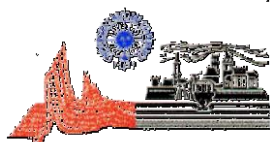


Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Chemii
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky

***Opis zjawisk powierzchniowych
w chromatografii cieczowej
z wykorzystaniem nowej generacji
chemicznie związanych faz
stacjonarnych***

dr Szymon Bocian
Autoreferat



Toruń, 2015

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

1. Imię i nazwisko

Szymon Bocian

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

2007 - 2011 Studia doktoranckie w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky Wydziału Chemii UMK, temat rozprawy doktorskiej: *Opis mechanizmu retencji w wysokosprawnej chromatografii cieczowej z wykorzystaniem wieloskładnikowych hydroorganicznych faz ruchomych*, obronionej dnia 15 czerwca 2011 r., promotor: prof. dr hab. Bogusław Buszewski;

2002 - 2007 Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Chemii, Specjalność: Chemia środowiska, praca magisterska pt. *Artefakty czy fakty w elucji chromatografii cieczowej – solvent piki*; promotor: prof. dr hab. Bogusław Buszewski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu

1 lutego 2014 – obecnie – adiunkt w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydziału Chemii UMK w Toruniu

1 października 2011 – 31 stycznia 2014 – asystent w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydziału Chemii UMK w Toruniu

4. Zainteresowania naukowe

Chromatografia cieczowa, opis mechanizmu retencji z uwzględnieniem procesów solwatacyjnych, synteza oraz charakterystyka powierzchniowa i chromatograficzna nowych faz stacjonarnych do chromatografii cieczowej.

5. Parametry bibliograficzne:

Łączna liczba publikacji z IF: 47

Łączna wartość wskaźnika IF: 182.184

Łączna wartość punktacji MNiSW: 1491

Cytowania na podstawie bazy Web of Science: 369

Liczba cytowań bez autocytacji: 221

Indeks H: 12

Indeks H bez autocytacji: 9

6. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

6.1. Tytuł osiągnięcia

Opis zjawisk powierzchniowych w chromatografii cieczowej z wykorzystaniem nowej generacji chemicznie związanych faz stacjonarnych

(Osiągnięcie stanowi jednotematyczny cykl publikacji od H1 do H14, wymienionych w Załączniku 2A, których kopie znajdują się w Załączniku 4)

Autoreferat wraz z omówieniem osiągnięcia naukowego***Wprowadzenie***

W 2002 roku rozpocząłem studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Pracę magisterską wykonywałem na specjalności chemia środowiska. Praca dyplomowa wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Bogusława Buszewskiego dotyczyła problemu adsorpcji rozpuszczalników w chromatografii cieczowej i fenomenu generowania tzw. „solvent pików”. Podczas realizacji pracy magisterskiej, w czasie 4-go i 5-go roku studiów odbyłem trzy 3-miesięczne staże naukowe na Uniwersytecie w Pecz (Węgry) w grupie profesora Attili Felingera i na Uniwersytecie w Pardubicach w grupie badawczej profesora Pavla Jandery. Podczas pobytu poszerzyłem swoją wiedzę z zakresu mechanizmu retencji w chromatografii cieczowej i opisu procesów solwatacyjnych. Tytuł magistra uzyskałem w 2007 roku. Wyniki przedstawione w mojej pracy magisterskiej, jak również wyniki otrzymane podczas staży zagranicznych prezentowałem na konferencjach międzynarodowych. Ukazały się one także drukiem w formie publikacji naukowych [1-3].

W 2007 roku zostałem słuchaczem Studium Doktoranckiego na Wydziale Chemii UMK. Tematyka podjętych badań dotyczyła opisu procesów solwatacyjnych i ich wpływu na mechanizm retencji w układzie odwróconych faz chromatografii cieczowej. Szczegółowym przedmiotem badań był opis preferencyjnej adsorpcji cząsteczek takich rozpuszczalników jak: metanol, etanol, propan-2-ol, acetonitryl i woda, na powierzchni chemicznie związanych faz stacjonarnych, w tym na resztkowych grupach silanolowych i łańcuchach alkilowych z wykorzystaniem binarnych hydroorganicznych eluentów w wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Wszystkie pomiary chromatograficzne wykonywałem na samodzielnie zsyntezowanych chemicznie związanych oktadecylowych fazach stacjonarnych według metody opracowanej przez Buszewskiego [4, 5]. W pierwszym etapie badań otrzymywane materiały chromatograficzne poddawałem wnikliwej charakterystyce z wykorzystaniem technik instrumentalnych, takich jak analiza elementarna, spektroskopia w podczerwieni (FT IR), niskotemperaturowa adsorpcja azotu (LTNA) i magnetyczny rezonans jądrowy dla ciała stałego (CP MAS NMR) [6]. Na otrzymanych adsorbentach przeprowadzałem pomiary adsorpcji rozpuszczalników poprzez wyznaczenie izoterm nadmiarowych rozpuszczalników z mieszanin binarnych [6] oraz wpływu ciśnienia i temperatury na proces solwatacji fazy stacjonarnej [7]. Wykonałem również porównanie procesu adsorpcji rozpuszczalników na fazach stacjonarnych po przeprowadzeniu wtórnej silanizacji [8]. Badania te wykazały adsorpcję metanolu na resztkowych grupach silanolowych poprzez tworzenie wiązań wodorowych, co znacznie później zainspirowało mnie do opracowania testu umożliwiającego wyznaczenie ilości aktywnych grup silanolowych na powierzchni fazy stacjonarnej [9]. Analogiczne pomiary wykonałem na serii faz stacjonarnych zawierających polarne grupy funkcyjne, w celu określenia wpływu tych grup na selektywną adsorpcję rozpuszczalników. Przeprowadzone pomiary wykazały preferencyjną adsorpcję metanolu w przypadku chemicznie związanych faz stacjonarnych zawierających grupy funkcyjne mogące tworzyć wiązania wodorowe (grupy aminowe, amidowe itp.). Preferencyjna adsorpcja z acetonitrylu została zaobserwowana w przypadku materiałów zawierających elektrony π (pierścień fenyłowy i grupa nitylowa) [10]. Opis procesów solwatacyjnych został wzbogacony wynikami z pomiaru efektów cieplnych adsorpcji rozpuszczalników na modyfikowanych powierzchniach krzemionkowych [11, 12]. Uzyskane rezultaty poddałem również weryfikacji wykorzystując w tym celu modelowanie komputerowe procesu adsorpcji rozpuszczalnika będącego w kontakcie z modyfikowaną powierzchnią krzemionki [13]. Nowatorskim podejściem

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

do charakteryzowania chemicznie związanych faz stacjonarnych zastosowanym podczas realizacji pracy doktorskiej był pomiar potencjału zeta, który tworzy się w kontakcie powierzchni fazy stacjonarnej z mieszaniną rozpuszczalników, będących fazą ruchomą [14].

W celu opisu mechanizmu retencji wyznaczyłem izotermy adsorpcji analitów testowych o charakterze kwasowym (fenolu) i zasadowym (aniliny) na serii przygotowanych wypełnień chromatograficznych. Umożliwiło to określenie wpływu grup funkcyjnych oraz solwatacji chemicznie związanej fazy stacjonarnej na retencję analitu [15, 16]. Stosując fazy ruchome o wysokiej zawartości wody wyznaczyłem zależność retencji od składu fazy ruchomej i gęstości pokrycia fazy stacjonarnej cząsteczki amoksycyliny, posiadającej różnorodne grupy funkcyjne. Na podstawie przedstawionych wyników dokonałem opisu mechanizmu retencji analitów w układzie faz odwróconych chromatografii cieczowej [17].

Na marginesie można dodać, że w trakcie pracy nad rozprawą doktorską finansowaną poprzez przyznany grant promotorski, zrealizowałem praktycznie równolegle, jeszcze jeden projekt badawczy dla młodych naukowców, finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego – Iuventus Plus, którego byłem kierownikiem.

Wspomniane publikacje złożyły się na przygotowaną pod kierunkiem prof. dr. hab. Bogusława Buszewskiego rozprawę doktorską zatytułowaną *Opis mechanizmu retencji w wysokosprawnej chromatografii cieczowej z wykorzystaniem wieloskładnikowych hydroorganicznych faz ruchomych*, którą z wyróżnieniem obroniłem 15 czerwca 2011 roku. Rozprawa doktorska uzyskała szereg nagród i wyróżnień.

Po uzyskaniu tytułu doktora nauk chemicznych, zostałem zatrudniony na Wydziale Chemii UMK na stanowisku asystenta. Podjęta przeze mnie tematyka badawcza dotyczyła syntezy nowych chemicznie związanych faz stacjonarnych do chromatografii cieczowej, która została poprzedzona wstępnymi badaniami nad cholesterolowymi fazami stacjonarnymi jeszcze przed obroną rozprawy doktorskiej [18, 19]. Wyniki przeprowadzonych badań nie zostały ujęte w rozprawie doktorskiej. Moje zainteresowanie zostało również skierowane w stronę syntezy materiałów do chromatografii jonowej. W ramach realizacji tych badań otrzymano dendrymerową fazę stacjonarną na powierzchni nośnika polimerowego, zdolną do rozdzielania anionów nieorganicznych [20, 21].

