

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

Adszorpció és megoszlás leírása fordított fázisú folyadékromatográfiában

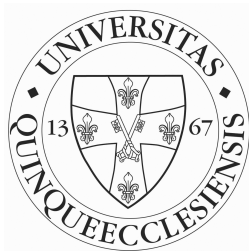
PhD értekezés

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 folyadékkromatográfiás 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 pórusugár (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) Tetrahydrofuran 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 tetrahydrofuran 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 tetrahydrofuran 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 töltetekenél 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
Adsorpció izotermák és adsorpció energieloszlások 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

Other posters

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 RP-LC.
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-phase 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

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
- Other publications**
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 micellar chromatometry 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
Adszorpcióis izotermák és adszorpcióis energiáeloszlások meghatározása folyadékro-matográfiában.
Magyar Kémiai Folyóirat (2007) 113 31-35.

6 Publications, Posters

Publications related to this thesis

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)

Posters related to this thesis

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

5 Thesis Points

1. Using inverse size exclusion chromatography, we characterized the columns and determined the effect of the chemical modifications on the column geometry.
2. We showed that in the case of hydro-organic mixtures depending on the eluent composition and the polarity of the organic molecule, a large excess of the organic modifier can be observed at the liquid-solid interface. From mixtures containing more apolar organic modifier at high organic concentration, the preferential adsorption of water can be observed.
3. We determined the adsorption isotherm of acetonitrile, ethanol, isopropyl-alcohol and tetrahydrofuran from water. We showed, that the heterogeneity of the adsorption is connected with the unreacted free silanol groups.
4. With the comparison of the adsorption behaviour of phenol from different eluents, we described the effect of the organic modifier on the retention mechanism of the test molecule. We showed that the stronger eluent hampers the access of the test molecule to the high-energy adsorption sites of the adsorbent. The decrease of the accessible adsorption sites decreases the retention factor of phenol, and changes the type of the adsorption as well.
5. Using weakly basic (aniline) and weakly acidic (phenol) test molecules we described the effect of the residual silanol groups on the retention process and on the shape of the isotherm.
6. Using equilibrium isotherm parameters we modelled and predicted the position and shape of overloaded elution bands consider the mobile phase composition and surface coverage.

6. MODELLING OF NONLINEAR SEPARATIONS AND ELUTION BANDS ON THE BASIS OF ISOTHERM PARAMETERS.
- (a) Using numerical algorithms we modelled the shape and position change of the overloaded elution bands of phenol and aniline with the change of the surface coverage and mobile phase composition.
- (b) We determined the connection between the surface coverage of the octadecyl-chains and the isotherm parameters. In the knowledge of the function describes this connection it is possible to model elution bands or nonlinear separations on any desired surface coverage.

(c) Comparing the interaction between the adsorbed molecules, we showed that the decrease of the surface coverage, and the change of the organic modifier from methanol to acetonitrile support the formation of adsorbed multilayer above the adsorbent surface.

(a) We showed that the type I adsorption isotherm of phenol from methanol-water mixture converts into type II because of the amine group of aniline. The interaction between adsorbed molecules increases if we replace methanol by acetonitrile. We determined that in the case of acetonitrile-water mixture, the silanol-groups are more accessible for the sample molecules comparison with methanol-water mixture. The equilibrium constant of the adsorption is almost double in the case of aniline from acetonitrile as organic modifier, but in the case of phenol, it remains nearly constant in both mobile phases.

5. THE EFFECT OF SILANOL ACTIVITY ON THE RETENTION OF PHENOL AND ANILINE. COMPARISON OF THE PHENYL-AMINE AND PHENYL-HYDROXYL GROUPS INTERACTION WITH RESIDUAL SILANOL GROUPS.

(c) With the parameters determined by modelling the isotherm data we simulated the overloaded elution bands of phenol from different mobile phases. Using the equilibrium-dispersive model of chromatography, we compared the calculated and measured elution bands, and by minimizing the difference between the two peaks we determined the best fitting isotherm parameters.

(b) We determined that the adsorbent's saturation capacity decreases if we switch the mobile phase from methanol-water mixture to a hydro-organic mixture containing a stronger eluent. The decrease is more significant in the case of tetrahydrofuran, and moderate in the case of acetonitrile or isopropyl-alcohol.

(a) We showed that the observed type I adsorption isotherm transforms to type II if the organic modifier is changed from methanol to acetonitrile, isopropyl alcohol or tetrahydrofuran. The extent of the deviation from type I isotherm is the function of the apolarity of the organic modifier.

