy leírjuk a fenol adszorpcióját C₃₀-as állófázison, metanol–víz rendszerben. A Fisher-teszt segítségével kizárhattuk a Langmuir-modellt, de a három heterogén adszorpciós felszint leíró modell között nem tudtunk szignifikáns különbséget tenni. Az affinitási energia-eloszlás meghatározása után vált egyértelművé, hogy az adott kísérleti rendszerben a fenol adszorpcióját a legjobban a bi-Langmuir-modell írja le. [Vajda P., Felinger A.: *Adszorpciós izotermák és adszorpciós energiaeloszlások meghatározása folyadékkromatográfiában*, Magyar Kémiai Folyóirat, 113(1), 31-35, 2007]

Összefoglalás

Elsősorban a fordított fázisú folyadékkromatográfia területén tanulmányoztuk különböző vegyületek megkötődésének retenciós mechanizmusát, illetve kinetikáját, de vizsgálatainkat kiterjesztettük az ioncsere-kromatográfia, a királis elválasztások és a méreetszerinti kromatográfia területére is. Numerikus eljárást dolgoztunk ki, amellyel a csúcsok alakjából a retenciós tulajdonságok meghatározhatók. A kromatográfia sztochasztikus modelljének alkalmazhatóságát bizonyítottuk ezeken a területeken. Összehasonlítottuk a mikroszkopikus és makroszkopikus modellek alkalmazhatóságát. Egyensúlyi izotermák, illetve oldószerelegyek többletizotermáinak mérésével jellemeztük a metanol és acetonitril adszorpcióját nagyszámú állófázison, és így a molekuláris kölcsönhatásokat fordított fázisú folyadékkromatográfiában.

Pécs, 2009. február 28.

Dr. Felinger Attila
egyetemi tanár
témavezető