Znajomość procesów solwatacyjnych jak również umiejętność syntezy alkilowych faz stacjonarnych do chromatografii cieczowej stały się punktem wyjścia do syntezy nowych materiałów chromatograficznych o właściwościach hydrofobowo-hydrofilowych, które stanowią podstawę rozprawy habilitacyjnej. Dotychczasowa wiedza z zakresu procesów solwatacji, jak i dalsze badania wykonane podczas realizacji rozprawy habilitacyjnej umożliwiły mi syntezę nowych faz stacjonarnych do chromatografii cieczowej, zawierających grupy funkcyjne dające określone efekty solwatacyjne w układach różnych rozpuszczalników, w szerokim zakresie od czystej wody do czystych rozpuszczalników organicznych. Poprzez odpowiednie połączenie hydrofobowych (alkilowych, arylowych) i polarnych (fosforanowych, estrowych, fosforoamidowych, aminowych) grup funkcyjnych, w tym również grup zjonizowanych (czwartorzędowe sole amoniowe) otrzymałem serię wypełnień chromatograficznych o właściwościach hydrofobowo-hydrofilowych, znajdujących zastosowanie w układzie odwróconych faz chromatografii cieczowej, w chromatografii oddziaływań hydrofilowych i w chromatografii jonowej.

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Fazy stacjonarne o właściwościach hydrofobowo - hydrofilowych

Zastosowana faza stacjonarna w połączeniu z fazą ruchomą decyduje o retencji i selektywności rozdzielania w układzie chromatografii cieczowej. Historycznie, w zależności od właściwości powierzchniowych fazy stacjonarnej, chromatografia cieczowa została podzielona na normalny (NP) i odwrócony układ faz (RP) [22, 23]. W normalnym układzie faz, faza stacjonarna jest polarna (np. niemodyfikowany żel krzemionkowy), a faza ruchoma to najczęściej mieszanina rozpuszczalników o niskiej polarności. W odwróconym układzie natomiast faza stacjonarna jest niepolarna (najczęściej zawiera łańcuchy C18 związane do powierzchni krzemionki), a fazę ruchomą stanowi mieszanina wody i rozpuszczalnika organicznego o znacznej polarności, jak np. metanol i acetonitryl [24, 25]. W ostatnich latach opracowano nowy układ chromatografii cieczowej - chromatografię oddziaływań hydrofilowych (HILIC) [26]. HILIC stanowi połączenie polarnej fazy stacjonarnej i fazy ruchomej zawierającej więcej niż 60% rozpuszczalnika organicznego, najczęściej acetonitrylu w połączeniu z wodą. Układ ten umożliwia rozdzielanie substancji polarnych. Typowymi fazami stacjonarnymi dla HILIC są więc materiały stosowane dotychczas w normalnym układzie faz, takie jak niemodyfikowana krzemionka, fazy diolowe, aminowe, ect. [27]. Niemniej jednak istnieje zapotrzebowanie na nowe fazy stacjonarne do HILIC, charakteryzujące się większą selektywnością niż dotychczas stosowane. Efekt ten można osiągnąć poprzez opracowywanie materiałów zawierających w swej strukturze różnego rodzaju grupy funkcyjne, których specyficzne oddziaływania z rozdzielanymi substancjami zaowocują zwiększoną selektywnością rozdzielania.

Dodatkowym powodem dla syntezy nowych faz stacjonarnych do chromatografii cieczowej są oczekiwania tzw. zielonej chemii [28]. Prowadzone są badania nad zmniejszaniem zużycia rozpuszczalników organicznych poprzez miniaturyzację i zmianę toksycznych rozpuszczalników na etanol [29] lub zmianę warunków chromatograficznych w celu zastosowania wody bez modyfikatora organicznego jako fazy ruchomej [30, 31]. Istotna wydaje się możliwość syntezy materiałów, które będzie można wykorzystać do rozdzielania chromatograficznych z zastosowaniem czystej wody jako fazy ruchomej.

Kolejnym problemem współczesnych metod chromatograficznych jest powszechne zastosowanie oktadecylowej fazy stacjonarnej (C18) w odwróconym układzie faz do analiz substancji polarnych. O ile odwrócony układ faz miał służyć do rozdzielania substancji hydrofobowych, zastosowanie fazy C18 do analizy związków polarnych narzuca konieczność znacznych modyfikacji fazy ruchomej, takich jak dodatek soli buforujących, kwasów, odczynników par jonowych, jonowych środków powierzchniowo czynnych itd. Zastosowanie powyższych dodatków komplikuje skład fazy ruchomej powodując problemy z jej odtwarzalnością, a przez to z powtarzalnością wyników, jak również skraca czas pracy kolumn chromatograficznych. Wydaje się zatem być uzasadnione wprowadzenie alternatywnych materiałów o zwiększonej polarności, których zastosowanie w odwróconym układzie faz umożliwiłoby rozdzielanie substancji o znacznej polarności.

Obecnie znane są materiały chromatograficzne dla odwróconego układu faz, zawierające polarne grupy funkcyjne wbudowane w łańcuch hydrofobowy (ang. *polar embedded*) lub dołączone do fazy stacjonarnej na etapie wtórnej silanizacji (ang. *polar endcapped*) [32]. Modyfikacje te miały zazwyczaj na celu zwiększenie stabilności materiału w fazie ruchomej o zwiększonej zawartości wody. Przykładem takiego materiału mogą być fazy N-alkilamidowe [33, 34], jak również komercyjnie dostępne materiały, dla których producenci nie podają rodzaju zastosowanych grup funkcyjnych. Wprowadzenie nowych faz stacjonarnych o specyficznych właściwościach jest jednocześnie powiązane z koniecznością pełnego opisu zjawisk powierzchniowych zachodzących na granicy faz: faza stacjonarna/faza ruchoma w układzie chromatograficznym.

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Cel badań realizowanych w ramach habilitacji

Celem podjęcia niniejszych badań realizowanych w ramach rozprawy habilitacyjnej był opis procesów powierzchniowych w chromatografii cieczowej z wykorzystaniem nowych materiałów chromatograficznych. Fazy stacjonarne z wbudowanymi grupami polarnymi, mogące pracować w szerokim zakresie faz ruchomych, w tym również w warunkach czystej wody jako fazy ruchomej oraz w układzie HILIC znacząco różnią się od faz alkilowych. Stąd też stało się to przyczyną do podjęcia próby syntezy nowego typu faz stacjonarnych zawierających różne, chemicznie związane grupy funkcyjne oraz opisu zachodzących zjawisk powierzchniowych w układzie chromatograficznym.

Biorąc pod uwagę zapotrzebowanie na nowatorskie fazy stacjonarne do chromatografii cieczowej i technik pokrewnych we współczesnej nauce oraz opis ich właściwości powierzchniowych, podjęto badania naukowe, których celem było:

1. Opracowanie metod syntezy faz stacjonarnych o właściwościach hydrofobowo-hydrofilowych, zawierających wiązania estrowe [H1], fosfoestrowe [H2] oraz wiązanie fosforoamidowe [H3, H4, H5], ich charakterystyka instrumentalna oraz chromatograficzna;
2. Porównanie fenylowych faz stacjonarnych z wbudowanymi polarnymi grupami funkcyjnymi w celu polepszenia stabilności materiałów w warunkach dużej ilości wody w fazie ruchomej [H6];
3. Porównanie właściwości powierzchniowych cholesterolowych faz stacjonarnych, w tym syntezę nowej fazy cholesterolowej o zwiększonej gęstości pokrycia w celu rozdzielania hormonów sterydowych [H7, H8];
4. Opracowanie metod syntezy nowej generacji faz stacjonarnych do chromatografii jonowej na nośniku krzemionkowym, w celu zwiększenia efektywności i selektywności rozdzielania [H9, H10];
5. Opis właściwości powierzchniowych faz stacjonarnych z wbudowanymi grupami polarnymi poprzez pomiar potencjału zeta na granicy faza stacjonarna - faza ruchoma [H9, H11];
6. Opis procesów solwatacyjnych, będący podstawą mechanizmu retencji w układzie chromatografii cieczowej, jak również punktem wyjściowym do syntezy i charakterystyki materiałów zawierających grupy funkcyjne o zróżnicowanej polarności [H12, H13, H14].