4. THE EFFECT OF THE ORGANIC MODIFIER ON THE RETENTION MECHANISM OF PHENOL ON END-CAPPED REVERSED PHASE COLUMNS.

- coverage.
- (d) With the modelling of the adsorption isotherm data points, we confirmed that the maximum saturation capacity is formed on the column with medium surface coverage.
- (c) We demonstrated the effect of the end-capping on the adsorption energy distribution using ethanol as test molecule. We showed that the effects of the end-capping are: (i) on columns with high surface coverage the bimodal distribution remains, the adsorption energies shift toward higher energies, and the saturation capacity of the high energy center decrease. (ii) the end-capping eliminates the high energy sites on lower surface coverages, and the lower energy site shifts toward higher energies.
- (b) By calculating the affinity-energy distribution of the organic solvent molecules we confirmed the heterogeneous adsorption behaviour, and the transition into homogeneous one with the decrease of the column's hydrophobicity, and surface coverage. With the analysis of the adsorption energy distributions, we showed that the energy difference between the high and low-energy adsorption sites is decreasing with the decrease of the surface coverage, and collapses to only one adsorption center at low surface coverages.
- (a) We described the adsorption behaviour of acetonitrile, ethanol, isopropyl alcohol and tetrahydrofuran based on their adsorption isotherms determined from water. We showed, that all the molecules on high surface coverages show heterogeneous adsorption and described using the bi-Langmuir isotherm. The homogeneous adsorption appears on columns with medium coverage density in the case of alcohol, but in the case of tetrahydrofuran the homogeneous adsorption described by the simple Langmuir-equation appears only on the column with the lower hydrophobicity.
3. DESCRIBING OF THE ADSORPTION PROCESS OF ORGANIC SOLVENT MOLECULES ON APOLAR SURFACES USING ADSORPTION ISOTHERMS.
- (d) We confirmed that the negative excess of the organic modifier decreases significantly because of the end-capping. The end-capping hampers effectively the enrichment of water molecules in the deeper segments of the stationary phase.
- molecules, the interaction is weaker and affects only 1 or 2 molecule layers dis-
- tance.

4 Results

1. THE CHARACTERIZATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHIC COLUMNS WITH DIFFERENT SURFACE COVERAGES USING INVERSE SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY.

(a) The column volumes necessary for thermodynamic calculations were determined using mono-disperse polystyrene standards dissolved in tetrahydrofuran. The standards with low molecular weight (580-6930 Da) the total liquid phase (V_{mf}) was determined in the column, the standards with bigger molecular weight (10100-325000 Da), because of the exclusion from micro- and macro-pores the interstitial volume (V_{ex}) was determined.

(b) Using the stochastic theory of size exclusion chromatography, we showed that with the increase of the surface coverage of the C_{18} chains, the pore radius (r^p) exponentially decreases, the total porosity of the column (ϵ_T) decreases linearly.

(c) With the determination of the physical properties of the columns, we confirmed that the interstitial volume of the columns is not affected significantly by the chemical modification, in contradiction, the pore volumes are decrease significantly with the carbon load of the columns during the modification. The chemical modification of the naked silica gel with octadecyl-ligands affects the polarity and the volume of the pores as well.

2. THE DESCRIPTION OF THE PARTITION OF HYDRO-ORGANIC MIXTURES BY USING SURFACE EXCESS ISOTHERMS.

(a) We described the interaction with apolar surface of hydro-organic mixtures with methanol, acetone, isopropyl alcohol and tetrahydrofuran as organic modifier. We showed that the preferential adsorption of water only present at high organic contents, what become more affected when the organic modifiers hydrophobicity ($\log P$) increases. We determined that the negative excess of the organic solvent is increase with the decrease of the surface coverage.

(b) We determined that the maximal excess of the organic modifier is present on columns with medium surface coverage ($1,11-1,68 \mu\text{mol/m}^2$). We showed that the high surface coverage does not mean higher efficiency in every case.

(c) In the case of acetone, tetrahydrofuran, we showed that the interaction with apolar surfaces is strong and affects through a number of molecular layers distance. In the case of alcohols, because of the hydrogen bonds with water

3 Materials and Methods

The columns used in this study were synthesized with the chemically modification of the same porous Kromasil-100 silica gel (Akzo Nobel, Bohus, Sweden). The physico-chemical properties of the silica gel is listed in table 1.

Table 1: The main properties of the Kromasil-100 silica-gel.

average particle size [d_p]	5 μm
specific surface area [S_{BET}]	313 m^2/g
average pore diameter [D]	101 \AA
specific pore volume [V_p^d]	0,87 g/cm^3
surface concentration of silanol groups [α_{OH}]	7,1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$

The silylation was done in vacuum in special reactor. The neat silica gel was dried in vacuum (10^{-3} Pa) on 190°C during 12 hours. To synthesize adsorbents with different surface coverage we added dimethyl-octadecyl-chlorosilane (Wacker GmbH, Munich, Germany) and morpholine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) to the neat silicagel in the appropriate concentration. After the silylation the reactants were separated from the products with filtration using toluene, methanol and hexane for washing, and than we dried the product. Using the above method we synthesized adsorbents with five different surface coverage in the range of $0.33\text{-}3.27 \mu\text{mol}/\text{m}^2$.

