

Kavitandok retenció tényezőjének hőmérsékletfüggése C_{18} és C_8 fordított fázisú állófázisokon

The Temperature Dependence of the Retention Factor of Cavitands on C_{18} and C_8 Reversed Stationary Phases in HPLC

Dependența termică a factorului de retenție a cavitandelor pe C_{18} și C_8 în faza staționară inversă pe HPLC

BARTÓ Endre¹, Prof. FELINGER Attila^{1,2,3}, Prof. KILÁR Ferenc^{1,3,4},
Dr. PRAUDA Ibolya^{1,3}, Dr. KISS Ibolya^{1,3}

¹Pécsi Tudományegyetem TTK Kémia Intézet Analitikai és Környezeti Kémia Tanszék,
H-7624 Pécs, Ifjúság útja 6., Tel.: +36 72 503 600, Fax: +36 72 501 518,
kemiaint@gamma.ttk.pte.hu <http://www.kemia.ttk.pte.hu/analitika>

²MTA-PTE Molekuláris kölcsönhatások az elválasztástudományban Kutatócsoport
H-7624 Pécs, Ifjúság útja 6. Tel.: +36 72 503 600, Fax: +36 72 501 518

³Pécsi Tudományegyetem Szentágothai Kutatóközpont
Analitikai Kémiai és Geoanalitikai kutatócsoport,
H-7624 Pécs, Ifjúság útja 20., Tel.: +36 72 501 500, Fax: +36 72 501654,
info@szkk.pte.hu, <http://www.szkk.pte.hu>

⁴Pécsi Tudományegyetem Bioanalitikai Intézet, H-7624 Pécs, Honvéd utca 1.,
H- 7624 Pécs, Szigeti út 12., Tel.: +36 72 536 255, Fax: +36 72 536 254, bioanalitika@aok.pte.hu,
<http://www.aok.pte.hu/bioanalitika>

ABSTRACT

Cavitands are cavity-shaped cyclic oligomers and they can create host-guest interactions. We have investigated the retention of two types of cavitands on different stationary phases (C_8 , C_{18}) with High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Our purpose was to ascertain the retention mechanism from van't Hoff equation. The slopes and the intercepts of the van't Hoff equation were used for calculations of thermodynamic constants for transfer of solute from the mobile phase to the stationary phase.

ÖSSZEFOGLALÓ

A kavitandok olyan, üreggel rendelkező makrociklusos vegyületek, amelyek alkalmasak úgynevezett gazda-vendég (host-guest) kölcsönhatásokra. Két, különböző típusú kavitand kromatográfiás viselkedését hasonlítottuk össze fordítottfázisú nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfiával (RP-HPLC) különböző állófázisokon (C_8 , C_{18}). A termodinamikai paramétereket a retenció tényező hőmérsékletfüggéséből a van't Hoff egyenlet alapján számoltuk.

Kulcsszavak: Kavitand, retenció tényező, retenció mechanizmus, van't Hoff egyenlet, fordított fázis.

1. BEVEZETŐ

A kavitandok olyan, üreggel rendelkező makrociklusos molekulák, amelyek szerves és szervetlen vegyületekkel egyaránt alkalmasak úgynevezett gazda-vendég (host-guest) kölcsönhatások kialakítására.

A makrociklusos ciklodextrineket, kalixaréneket, rezorcinaréneket reverzibilis komplexképző sajátosságuk miatt elterjedten alkalmazzák nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) állófázisok ligandumaként.

A szakirodalomban olvasottak szerint a rezorcinarén alapú kavitandokat három féle módon is alkalmazzák kromatográfiás állófázisként. Aromás helyzeti izomerek [7], [1], geometriai izomerek [6] és királis molekulák enantiomerjeinek [7] elválasztására a legtöbb esetben a szilikagélhez kémiaiilag kötött kavitandokat tartalmazó állófázisokat használnak. Egy másik alkalmazási lehetőség mozgófázis adalékként történő felhasználásuk [5], [9]. Pietraszkiewicz és munkatársai pirimidin bázisok elválasztását valósították meg C_{18} -as állófázisokhoz másodlagos kötőerőkkel kötött rezorcinarén származékokkal [4].

A rezorcinarén alapú kavítandók széleskörű kromatográfiai alkalmazásával ellentétben a kromatográfiai tulajdonságaik, viselkedésük vizsgálata nem elterjedt. Az irodalomban csupán egyetlen hivatkozást találunk, ahol kavítand származékot mintaként kromatográfiasan is vizsgáltak [8].

Munkánkban célunk az eltérő szerkezeti sajátságú kavítandók kromatográfiai viselkedésének tanulmányozása C_8 és C_{18} állófázison.