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Oryginalne naukowe prace twórcze będące efektem realizacji postawionego celu badawczego:

- [H1] **Sz. Bocian**, A. Nowaczyk, B. Buszewski, *Synthesis and characterization of ester-bonded stationary phases for liquid chromatography*, *Talanta* 131 (2015) 684-692.
- [H2] **Sz. Bocian**, B. Buszewski, *Synthesis and characterization of phosphodiester stationary bonded phases for liquid chromatography*, *Talanta* 143 (2015) 35-41.
- [H3] **Sz. Bocian**, A. Nowaczyk, B. Buszewski, *A new alkyl-phosphate stationary bonded phases for liquid chromatographic separation of biologically active compounds*, *Analytical Bioanalytical Chemistry* 404 (2012) 731-740.
- [H4] **Sz. Bocian**, M. Paca, B. Buszewski, *Characterization of new N,O-dialkyl phosphoramidate-bonded stationary phases for reversed-phase HPLC - retention and selectivity*, *Analyst* 128 (2013) 5221-5229.
- [H5] **Sz. Bocian**, B. Buszewski, *Comparison of retention properties of stationary phases imitated cell membrane in RP HPLC*, *Journal of Chromatography B* 990 (2015) 198-202.
- [H6] **Sz. Bocian**, B. Buszewski, *Phenyl-bonded stationary phases – the influence of polar functional groups on the retention and selectivity in reversed phase liquid chromatography*, *Journal of Separation Science* 37 (2014) 3435–3442.
- [H7] **Sz. Bocian**, J. Soukup, M. Matyska, J. Pesek, P. Jandera, B. Buszewski, *The influence of the organic modifier in hydro-organic mobile phase on separation selectivity of steroid hormones separation using cholesterol-bonded stationary phases*, *Journal of Chromatography A* 1245 (2012) 90– 97.
- [H8] J. Soukup, **Sz. Bocian**, P. Jandera, B. Buszewski, *Comparison of four cholesterol-based stationary phases for the separation of steroid hormones*, *Journal of Separation Science* 37 (2014) 345–351.
- [H9] B. Buszewski, M. Jaćkowska, **Sz. Bocian**, E. Dziubakiewicz, *The application of zeta potential for stationary phase characterization in ion chromatography*, *Journal of Separation Science* 36 (2013) 156–163.
- [H10] **Sz. Bocian**, S. Studzińska, B. Buszewski, *Functionalized Anion Exchange Stationary Phase for Separation of Anionic Compounds*, *Talanta* 127 (2014) 133–139.
- [H11] **Sz. Bocian**, E. Dziubakiewicz, B. Buszewski, *Influence of the charge distribution on the stationary phases zeta potential*, *Journal of Separation Science* 38 (2015) 2625-2629
- [H12] B. Buszewski, **Sz. Bocian**, A. Felinger, *Artifacts in liquid phase separations – system, solvent and impurity peaks*, *Chemical Reviews* 112 (2012) 2629–2641.
- [H13] S. Noga, **Sz. Bocian**, B. Buszewski, *Hydrophilic interaction liquid chromatography columns classification by effect of solvation and chemometric methods*, *Journal of Chromatography A* 1278 (2013) 89– 97.
- [H14] **Sz. Bocian**, G. Rychlicki, M. Matyska, J. Pesek, B. Buszewski, *Study of hydration process on silica hydride surfaces by microcalorimetry and water adsorption*, *Journal of Colloid and Interface Science* 416 (2014) 161-166.

Załącznik 3A

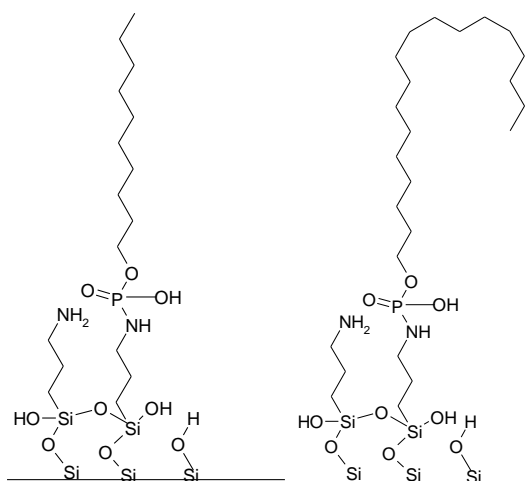
do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Opracowanie metod syntezy faz stacjonarnych o właściwościach hydrofobowo-hydrofilowych, zawierających wiązania estrowe, fosfoestrowe oraz wiązanie fosforoamidowe

Ideą przewodnią prac **H1-H5** była synteza nowych faz stacjonarnych do chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz i w chromatografii oddziaływań hydrofilowych w celu opracowania materiałów o specyficznych właściwościach powierzchniowych, powodujących lepszą selektywność rozdzielania i stabilność w warunkach wysokiej zawartości wody w fazie ruchomej. Przedstawione prace stanowią opracowanie metod syntezy i charakterystyki oryginalnych materiałów chromatograficznych, nie przedstawianych wcześniej w literaturze światowej. Nadrzędnym celem prowadzonych badań było opracowanie chemicznie związanych faz stacjonarnych zawierających zarówno grupy hydrofobowe (alkilowe, aryłowe, itp.), jak i grupy polarne. Materiały takie byłyby dedykowane do analizy związków chemicznych o znacznej polarności.

Poszczególne prace przedstawiają metody syntezy różnych faz stacjonarnych: *N,O*-dialkilofosforoamidowych z różnymi długościami łańcuchów hydrofobowych [**H3**, **H4**], faz stacjonarnych z wiązaniem estrowym [**H1**] i z wiązaniem fosfoestrowym [**H2**]. Wszystkie trzy typy materiałów stanowią połączenia dwóch typów faz stacjonarnych: materiałów z wbudowanymi grupami polarnymi i materiałów zawierających wolne grupy polarne [32], które wpisują się w obecne światowe trendy rozwoju chemicznie związanych faz stacjonarnych.

Pierwszym otrzymanym przeze mnie nowatorskim materiałem chromatograficznym były fazy *N,O*-dialkilofosforoamidowe [**H3**, **H4**]. Jako nośnik do syntezy wykorzystałem żel krzemionkowy ze względu na jego bardzo dobre właściwości chromatograficzne [35, 36]. W pierwszym etapie żel krzemionkowy został zmodyfikowany grupami aminopropyłowymi [37, 38]. W kolejnym etapie syntezy do grup aminowych przyłączany był łańcuch organiczny (pochodzący z alkoholu) poprzez grupę fosforanową (wprowadzaną jako tlenochlorek fosforu). Tak otrzymany materiał chromatograficzny zawierał w swej strukturze łańcuch alkilowy (C10 lub C18 w zależności od zastosowanego alkoholu), grupę fosforanową wbudowaną w łańcuch i grupy aminowe, zarówno związane z grupą fosforanową, jak i w formie wolnej. Struktury opracowanych faz *N,O*-dialkilofosforoamidowych przedstawia Rysunek 1.



Rysunek 1. Struktury faz *N,O*-dialkilofosforoamidowych.

Kolejnym etapem prowadzonych badań była wnikliwa analiza instrumentalna, w celu weryfikacji struktury otrzymanych materiałów. W tym celu wykonałem analizę elementarną

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

określając zawartości procentowe węgla, azotu i wodoru w otrzymanym materiale. Uzyskane dane umożliwiły obliczenie gęstości pokrycia nośnika krzemionkowego związanymi ligandami. W dalszym etapie wykonywane były pomiary spektroskopowe w zakresie podczerwieni oraz magnetyczny rezonans jądrowy. Przeprowadzone analizy potwierdziły obecność określonych grup funkcyjnych i zakładaną strukturę chemicznie związanej fazy stacjonarnej [H3].

Po upakowaniu otrzymanych faz stacjonarnych w stalowych kolumnach, przeprowadziłem ich charakterystykę chromatograficzną. Jednym z podstawowych parametrów koniecznych do określenia była hydrofobowość i polarność (mierzona jako aktywność silanolowa). W tym celu zastosowałem test opracowany przez S. Galushko. W kolejnym etapie sprawdziłem możliwości zastosowania otrzymanych materiałów w odwróconym układzie faz. Pomimo obecnych w strukturze polarnych grup funkcyjnych (aminowych i fosforanowych), fazy *N,O*-dialkilofosforoamidowe spełniają warunki stawiane chemicznie związanym fazom stacjonarnym do chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz [H8]. Zastosowanie otrzymanych materiałów umożliwiło rozdzielanie alkilowych pochodnych benzenu, co świadczy o dobrej selektywności metylenowej. Zastosowanie nowatorskich materiałów umożliwi również rozdzielanie wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Dodać należy, iż analizę można wykonać przy znacznie niższej zawartości procentowej rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej (50% lub 60%) niż stosując fazy oktadecylowe. W przypadku selektywności fenylowej obserwuje się niższe wartości niż dla typowych faz C18, co jest związane z niższą gęstością pokrycia. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż lepsze parametry chromatograficzne, np. wyższą sprawność, fazy *N,O*-dialkilofosforoamidowe wykazują przy zastosowaniu metanolu jako modyfikatora organicznego a nie acetonitrylu, jak w przypadku faz oktadecylowych. Jest to wynikiem solwatacji polarnych grup funkcyjnych, szczególnie aminowych, przez metanol [H4]. Fazy *N,O*-dialkilofosforoamidowe wykazują również bardzo dobrą solwatację w warunkach czystej wody jako fazy ruchomej (bez dodatku rozpuszczalnika organicznego). W takich warunkach jest możliwe ich zastosowanie do rozdzielania mieszaniny nukleozydów. Otrzymanie materiału umożliwiającego wykonywanie rozdzieleń chromatograficznych w warunkach czystej wody niesie ze sobą zarówno wartości ekonomiczne jak i ekologiczne, poprzez eliminację zużycia rozpuszczalników organicznych.