The end capping was done using the above mentioned adsorbents, using morpholine and trimethyl-chlorosilane. The reaction time was 12 hours and was followed by a washing and drying step.

Using this methodology, we synthesized 11 liquid chromatographic columns with different surface coverages.

The chromatographic experiments were carried out using an Agilent 1100 liquid chromatograph (Palo Alto, CA), which contained a binary gradient pump, an autosampler with 100 μl sample loop, column thermostat and diode array detector. The experiments were carried out using $1 \text{ cm}^3/\text{min}$ flow rate at 298 K temperature.

2 Research Aims

In our work we aim to investigate the effect of the surface coverage and the effect of the residual silanol groups on the adsorption of hydro-organic mixtures and test molecule with low molecular weight on commonly used C_{18} chromatographic columns. We investigated the partition in the liquid-solid interface of liquid mixtures often use in the everyday practice of liquid chromatography. After the investigation of the solvent adsorption, with the aid of weakly acidic (phenol) and weakly basic (aniline) test molecules we investigated the effect of the hydrophobic ligands and the residual silanol groups on the retention processes. Our research goals were:

1. The characterization of the C_{18} columns in liquid phase using inverse size exclusion chromatography. The determination of the volume of the mobile phase, the pore volume and the stationary phase.
2. The investigation of the solvent adsorption on reversed phase columns, the determination of the excess adsorption of commonly used organic solvents on the basis of excess isotherms. The examination of the pore re-wetting process from mobile phases with different polarity.
3. The determination of the adsorption isotherms of organic solvent molecules. The modelling of the adsorption processes, and the description of the adsorption centers affect the adsorption of solvent molecules.
4. The effect of the organic component of the mobile phase on the adsorption isotherms and overloaded elution bands of phenol. The determination of the change of the saturation capacities and the equilibrium constants of adsorption on end-capped columns.
5. The role of the residual free silanol groups on the retention of aniline and phenol, the effect on their adsorption isotherms and overloaded elution bands.
6. The prediction of the shape and position of overloaded elution bands on columns with different surface coverages based on the adsorption isotherm data. The determination of the correlation between peak shape and the surface coverage, and modelling of preparative scale separations.

1 Introduction

Based on the applied sample sizes during the separation process, linear and nonlinear chromatography can be discriminated. Linear or analytical chromatography is the generally, everyday used routine to separate and analyse complex samples or detect impurities with low concentration. Nonlinear chromatography deals with the purification or separation of samples with high concentration.

In fact linearity or nonlinearity denote the shape of the sample components adsorption isotherm. All the isotherms begin with a linear part at small concentrations which follow by a curved part at higher concentrations. The adsorption isotherms basically determine the corresponding analyte's behaviour under the corresponding experimental conditions in the chromatographic system. They predict the concentration range in which the components behave in a linear manner, and from which concentration threshold the effect of the isotherm curvature has to be taken into account.

The adsorption isotherms in column chromatography can give a detailed view on the retention processes on the adsorbent. The information can be gathered by modelling and interpreting the adsorption isotherm data of the compound of interest. The linear part of the isotherm gives only limited amount of information, the detailed description of the retention processes can be done by the description of the adsorption isotherm in a wide concentration range include the curvature part as well. In other words, we have to overload the column. Under the overloaded conditions the Gaussian chromatographic peaks observed under linear conditions will be changed. The study of the deformation of the chromatographic peaks resulted by the overloading effect is the key to optimize and make more efficient preparative chromatographic processes.

In the practice of high performance liquid chromatography, the reversed phase adsorbents play an important role. The production and the surface modification with apolar or organic chains – usually n-alkanes – of porous silica micro particles with high mechanically stability, gives huge versatility and wide application range of the separation processes using reversed phase columns. The retention is based on the partition process between the bonded apolar, and the polar mobile phase.

In this thesis we investigated octadecyl-bonded porous, silica-based reversed phase liquid chromatographic columns. We discuss the partition of commonly used hydro-organic mobile phases, we describe the retention processes of selected test molecules, and by modelling the high concentration overloaded elution bands, we simulate the effect of the overloading on preparative processes.

UNIVERSITY OF PÉCS

Doctoral School for Chemistry

**Description of the adsorption and Partition Processes in
Reversed Phase Liquid Chromatography**

PhD Thesis

Péter Vajda

Supervisor:

Dr. Attila Felinger

professor



PÉCS, 2011