Valamely vegyület folyadékkromatográfiai viselkedéséért azok a kölcsönhatások felelősek, amelyek a vegyület és a kromatográfiai fázisok között alakulnak ki. Ezekért pedig az adott vegyület szerkezete, mindenekezlött funkciós csoportjai, valamint az álló és mozgó fázis minősége, elsősorban – de nem kizárólag – funkciós csoportjai tehetők felelőssé. A retenció mechanizmust a retenció tényező és a termodinamikai paraméterek közötti összefüggés segítségével vizsgálhatjuk. Japán kutatók a retenció tényező hőmérsékletfüggéséből számították a minták állófázishoz történő kötődésének entalpia-, entrópiaváltozását, valamint a folyamat hajtóerejét meghatározó szabadentalpia-változását, és ebből következtettek a retenció mechanizmusra [3].

2. KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

2.1. Kromatográfiai körülmények

A kísérleteinket, méréseinket Agilent 1290 Infinity típusú HPLC készüléken végeztük, amely kétcsatornás pumpával, légmentesítő egységgel, automata mintaadagolóval, kolonna termosztáttal és diódasoros detektorral volt felszerelve.

A méréseket izokratikus körülmények között végeztük, acetonitril és víz (55:45 v/v%) elegyét használva mozgófázisként.

Állófázisként teljesen porózus fordított fázisú oszlopokat használtuk:

1. Thermo Scientific BDS HYPERSIL C_{18} (100 mm × 4,6 mm, szemcseméret 3 μm , pórusátmérő 120 \AA)
2. Waters Xterra RP8 C_8 , (100 mm × 4,6 mm, szemcseméret 3 μm , pórusátmérő 131 \AA)

A hőmérsékletet 15–45°C között változtattuk. A detektálás hullámhossza minden esetben 230 nm volt. A minta koncentrációja 0,5 mg/ml, oldószere acetonitril volt. A méréseket 1 ml/perc áramlási sebesség mellett végeztük.

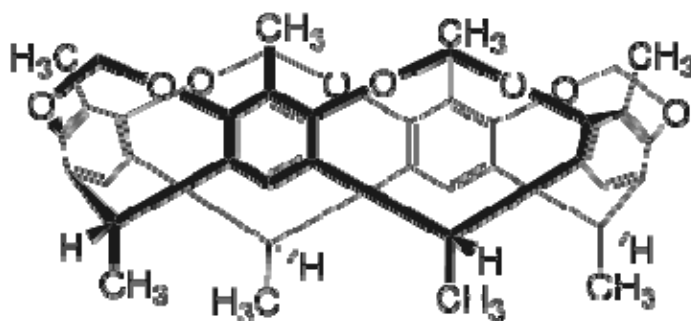
2.2. Szoftverek

A mérési adatokat az Agilent ChemStation Rev. B.04.03(16) szoftverrel értékeltük ki, a táblázatokat és az ábrákat pedig Microsoft Excel segítségével készítettük el. A mintáink molekula szerkezetének a felrajzolásában a Chemdraw program volt segítségünkre.

2.3. Felhasznált vegyszerek és minták

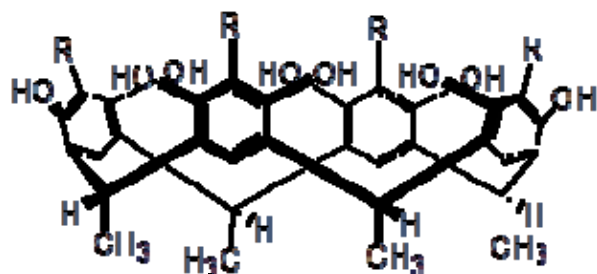
A kísérletben használt mozgófázis HPLC tisztaságú acetonitril és víz (Sigma) elegyből tevődött össze. A holtidőket tiokarbamiddal (Sigma, 99%-os tisztaságú) határoztuk meg. Az általunk vizsgált mintákat a Pécsi Tudományegyetem Szervetlen Kémia Tanszékén állították elő.

Két típusú makrociklusos vegyületet vizsgáltunk, a felső részen hidrogént vagy metil-csoportot tartalmazó rezorcinaréneket és a merevebb szerkezetű 2-metil-kavítandot. A minták szerkezetét nézve látható, hogy a 2-metil-kavítand (1. ábra) felső peremén ellentétben a rezorcin[4]arénokkal (2. ábra) nincsenek szabad hidroxil csoportok, hanem helyettük az oxigéneket összekötő metilén hidak találhatóak. Ennek köszönhetően a 2-metil-kavítand nem csak szerkezetileg merevebb, hanem apolárisabb molekula is, mint a rezorcinarén származékok.