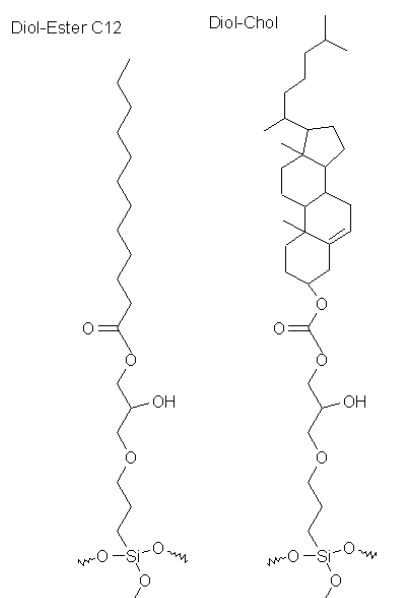
Bardzo ciekawą cechą faz *N,O*-dialkilofosforoamidowych są właściwości pseudomembranowe [H5], które umożliwiają zastosowanie chromatografii cieczowej do badania oddziaływań substancji z błoną biologiczną [39-42]. Dotychczas, jako wzorcowa faza stacjonarna do tego typu badań stosowana była faza IAM (ang. *Immobilized Artificial Membrane*) [43, 44]. W przeprowadzonych badaniach dla czterech grup związków o różnym charakterze chemicznym (nukleozydów i zasad azotowych, alkilowych pochodnych benzenu, wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oraz flawonoidów) wykazałem bardzo wysoką korelację pomiędzy parametrem $\log k_w$ otrzymanym z wykorzystaniem kolumny IAM oraz fazą stacjonarną *N,O*-dialkilofosforoamidową z łańcuchem C18. Zaobserwowałem również bardzo wysoką korelację pomiędzy parametrem $\log k_w$ a parametrem $\log P$, będącym miarą hydrofobowości substancji. Otrzymane wyniki świadczą o zbliżonych właściwościach powierzchniowych tych materiałów, jak również potwierdzają założenie, że otrzymana faza stacjonarna, dzięki kombinacji dobranych grup funkcyjnych, symuluje w równie dobry sposób właściwości błony biologicznej. Badania potwierdzają również możliwość zastosowania otrzymanej fazy chromatograficznej do przewidywania oddziaływań substancji z błoną biologiczną ze zbliżoną skutecznością, jak obecnie stosowana faza IAM. Dodać należy, że faza *N,O*-dialkilofosforoamidowa posiada prostszą strukturę i jest łatwiejsza w syntezie, niż faza IAM [H5].

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Kolejnym zastosowaniem fazy *N,O*-dialkilofosforoamidowej jest rozdzielanie fosfolipidów w układzie RP HPLC względem polarności. Pomiary te zostały wykonane w układzie off-line dwuwymiarowej chromatografii cieczowej [45]. Ze względu na ortogonalne właściwości w porównaniu do fazy oktadecylowej, otrzymany układ dwuwymiarowy wykazał bardzo dobrą rozdzielczość względem fosfolipidów jaja kurzego. Fazę *N,O*-dialkilofosforoamidową zastosowałem również z powodzeniem w układzie HILIC [H15].

W przypadku prac nad syntezą faz z wiązaniem estrowym [H1] oraz z wiązaniem fosfoestrowym [H2], materiałem wyjściowym do syntezy była krzemionka zmodyfikowana silanem zawierającym grupy hydroksylowe (diolowe). W przypadku faz estrowych modyfikację powierzchni wykonywałem poprzez reakcję z chlorkiem kwasu dodecylowego lub chloromrówczanem cholesterylu. Otrzymałem w ten sposób chemicznie związane fazy stacjonarne zawierające łańcuch 12-sto węglowy (Diol-Ester C12) lub cząsteczkę cholesterolu (Diol-Chol) związane z nośnikiem poprzez wiązanie estrowe. Struktury nowych faz stacjonarnych przedstawia Rysunek 2.



Rysunek 2. Struktury estrowych faz stacjonarnych.

Otrzymane fazy estrowe wpisują się doskonale w ideę materiałów, zawierających wbudowane grupy polarne w strukturę związanych ligandów. Jednocześnie, nieprzereagowane ligandy diolowe stanowią dodatkowe polarne centra aktywne.

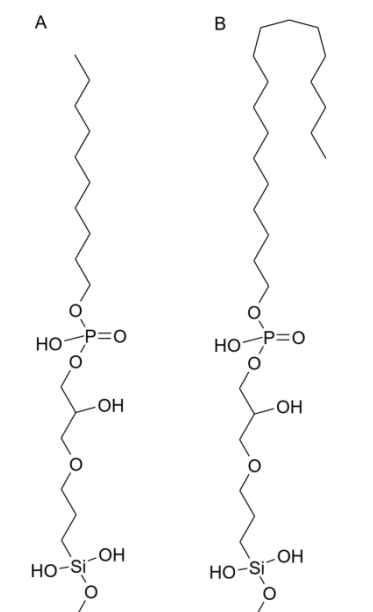
Otrzymane materiały chromatograficzne poddałem analizie spektroskopowej w celu potwierdzenia ich struktury. Wykorzystałem do tego spektroskopię FT-IR oraz NMR ciała stałego dla jąder ^{13}C i ^{29}Si . Wykonałem również analizę elementarną w celu obliczenia gęstości pokrycia powierzchni nośnika krzemionkowego związanymi ligandami. Podobnie jak w przypadku faz *N,O*-dialkilofosforoamidowych wykonano modelowanie molekularne otrzymanych materiałów, potwierdzające zróżnicowanie właściwości powierzchniowych z punktu widzenia polarności i hydrofobowości. W otrzymanych fazach stacjonarnych można wyróżnić regiony oddziaływań polarnych przy powierzchni nośnika i w obrębie grup diolowych oraz region oddziaływań hydrofobowych. Powoduje to, że w zależności od zastosowanego składu fazy ruchomej możliwe jest rozdzielanie zarówno cząsteczek hydrofobowych, jak i polarnych [H1]. Właściwości te powodują, iż fazy te można zastosować do rozdzielania m.in. alkilowych pochodnych benzenu i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, co świadczy o wystarczającej hydrofobowości materiału do jego

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

zastosowania w odwróconym układzie faz chromatografii cieczowej [H1]. Materiały te umożliwiają również rozdzielanie substancji polarnych w układzie RP oraz w warunkach czystej wody jako fazy ruchomej. Wyniki rozdzieleń substancji polarnych prezentowane były na konferencjach. Obecnie w przygotowaniu jest publikacja naukowa przedstawiająca te wyniki.

Żel krzemionkowy modyfikowany ligandami diolowymi wykorzystałem również jako nośnik do syntezy faz fosfoestrowych [H2]. Poprzez modyfikację nośnika diolowego tlenochlorkiem fosforu i długołańcuchowym alkoholem otrzymałem chemicznie związane fazy stacjonarne, w których łańcuch alkilowy (C10 lub C18) związany był z nośnikiem diolowym poprzez grupę fosforanową tworzącą dwa wiązania estrowe. Struktury otrzymanych faz przedstawia Rysunek 3. Tak jak w przypadku wcześniej wymienionych faz stacjonarnych, również fazy fosfoestrowe stanowią nowość naukową i nie ma na ich temat wcześniejszych doniesień w literaturze naukowej.



Rysunek 3. Struktury estrowych faz stacjonarnych z różnymi długościami łańcuchów alkilowych: A-C10 i B-C18.

Niezbędnym etapem prowadzonych badań była analiza spektroskopowa otrzymanych materiałów, umożliwiająca potwierdzenie ich struktury oraz analiza elementarna, dająca informacje na temat stopnia pokrycia powierzchni związanymi ligandami.

W porównaniu do faz estrowych, obecność grupy fosforanowej w strukturze związanego ligandu w znacznym stopniu zwiększa polarność powierzchni chemicznie związanej fazy stacjonarnej. W efekcie zwiększenia polarności powierzchni adsorbentu, zmieniają się procesy solwatacyjne zachodzące na jego powierzchni podczas analiz chromatograficznych. W rezultacie obecność grupy fosforanowej powoduje silną adsorpcję wody, czego efektem jest tworzenie poliwarstwy cząsteczek wody, najprawdopodobniej od powierzchni nośnika do wysokości grup fosforanowych. W wyniku preferencyjnej adsorpcji wody możliwe jest zastosowanie fosfoestrowych faz stacjonarnych w chromatografii oddziaływań hydrofilowych, szczególnie w przypadku fazy z łańcuchem 18-sto węglowym (faza Diol-P-C18) [H2]. Zastosowanie tego materiału w HILIC umożliwia rozdzielanie m.in. nukleozydów i zasad azotowych.