1. ábra

2-metil-kavitand szerkezete (Kavitand)



2. ábra

Rezorcinarén származékok szerkezeti képlete

$R = CH_3$; 2-metil-C-tetra-metilcalix[4]rezorcinarén (MRM)

$R = H$; C-tetra-metilcalix[4]rezorcinarén (HRM)

2.4. A folyadékkromatográfia termodinamikai jellemzői

Izokratikus elúciót alkalmazva a retenciós mechanizmus a retenciós tényező és a termodinamikai paraméterek közötti összefüggéssel értelmezhető. A minta adszorpciós folyamatának termodinamikai egyensúlyi állandója kifejezhető az állófázishoz kötődés közben bekövetkező szabadentalpia-változással az (1,2) egyenlet alapján:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K \quad (1,2)$$

$$\ln K = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (3)$$

$$\ln K = \ln k\beta = \ln k \frac{V_S}{V_M} \quad (4)$$

ahol ΔG a szabadentalpia-változást, ΔH az entalpiaváltozást, T az abszolút hőmérsékletet, ΔS az entrópiaváltozást, R az egyetemes gázállandót, K az egyensúlyi állandót, k a retenciós tényezőt, β a fázisarányt, V_M a mozgófázis térfogatát, V_S pedig az állófázis térfogatát jelöli.

A vizsgált minta retenciós tényezőjét a hőmérséklet függvényében ábrázolva a van't Hoff összefüggéshez jutunk:

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \frac{V_S}{V_M} \quad (5)$$

A retenciós tényező a (6) egyenlettel számolható, ahol t_R a retenciós idő, t_M pedig a holtidő:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (6)$$

A van't Hoff egyenlet azon a hőmérséklet tartományon belül lineáris, ahol az összefüggésben szereplő ΔH és ΔS értékek állandóak, tehát hőmérséklet függetlenek. Amennyiben ΔH és ΔS értéke hőmérsékletfüggő, úgy a van't Hoff egyenlet nem lineáris, hanem egy, a hőmérséklet értékeket is tartalmazó összetett kifejezés.

A retenciós tényezők természetes alapú logaritmusát ábrázolva az abszolút hőmérséklet reciprokának ($1/T$) függvényében, a kapott egyenes meredekségéből a minta állófázison történő megkötődésének entalpiaváltozása, valamint az egyenes tengelymetszetéből az entrópiaváltozása számolható. Az entalpia- és entrópiaváltozás pedig az (1) egyenlet alapján megadja a folyamat szabadentalpia-változását.

A van't Hoff egyenletből következően, ha a retenciós mechanizmus nem változik a hőmérséklet emelésével, akkor összehasonlíthatók az entalpia- és entrópiaváltozás értékek különböző minták esetén, azonos állófázison, illetve egyetlen minta esetén különböző állófázisokon.

3. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A kétféle rezorcinarén származék és a kavitand kromatogramjait szobahőmérsékleten, a kísérleti részben leírt körülmények között vettük fel, majd a minták retenciós tényezőjét és elúciós sorrendjét hasonlítottuk össze az eltérő lánchosszúságú alkilcsoporttal módosított szilikagél állófázisokon (C_8 , C_{18}).

A C₈-as töltetű oszlop oktilcsoportokat, a C₁₈-as töltetű oszlop pedig oktadecilcsoportokat tartalmaz ligandumként. A különböző gyártók által előállított oszlopok eltérő utókezelési eljárásokkal (pl. „endcapping”) készülnek, ennek következtében a felületi borítottságuk eltérő lehet.

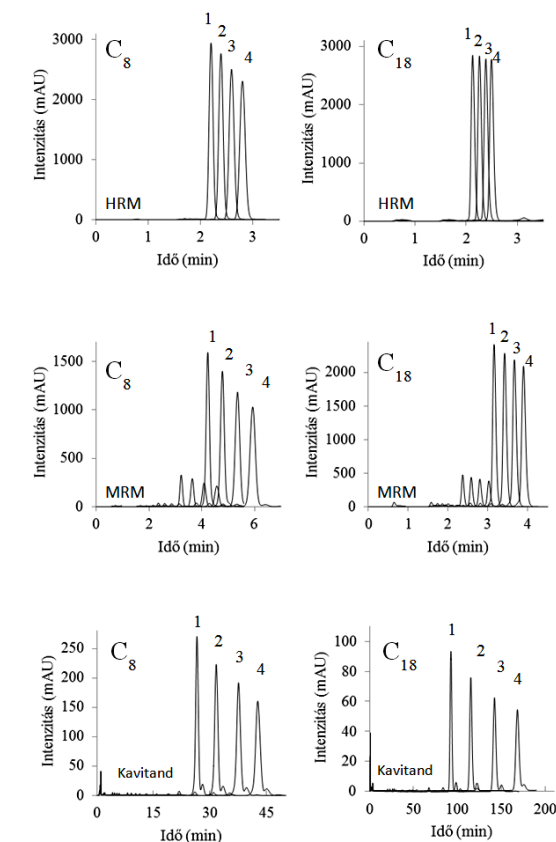
A kísérleti eredmények alapján a kavítand retenciós tényezője szobahőmérsékleten 10-szerese az MRM, és 25-szerese a HRM retenciós tényezőjének a C₈ töltetű oszlopon, valamint 50-szerese az MRM és 120-szorosa a HRM retenciós tényezőjének a C₁₈ töltetű oszlopon. Továbbá megfigyelhető, hogy a rezorcinarének és a kavítand fordított sorrendben eluálódnak a kétféle állófázison (1. táblázat).

1. táblázat: HRM, MRM és Kavítand retenciós tényezője C8 és C18 állófázison 25 °C-on

	Oszlop típusa	HRM	MRM	KAVITAND
Retenciós tényező (k)	Thermo Scientific BDS HYPERSIL C ₁₈	1,18	2,55	137,06
	Waters Xterra® RP ₈	1,37	4,05	35,35

A rezorcinarének és a kavítand eltérő kromatográfiai viselkedése eltérő szerkezeti sajátosságukból fakad, és ennek következtében különböző módon kötődnek az állófázisokhoz. Az állófázissal történő kölcsönhatás értelmezéséhez, a retenciós mechanizmus tanulmányozásához a mintákat különböző hőmérsékleten vizsgáltuk, kromatografáltuk. A 3. ábra mutatja az egyes minták egymásra vetített kromatogramját különböző hőmérsékleten és adott állófázison.

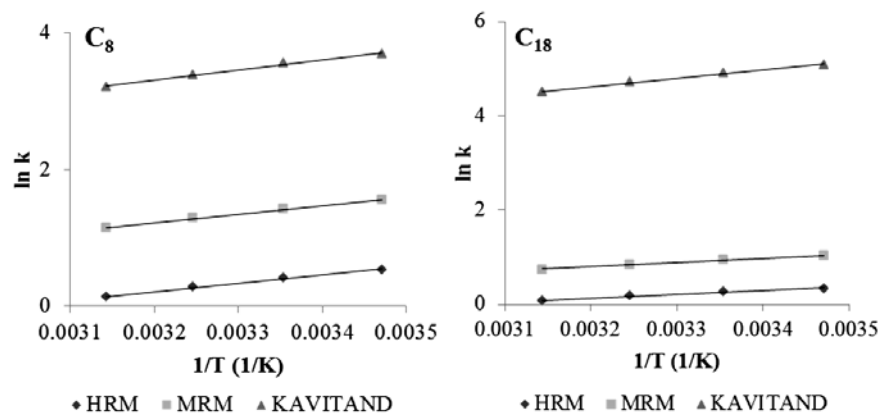
A retenciós idő a várakozásnak megfelelően minden minta és állófázis esetében az 1-es számmal jelölt 45°C-on volt a legkisebb, és a 4-es számmal jelölt 15°C-on volt a legnagyobb. A hőmérséklet csökkenésével a retenciós idő lineárisan növekedett. A kavítand retenciós ideje a C₁₈ töltetű oszlopon 93–168 perc, ezzel szemben a C₈ töltetű oszlopon 26–42 perc között változott.



3. ábra

A minták kromatogramja C₈ és C₁₈ állófázison.

(1. = 45°C; 2. = 35°C; 3. = 25°C; 4. = 15°C hőmérsékletet jelöli)



4. ábra

Kavitand, MRM és HRM retenciós tényezőinek hőmérsékletfüggése

A hőmérséklet reciprokanak függvényében ábrázoltuk a retenciós tényező természetes alapú logaritmusát (4. ábra), az egyenesek meredekségéből és tengelymetszetéből megkaptuk a folyamat entalpia-, illetve entrópiaváltozását (2. táblázat). Ismert, hogy minél erősebb a kölcsönhatás az állófázis és a vizsgált minta között, az entalpiaváltozás annál negatívabb. Míg a C_8 állófázison a minták entalpiaváltozása közel azonos érték, addig a C_{18} állófázison a kavitand entalpiaváltozása kétszer negatívabb a rezorcinarénok megfelelő értékéhez képest.