Pomimo znaczącej polarności faz fosfoestrowych, ich hydrofobowości są wystarczające do zastosowania ich w odwróconym układzie faz chromatografii cieczowej. Materiały te w układzie RP wykazują dobrą selektywność metylenową, jak również umożliwiają

Załącznik 3A

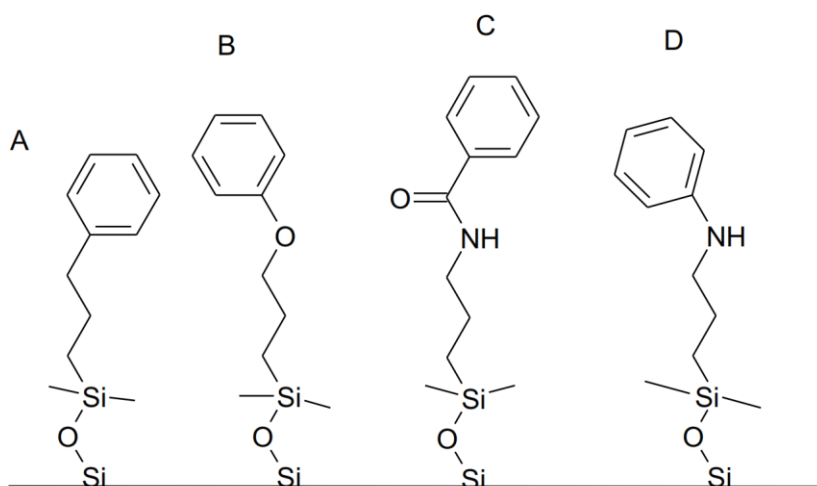
do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

rozdzielenie wybranych WWA. Dodać należy, że w mechanizmie rozdzielania w układzie RP, fazy estrowe, fosfoestrowe i *N,O*-dialkilofosforanowe oddziałują inaczej niż typowe fazy alkilowe. Obecność polarnych grup funkcyjnych powoduje silną adsorpcję wody i wytworzenie warstwy wodnej, nazywanej poduszką hydrolytyczną [33, 46]. W jej wyniku polarne grupy funkcyjne stają się niedostępne dla hydrofobowych analitów, które oddziałują jedynie z hydrofobowymi grupami fazy stacjonarnej.

Podsumowując, odpowiedni dobór hydrofobowych i polarnych grup funkcyjnych w znaczący sposób wpływa na proces solwatacji powierzchni fazy stacjonarnej w układzie chromatograficznym. Poprzez odpowiednie modyfikacje powierzchni, możliwe jest otrzymanie materiałów umożliwiających ich zastosowanie chromatograficzne zarówno w układzie RP, jak i HILIC oraz w warunkach czystej wody jako fazy ruchomej.

Porównanie fenyłowych faz stacjonarnych z wbudowanymi polarnymi grupami funkcyjnymi

Bazując na powyżej opisanych doświadczeniach wykonano syntezę serii faz stacjonarnych zmieniając polarną grupę funkcyjną wbudowaną w krótki łańcuch alkilowy, zachowując niezmienną grupę hydrofobową, którą był pierścień fenyłowy [H6]. Fazy fenyłowe są znane i dostępne komercyjnie [47-51], ale celem podjętych badań było określenie wpływu polarnych grup funkcyjnych na retencję i selektywność przy zachowaniu stałego fragmentu hydrofobowego związanych ligandów. Seria materiałów zawierająca fazy stacjonarne: fenylo-propylową, fenoksy-propylową, fenylo-aminową i fenylo-amidową została zsyntezowana i poddana analizie instrumentalnej. Dla wszystkich materiałów otrzymano bardzo zbliżone gęstości pokrycia, co umożliwiło wnioskowanie, że zmiany retencji i selektywności otrzymanych materiałów są efektem wbudowanych polarnych grup funkcyjnych, a nie efektem różnej gęstości pokrycia powierzchni nośnika. Struktury otrzymanych materiałów przedstawia Rysunek 4.



Rysunek 4. Fenyłowe fazy stacjonarne: fenylo-propylowa (A), fenoksy-propylowa (B), fenylo-amidowa (C) i fenylo-aminowa (D).

Obecność polarnych grup funkcyjnych, aminowej i amidowej, zmniejsza w sposób istotny hydrofobowość fazy stacjonarnej, a w rezultacie zmniejsza retencję hydrofobowych analitów na tych fazach. Jest to szczególnie widoczne w przypadku zastosowania metanolu jako modyfikatora organicznego fazy ruchomej. Nieco odmienna sytuacja miała miejsce w przypadku zastąpienia metanolu acetonitrylem. Mniejsze powinowactwo acetonitrylu

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

do polarnych grup funkcyjnych (aminowej i amidowej), powoduje względnie słabszą siłę elucyjną acetonitrylu, co skutkuje zbliżoną retencją i mniejszym zróżnicowaniem chemicznie związanych faz stacjonarnych. Zmiana modyfikatora organicznego wpływała znacząco również na selektywność metylenową i selektywność fenyłową otrzymanych materiałów, co potwierdza tezę, że dobór odpowiednich grup funkcyjnych w strukturze fazy stacjonarnej umożliwia sterowanie procesem solwatacji. W wyniku tych zmian obserwuje się zmiany siły elucyjnej rozpuszczalników względem szeregu eluotropowego [H6].

W przypadku zastosowania serii fenyłowych faz stacjonarnych do rozdzielania wybranych WWA, znacznie większą retencję zaobserwowałem na fazach: fenylo-propylowej i fenoksy-propylowej. Obecność aminowej i amidowej grupy funkcyjnej znacznie zmniejszyła retencję, jednak obniżenie zawartości procentowej modyfikatora organicznego w fazie ruchomej umożliwiało uzyskanie satysfakcjonującej selektywności rozdzielania. Dodatkowo należy wskazać fakt, iż fazy z polarnymi grupami umożliwiały uzyskanie podobnych parametrów rozdzielania przy mniejszym zużyciu rozpuszczalników organicznych w porównaniu z fazą stacjonarną fenylo-propylową [H6].

Porównanie właściwości powierzchniowych cholesterolowych faz stacjonarnych, w tym synteza nowej fazy cholesterolowej o zwiększonej gęstości pokrycia

Adsorbenty cholesterolowe stanowią grupę faz stacjonarnych o interesujących właściwościach chromatograficznych. Syntezy cholesterolowych faz stacjonarnych wykonywane są od wielu lat [37, 52, 53]. Dwa materiały zawierające związaną cząsteczkę cholesterolu są dostępne jako komercyjne chemicznie związane fazy stacjonarne. We wcześniejszych badaniach podjąłem próbę syntezy nowej cholesterolowej fazy stacjonarnej o zwiększonej gęstości pokrycia cząsteczkami cholesterolu [18, 19]. Cel ten udało mi się osiągnąć poprzez zastosowanie do modyfikacji krzemionki silanu z dwiema grupami aminowymi. Umożliwiło to zwiększenie gęstości pokrycia cholesterolom, co skutkowało wzrostem hydrofobowości fazy stacjonarnej oraz zwiększeniem retencji niepolarnych analitów. W efekcie ostatnich badań opracowałem również metodykę syntezy estrowej fazy stacjonarnej zawierającej immobilizowaną cząsteczkę cholesterolu [H1]. W ramach rozprawy habilitacyjnej podjąłem badania nad zastosowaniem cholesterolowych faz stacjonarnych, zarówno dostępnych komercyjnie jak i syntezowanych samodzielnie, do rozdzielania hormonów sterydowych [H7, H8]. Siedem hormonów sterydowych rozdzielanych było na czterech różnych cholesterolowych fazach stacjonarnych z wykorzystaniem metanolu, acetonitrylu i etanolu jako modyfikatorów fazy ruchomej. Cholesterolowe fazy stacjonarne, ze względu na podobieństwo strukturalne do hormonów sterydowych wykazują bardzo dobrą selektywność rozdzielania tych związków. W zależności od zastosowanej fazy ruchomej, umożliwiają one rozdzielanie izomerów α i β estradiolu. Największą retencję hormonów zaobserwowałem w przypadku najbardziej hydrofobowej fazy stacjonarnej zsyntezowanej na nośniku zawierającym dwie grupy aminowe w ligandzie. Znacznie mniejszą retencję obserwowano na komercyjnej fazie UDC cholesterol, ale przy zmniejszeniu zawartości rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej, kolumna ta również umożliwiała rozdzielanie wybranych hormonów sterydowych. Zauważyć należy, że zmiany jakościowe i ilościowe modyfikatora organicznego w fazie ruchomej bardzo często zmieniały kolejność elucji hormonów sterydowych na cholesterolowych fazach stacjonarnych. Największą zaletą cholesterolowych faz stacjonarnych w przypadku analizy hormonów jest selektywność, której nie są w stanie zaoferować alkilowe fazy stacjonarne w układzie HPLC [H7]. Wyjątkowa selektywność faz cholesterolowych stała się inspiracją do wykonania pomiarów termodynamicznych [H8]. W wyniku przeprowadzonych badań wpływu temperatury na retencję i selektywność rozdzielania okazało się, że w przypadku

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

wszystkich faz cholesterolowych retencja maleje wraz ze wzrostem temperatury, co jest typową obserwacją dla odwróconego układu faz chromatografii cieczowej. Zaskakującym jednak okazał się fakt, że w celu uzyskania optymalnej selektywności, każda z testowanych faz stacjonarnych wymaga zastosowania innej temperatury, z zakresu od 20°C dla faz komercyjnych do 40°C dla fazy cholesterolowej na nośniku di-aminowym. Podobnie jak w przypadku modyfikatorów organicznych, w wielu przypadkach zaobserwowano zmiany kolejności elucji analitów przy zmianie temperatury. Trudności te nie wpływają jednak na fakt, że cholesterolowe fazy stacjonarne oferują najlepszą selektywność rozdzielania hormonów sterydowych. Uzyskanie podobnych parametrów rozdzielczości na fazach oktadecylowych jest znacznie trudniejsze, najczęściej wymaga zastosowania UHPLC, gdzie rozdzielczość dla izomerów α i β estradiolu uzyskuje się przez znaczny wzrost sprawności a nie selektywności.

Opracowanie metod syntezy nowej generacji faz stacjonarnych do chromatografii jonowej na nośniku krzemionkowym, w celu zwiększenia efektywności i selektywności rozdzielania

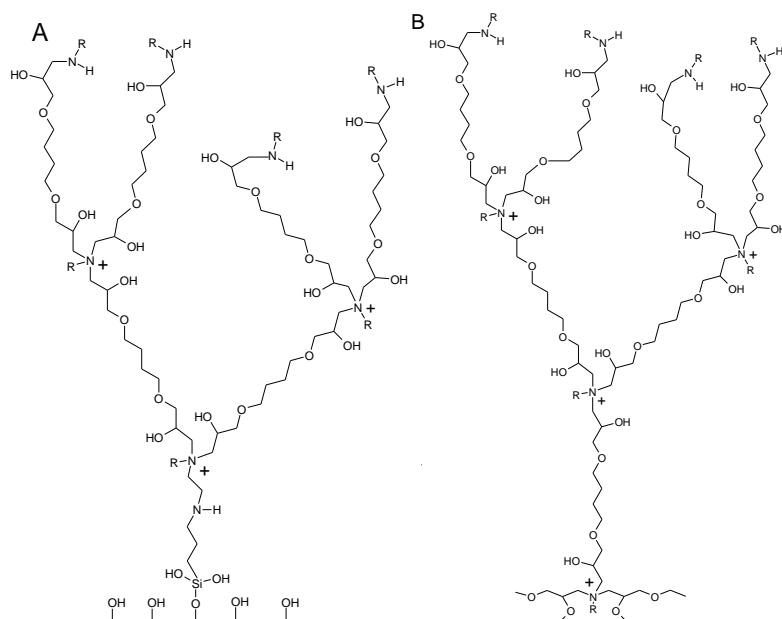
Chromatografia jonowa jest bardzo szybko rozwijającą się techniką analityczną. Rozwój ten powiązany jest z syntezą nowych faz stacjonarnych zawierających centra aniono- i kationowymienne. Z tego też powodu podjąłem prace nad otrzymaniem dendrymerowej anionowymiennej fazy stacjonarnej do chromatografii jonowej na powierzchni żelu krzemionkowego [H9, H10]. Pierwotna metoda syntezy dendrymerowej fazy anionowymiennej wewnątrz kapilar kwarcowych została opracowana przez Pohl'a i wsp. [54-56]. W dalszych pracach została opracowana metodologia syntezy fazy dendrymerowej na powierzchni sferycznego porowatego polimeru [21, 57, 58]. Badania realizowane w ramach rozprawy habilitacyjnej dotyczą problematyki syntezy fazy dendrymerowej na nośniku krzemionkowym [H10] oraz pomiar potencjałów zeta faz na bazie polimeru oraz na nośniku krzemionkowym [H9].

Synteza dendrymeru zawierającego czwartorzędowe grupy amoniowe jako centra anionowymienne polega na kondensacji epoksydu z aminą. W przypadku syntezy materiału w kapilarach kwarcowych oraz na powierzchni nośników polimerowych warstwa wiążąca do powierzchni tworzona była przez pokrywanie powierzchni polimerem. Wadą tej metody był brak wiązań kowalencyjnych między warstwą polimeru a powierzchnią nośnika. Powodowało to odrywanie się polimeru przy dużych wartościach przepływu fazy ruchomej. Stąd też podjąłem prace nad kowalencyjnym związaniem dendrymerowych ligandów do powierzchni żelu krzemionkowego. Cel ten udało się osiągnąć poprzez silanizację powierzchni krzemionki ligandem zawierającym dwie grupy aminowe, stosowanym wcześniej do syntezy fazy cholesterolowej. Przyłączone do powierzchni grupy aminowe stały się punktem wyjściowym do polikondensacji z epoksydem [H10]. Dalszy etap syntezy dendrymeru był analogiczny jak w przypadku faz w kapilarach kwarcowych i na nośniku polimerowym. Struktury dendrymerowych faz stacjonarnych przedstawia Rysunek 5.

Tworzenie dendrymeru o zwiększonej liczbie warstw powoduje zmiany w mechanizmie retencji. W przypadku krótkich ligandów retencja jest wynikiem oddziaływań jonów z fazy ruchomej z centrami jonowymiennymi na powierzchni fazy. W przypadku wydłużania ligandu i zapelniania porów, centra jonowymienne znajdują się na całej długości ligandów powodując migrację jonów pomiędzy ligandami w stronę powierzchni nośnika. Proces ten w znaczny sposób zwiększa parametry retencyjne. Tak więc do celów analitycznych wystarczają materiały o 3 warstwach dendrymeru, umożliwiające dobre parametry selektywności przy krótkim czasie analizy [H10].

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego



Rysunek 5. Struktury dendrymerowych faz stacjonarnych: A-na nośniku krzemionkowym, B-na nośniku polimerowym.

Porównując fazy na nośniku krzemionkowym z analogicznymi materiałami na bazie polimeru, znacznie lepsze parametry analityczne (sprawność, symetria pików) uzyskano na fazach krzemionkowych. Jest to wynikiem lepszych parametrów geometrycznych nośnika krzemionkowego, zapewniającego znacznie lepsze sprawności. Umożliwiają one rozdzielanie 9 anionów nieorganicznych w czasie 20 minut [H10].

Dendrymerowe fazy anionowymienne zostały również zastosowane do analizy monofosforanów nukleotydów [H10]. Retencja i rozdzielczość monofosforanów nukleotydów rosła wraz ze wzrostem liczby warstw dendrymeru (od 1 do 4 warstw). W przypadku anionów nieorganicznych, do rozdzielania fluorków, chlorków, bromków, azotanów(III) i azotanów(V) potrzebna była faza stacjonarna z dwoma warstwami dendrymeru. W celu rozdzielania 4 monofosforanów nukleotydów wystarczająca okazała się faza z jedną związaną warstwą. Podane przykłady nie wykluczają aplikacji, dla których wymagana będzie większa liczba warstw dendrymeru, którą można w prosty sposób uzyskać opracowaną metodą.

W celu pełnej charakterystyki otrzymanych faz stacjonarnych do chromatografii jonowej zarówno na nośniku polimerowym, jak i krzemionkowym zastosowałem nowatorską metodę pomiaru potencjału zeta z wykorzystaniem urządzenia Zetasizer [H9]. Potencjał zeta jest wartością charakterystyczną dla powierzchni będącej w kontakcie z roztworem. W poniższych rozważaniach dla uproszczenia podawany jest termin „potencjał zeta fazy stacjonarnej”. Zgodnie z oczekiwaniami, chemicznie związane fazy stacjonarne obdarzone trwałym ładunkiem dodatnim wykazały dodatnie wartości potencjału zeta, podczas gdy nośniki (polimerowy i krzemionkowy) wykazywały ujemne wartości potencjału zeta. Zaobserwowałem również wzrost wartości potencjału zeta wraz ze wzrostem liczby warstw dendrymeru, co jest efektem większej ilości trwałych ładunków dodatnich w strukturze związanych ligandów. Wzrost ten nie jest jednak liniowy. Potencjały zeta dendrymerowych faz anionowymiennych zmieniały się również wraz ze zmianą eluentu (rosły w kolejności: NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃). Dodać należy, że w przypadku faz otrzymanych na nośniku krzemionkowym nie można stosować faz ruchomych o alkalicznym pH, stąd pewne ograniczenia zarówno dla pomiarów potencjałów zeta, jak i dla zastosowania analitycznego otrzymanych materiałów. Nie zmienia to jednak faktu, że dla faz na nośniku krzemionkowym

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

można zastosować szereg faz ruchomych umożliwiających rozdzielanie anionów nieorganicznych [H10].

Pomiar potencjału zeta faz jonowymiennych wydaje się być kluczowym parametrem ich charakterystyki. Mierzona wartość potencjału na granicy faza stacjonarna – roztwór wydaje się być siłą przyciągającą jony z roztworu. Ponadto, rozkład potencjału zeta daje dodatkową wiedzę na temat homogeniczności ziaren chemicznie modyfikowanej fazy stacjonarnej [H9]. Pomiar potencjału zeta może być również zastosowany dla faz stacjonarnych nie posiadających trwałych ładunków w strukturze związanych ligandów.