2. táblázat: HRM, MRM és Kavitand termodinamikai paraméterei C_8 és C_{18} állófázisokon.

Állófázis	Termodinamikai paraméterek	Minták		
		HRM	MRM	KAVITAND
C_8	ΔS (J/ K mol)	-26,64	-19,28	-7,82
	ΔH (kJ/ mol)	-10,16	-10,48	-12,33
	$T_{\text{átl}} \Delta S$ (kJ/ mol)	-8,07	-5,84	-2,37
	ΔG (kJ/ mol)	-2,09	-4,64	-9,96
C_{18}	ΔS (J/ K mol)	-16,03	-11,86	-5,37
	ΔH (kJ/ mol)	-6,61	-7,02	-14,90
	$T_{\text{átl}} \Delta S$ (kJ/ mol)	-4,86	-3,59	-1,63
	ΔG (kJ/ mol)	-1,75	-3,43	-13,27

Az anyagátadás a mozgófázisból az állófázisba annál kedvezményezettebb, minél pozitívabb az entrópiaváltozás. Mindkét állófázison 3–6-szor kisebb a kavitand $T\Delta S$ negatív értéke, mint a rezorcinarénok $T\Delta S$ szorzata. A folyamat szabadentalpia-változása ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) egy nagyságrenddel nagyobb negatív érték a kavitand esetén, mint a rezorcinarénok esetén, továbbá a rezorcinarénok ΔG értéke kisebb a C_8 állófázison, mint a C_{18} töltetű oszlopon.

4. ÖSSZEGZÉS

Munkánk során, méréseink alapján jelentős különbséget tapasztaltunk a rezorcinarén és a kavitand típusú makrociklusos vegyületek elúciós viselkedésében C_8 és C_{18} töltetű HPLC oszloponok. A retenciós tényező

hőmérsékletfüggéséből számolt termodinamikai paraméterek számszerű értékei tükrözik a kavitand erősebb kötődését az általunk alkalmazott állófázisokon, elsősorban a C₈, de különösen a C₁₈ állófázison.

A jelenség pontosabb megértéséhez a méréseket megismételjük ugyanolyan utókezelési eljárással készült állófázisokkal, hogy kiküszöböljük a különböző gyártók által előállított oszlopok közti különbséget.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatás a következő támogatók segítségével valósult meg: Collegium Talentum, OTKA-K106044 és TÁMOP-4.2.2. A-11/1/KONV-2012-0065

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1] C. Ding, K. Qu, Y. Li, K. Hu, H. Liu, B. Ye, Y. Wu, S. Zhang, Preparation and characterization of six calixarene bonded stationary phases for high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1170 (2007) 73-81.
- [2] D.S. Jensen, T. Teutenberg, J. Clark, M.R. Linford, Elevated Temperatures in Liquid Chromatography, Part III: A Closer Look at the van 't Hoff Equation, *Lc Gc North America*, 30 (2012) 1052-+.
- [3] M. Kazusaki, T. Yamaguchi, Enthalpy-Entropy Compensation of Halogenated Benzylamines in Reversed-Phase Liquid Chromatography, in, *Chromatography -Tokyo- Society For Chromatographic Sciences*, 2006, pp. 57-62.
- [4] O. Pietraszkiewicz, M. Pietraszkiewicz, Separation of pyrimidine bases on a HPLC stationary RP-18 phase coated with calix 4 resorcinarene, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 35 (1999) 261-270.
- [5] T. Sokoliess, M. Gronau, U. Menyes, U. Roth, T. Jira, Separation of (Z)- and (E)-isomers of thioxanthene and dibenz b,e oxepin derivatives with calixarenes and resorcinarenes as additives in nonaqueous capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 24 (2003) 1648-1657.
- [6] T. Sokoliess, A. Opolka, U. Menyes, U. Roth, T. Jira, Separation of racemic drugs on chiral resorcinarene-bonded HPLC-columns, *Pharmazie*, 57 (2002) 589-590.
- [7] H.M. Tan, S.F. Soh, J. Zhao, E.L. Yong, Y. Gong, Preparation and application of methylcalix[4]resorcinarene-bonded silica particles as chiral stationary phase in high-performance liquid chromatography, *Chirality*, 23 (2011) E91-E97.
- [8] M. Urbaniak, W. Iwanek, Synthesis of alkoxymethyl derivatives of resorcinarene via the Mannich reaction catalysed with iminodiacetic acid, *Tetrahedron*, 62 (2006) 1508-1511.
- [9] L.M. Yuan, Effect of mobile phase additive on chiral separation, *Separation and Purification Technology*, 63 (2008) 701-705.