Opis właściwości powierzchniowych faz stacjonarnych z wbudowanymi grupami polarnymi poprzez pomiar potencjału zeta na granicy faza stacjonarna- faza ruchoma

Pomiar potencjału zeta zastosowany do charakterystyki powierzchniowej chemicznie związanych faz stacjonarnych pozwala na uzyskanie informacji, które nie są dostępne dla innych technik [59-62]. Powyżej opisano zastosowanie pomiaru potencjału zeta do charakteryzowania faz do chromatografii jonowej [H9]. Możliwe jest również zastosowanie tej techniki do charakteryzowania typowych faz stacjonarnych dla normalnego i odwróconego układu faz [14]. W badaniach związanych z rozprawą habilitacyjną podjąłem badania potencjałów zeta chemicznie związanych faz stacjonarnych zawierających w swej strukturze polarne grupy funkcyjne [H11]. Pośród testowanej grupy chemicznie związanych faz stacjonarnych znajdowały się fazy alkilowe, fenyłowe, fazy z wiązaniem amidowym, fosforoamidowym oraz fazy aminowe. Pomiar potencjału zeta z wykorzystaniem urządzenia Zetasizer podzielił testowane materiały na fazy z dodatnim i ujemnym potencjałem zeta. Większość faz stacjonarnych wykazuje ujemne wartości potencjału zeta, co jest związane z obecnością neutralnych ligandów i ujemnych ładunków na powierzchni krzemionki w wyniku jonizacji grup silanolowych. Dodatnie wartości potencjałów zeta wykazały fazy aminowe i fazy posiadające resztkowe grupy aminowe nie zmodyfikowane na etapie syntezy. Zwrócić należy uwagę, że pomiary wykonywane były w rozpuszczalnikach organicznych i ich mieszaninach z wodą. Zatem przeprowadzone badania wykazują, że grupy aminowe w strukturze chemicznie związanych faz stacjonarnych w RP HPLC mają przyłączony proton w czasie analiz chromatograficznych i mogą oddziaływać jak słabe wymiennicze jonowe, modyfikując mechanizm retencji wielu analitów. Porównując wpływ modyfikatorów organicznych faz ruchomych na potencjał zeta można zauważyć, że w środowisku metanolu obserwuje się wyższe (bardziej dodatnie) wartości potencjału zeta, a w przypadku zastosowania acetonitrylu wartości te są niższe (bardziej ujemne) [H11].

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Opis procesów solwatacyjnych, będący podstawą mechanizmu retencji w układzie chromatografii ciekowej, jak również punktem wyjściowym do syntezy i charakterystyki materiałów zawierających grupy funkcyjne o zróżnicowanej polarności

W czasie realizacji rozprawy habilitacyjnej przeprowadziłem również nowe badania powiązane z tematyką procesów solwatacyjnych w układzie odwróconych faz chromatografii ciekowej, które były problemem poruszonym w mojej rozprawie doktorskiej. Nowa część badań, w przeciwieństwie do rozprawy doktorskiej, ukierunkowana była na chromatografię oddziaływań hydrofilowych (HILIC). Przeprowadziłem pomiary adsorpcji wody z roztworu acetonitrylu, ponieważ wiadomym było, że proces ten pełni istotną rolę w mechanizmie retencji. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdziłem, że na fazach stacjonarnych stosowanych w układzie HILIC tworzy się warstwa zaadsorbowanej wody, a retencja analitów odbywa się na zasadzie podziału substancji między fazę ruchomą, a warstwę zaadsorbowanej wody. Jako pierwszy w literaturze światowej przedstawiłem korelację pomiędzy ilością zaadsorbowanej wody na powierzchni fazy stacjonarnej, a retencją analitu [H13]. Opracowana metoda pomiaru adsorpcji wody z roztworu acetonitrylu posłużyła również do opracowania testu przydatności fazy stacjonarnej dla układu HILIC.

Opracowaną metodę zastosowałem również do charakterystyki chemicznie związanych faz stacjonarnych, w których grupy silanolowe zostały zastąpione wiązaniem krzem-wodór (Si-H). Materiały syntezowane w ten sposób również mogą być stosowane w układzie HILIC [H14]. Do pełnej charakterystyki nowych materiałów chromatograficznych wykorzystałem również mikrokalorymetryczne pomiary ciepła adsorpcji rozpuszczalników, na podstawie których można obliczyć ilość centrów na powierzchni fazy stacjonarnej, które są zdolne do tworzenia wiązań wodorowych [9]. Przeprowadzone badania dowiodły, że pomiar procesów solwatacyjnych, zarówno poprzez wyznaczenie izoterm adsorpcji jak i mikrokalorymetryczne pomiary ciepła zwilżania są bardzo dobrymi metodami do charakteryzowania powierzchni chemicznie związanych faz stacjonarnych w układzie HILIC [H13, H14].

Ukoronowaniem przeprowadzonych przez mnie badań i studiów literaturowych stała się praca przeglądowa dotycząca procesów solwatacyjnych i powiązanych z nimi tzw. „solvent pików”. Praca ta została opublikowana w czasopiśmie *Chemical Reviews*, którego współczynnik *Impact Factor* przekracza 41 [H12]. W pracy przedstawiłem zastosowanie „solvent pików” do pomiaru procesów solwatacyjnych w układzie chromatografii ciekowej. Zastosowanie ich czasów retencji do wyznaczenia izoterm adsorpcji rozpuszczalników umożliwia pełniejszą charakteryzację powierzchni chemicznie związanych faz stacjonarnych. Dokładne poznanie procesów solwatacyjnych umożliwiło syntezę nowych materiałów chromatograficznych o określonych właściwościach powierzchniowych.

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Elementy nowości, wkład do dyscypliny i podsumowanie osiągnięcia naukowego

Rezultaty uzyskane w cyklu szesnastu monotematycznych prac pozwalają na następujące podsumowanie mojego osiągnięcia naukowego:

1. Opracowałem metody syntezy nowych faz stacjonarnych do chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz i chromatografii oddziaływań hydrofilowych (fazy *N,O*-dialkilo fosforoamidowe, fazy estrowe i fosfoestrowe, a także faza cholesterolowa o zwiększonej gęstości pokrycia) o specyficznych właściwościach powierzchniowych. Równocześnie wykonałem pełną charakterystykę instrumentalną i chromatograficzną otrzymanych nowych faz stacjonarnych. Materiały takie nie były wcześniej prezentowane w literaturze.
2. Opracowałem oryginalne materiały chromatograficzne, których właściwości powierzchniowe umożliwiają ich zastosowanie zarówno w odwróconym układzie faz do rozdzielania substancji hydrofobowych, jak i w układzie HILIC do rozdzielania substancji polarnych. Niektóre z opracowanych materiałów można zastosować do rozdzielania substancji polarnych stosując czystą wodę jako fazę ruchomą.
3. Opracowałem metody syntezy dendrymerowych faz stacjonarnych do chromatografii jonowej na nośniku krzemionkowym i wykonałem ich charakterystykę z zastosowaniem pomiaru potencjałów zeta. Było to pierwsze w literaturze zastosowanie pomiaru potencjału zeta do charakterystyki faz stacjonarnych stosowanych w chromatografii jonowej.
4. Dokonałem kompleksowego i systematycznego badania wpływu polarnych grup funkcyjnych wbudowanych w hydrofobowy łańcuch faz stacjonarnych na mechanizm retencji i selektywność rozdzielania różnych grup analitów w odwróconym układzie faz i chromatografii oddziaływań hydrofilowych.
5. Przeprowadziłem kompleksowe i systematyczne badania nad rozdzielaniem hormonów sterydowych z zastosowaniem cholesterolowych faz stacjonarnych cechujących się specyficznymi właściwościami powierzchniowymi wykazując przewagę materiałów cholesterolowych pod względem selektywności rozdzielania, m. in. izomerów α i β estradiolu.
6. Wykazałem chromatograficzne podobieństwo fazy *N,O*-dialkilo fosforoamidowej do komercyjnej fazy IAM imitującej błonę biologiczną oraz możliwość zastosowania *N,O*-dialkilo fosforoamidowej fazy stacjonarnej do modelowania oddziaływań substancji z błoną biologiczną zamiast fazy IAM.
7. Opracowałem metodę pomiaru adsorpcji wody z roztworu acetonitrylu na chemicznie związanych fazach stacjonarnych w układzie HILIC w celu opisu właściwości powierzchniowych faz stacjonarnych. Na podstawie tej metody jako pierwszy wykazałem liniową zależność retencji w układzie HILIC od ilości zaadsorbowanej wody na powierzchni fazy stacjonarnej.
8. Opracowałem metodę pomiaru potencjału zeta jako metodę charakterystyki chemicznie związanych faz stacjonarnych do chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz i w chromatografii jonowej.

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Zakończenie

Realizacja powyższych badań była możliwa dzięki uzyskiwaniu odpowiednich środków finansowych. Zasadnicza część badań była finansowana z projektów: Iuventus Plus nr IP2010 003470 na latach 2010-2011, Grant NCN Sonata nr. 2013/09/D/ST4/03807 na lata 2014-2017; Grant WCh UMK 438-Ch na rok 2011 i Grant WCh UMK 1491-Ch na rok 2013. Dalsze badania wykonywane są w ramach realizowanego grantu Sonata i nowego projektu Iuventus Plus nr IP2014 003673 na lata 2015-2017. W każdym z wyżej wymienionych grantów pełniłem funkcję kierownika.

Za prowadzone badania naukowe w latach 2011-2013 regularnie uzyskiwałem nagrody zespołowe JM Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowo – badawczej. Natomiast w 2012 roku zostałem wyróżniony Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców.

W latach 2010-2012 brałem także udział w badaniach między innymi z zakresu badań adsorpcyjnych resztkowych grup silanolowych na powierzchni faz stacjonarnych [9, 63], termodynamicznych aspektów związanych z adsorpcją rozpuszczalników na powierzchni chemicznie związanych faz stacjonarnych [64] oraz problemów analitycznych związanych z oznaczaniem białek i fosfolipidów w układzie chromatografii cieczowej [45, 65]. Wyniki tych badań były regularnie publikowane w czasopismach o zasięgu ogólnonaukowym.

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Literatura:

- [1] Bocian, S., Felinger, A., Buszewski, B., *Chromatographia* 2008, 68, S19-S26.
- [2] Buszewski, B., Bocian, S., Felinger, A., *J. Chromatogr. A* 2008, 1191, 72-77.
- [3] Jandera, P., Bocian, S., Molíková, M., Buszewski, B., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 237-248.
- [4] Buszewski, B., *Preparation, Properties and Application of Chemically Bonded Phases in Chromatographic Analysis, D.Sc. Thesis, Slovak Technical University, Bratislava* 1992.
- [5] Buszewski, B., *Optimization of perkins and columns for HPLC, PhD Thesis, Slovak Technical University, Bratislava (1986)*.
- [6] Bocian, S., Vajda, P., Felinger, A., Buszewski, B., *Anal. Chem.* 2009, 81, 6334-6346.
- [7] Buszewski, B., Bocian, S., Zera, R., *Adsorption* 2010, 16, 437-445.
- [8] Bocian, S., Vajda, P., Felinger, A., Buszewski, B., *Chromatographia* 2010, 71, S5-S11.
- [9] Buszewski, B., Bocian, S., Rychlicki, G., Matyska, M., Pesek, J., *J. Chromatogr. A* 2012, 1232, 43-46.
- [10] Bocian, S., Vajda, P., Felinger, A., Buszewski, B., *J. Chromatogr. A* 2008, 1204, 35-41.
- [11] Buszewski, B., Bocian, S., Rychlicki, G., Vajda, P., Felinger, A., *J. Colloid Interf. Sci.* 2010, 349, 620-625.
- [12] Buszewski, B., Bocian, S., Rychlicki, G., *J. Sep. Sci.* 2011, 34, 773-779
- [13] Buszewski, B., Bocian, S., Nowaczyk, A., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 2060-2068.
- [14] Buszewski, B., Bocian, S., Dziubakiewicz, E., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 1529-1537.
- [15] Vajda, P., Bocian, S., Buszewski, B., Felinger, A., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 3644-3654.
- [16] Vajda, P., Bocian, S., Buszewski, B., Felinger, A., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 1954-1965.
- [17] Bocian, S., Buszewski, B., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 3033-3042.
- [18] Bocian, S., Matyska, M. T., Pesek, J. J., Buszewski, B., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 6891-6897.
- [19] Buszewski, B., Bocian, S., Matyska, M. T., Pesek, J. J., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 441-448.
- [20] Jaćkowska, M., Bocian, S., Kosobucki, P., Buszewski, B., *Chromatographia* 2010, 72, 611-616.
- [21] Buszewski, B., Jaćkowska, M., Bocian, S., Kosobucki, P., Gawdzik, B., *J. Sep. Sci.* 2011, 34, 601-608.
- [22] Unger, K. K., *Porous Silica*, Elsevier, Amsterdam 1979.
- [23] Neue, U. D., *HPLC Columns. Theory, technology and practice*, Wiley-VCH, New York 1997.
- [24] Buszewski, B., Krupczyńska, K., Gadzała-Kopciuch, R. M., Rychlicki, G., Kaliszan, R., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 313-321.
- [25] Jaroniec, M., *J. Chromatogr. A* 1993, 656, 37-50.
- [26] Alpert, A. J., *J. Chromatogr.*, 1990, 449, 177-196.
- [27] Buszewski, B., Noga, S., *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 402, 231-247.
- [28] Płotka, J., Tobiszewski, M., Sulej, A. M., Kupska, M., *et al.*, *J. Chromatogr. A* 2013, 1370, 1-20.
- [29] Sandra, P., Sandra, K., Pereira, A., Vanhoenacker, G., David, F., *LC-GC Eur.* 2010, 23, 242-259.
- [30] Hartonen, K., Riekkola, M.-L., *TRAC-Trend. Anal. Chem.* 2008, 27, 1-14.
- [31] Hu, W., Hasebe, K., Reynolds, D. M., Haraguchi, H., *Anal. Chim. Acta* 1997, 353, 143-149.
- [32] Layne, J., *J Chromatogr A* 2002, 957, 149-164.
- [33] Buszewski, B., Schmid, J., Albert, K., Bayer, E., *J. Chromatogr.* 1991, 552, 415-427.

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

- [34] Buszewski, B., Jezierska-Świtłała, M., Kowalska, S., *J. Chromatogr. B* 2003, 792, 279-286.
- [35] Nawrocki, J., *J. Chromatogr. A* 1997, 779, 29-71.
- [36] Nawrocki, J., Buszewski, B., *J. Chromatogr.* 1988, 449, 1-25.
- [37] Buszewski, B., Jezierska, M., Wełniak, M., Kaliszan, R., *J. Chromatogr. A* 1999, 845, 433-445.
- [38] Buszewski, B., Jezierska, M., Ostrowska-Gumkowska, B., *Mater. Chem. Phys.* 2001, 72, 30-41.
- [39] Taillardat-Bertschinger, A., Carrupt, P.-A., Barbato, F., Testa, B., *J. Med. Chem.* 2003, 46, 655-665.
- [40] Ong, S., Cai, S., Bernal, C., Rhee, D., *et al.*, *Anal. Chem.* 1994, 66, 782-792.
- [41] Ong, S., Liu, H., Qiu, X., Bhat, G., Pidgeon, C., *Anal. Chem.* 1995, 67, 755-762.
- [42] De Vrieze, M., Verzele, D., Szucs, R., Sandra, P., Lynen, F., *Anal. Bioanal. Chem.* 2014, 406, 6179-6188.
- [43] Kaliszan, R., Kaliszan, A., Wainer, I. W., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1993, 11, 505-511.
- [44] Barbato, F., di Martino, G., Grumetto, L., La Rotonda, M. I., *Eur. J. Pharm. Sci.* 2004, 22, 261-269.
- [45] Walczak, J., Bocian, S., Buszewski, B., *Food Anal. Methods* 2015, 8, 661-667.
- [46] Gadzała-Kopciuch, R., Buszewski, B., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 1273-1283.
- [47] Gadzała-Kopciuch, R. M., Kluska, M., Wełniak, M., Kroszczyński, W., Buszewski, B., *Polish J. Environ. Studies* 1999, 8, 383-387.
- [48] Chan, F., Yeung, L. S., LoBrutto, R., Kazakevich, Y. V., *J. Chromatogr. A* 2005, 1069, 217-224.
- [49] Horak, J., Maier, N. M., Lindner, W., *J Chromatogr A.* 2004, 1045, 43-58.
- [50] Kimata, K., Hosoya, K., Kuroki, H., Tanaka, N., *et al.*, *J Chromatogr A.* 1997, 786, 237-248.
- [51] Buszewski, B., Suprynowicz, Z., Lodkowski, R., Nasuto, R., Szymańska, K., *Chem. Anal. (Warsaw)* 1983, 28, 731-737.
- [52] Pesek, J. J., Matyska, M. T., Dawson, G. B., Wilsdorf, A., *et al.*, *J. Chromatogr. A* 2003, 986, 253-262.
- [53] Courtois, C., Allais, C., Constantieux, T., Rodriguez, J., *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 392, 1345-1354.
- [54] Kubań, P., Dasgupta, P. K., Pohl, C., *Anal. Chem.* 2007, 79, 5462-5467.
- [55] Pohl, C., Saini, C., *J. Chromatogr. A* 2008, 1213, 37-44.
- [56] Smith, M. B., March, J., *Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure*, Wiley-Interscience Publication, New York 2001.
- [57] Jaćkowska, M., Bocian, S., Gawdzik, B., Grochowicz, M., Buszewski, B., *Matter. Chem. Phys.* 2011, 130, 644-650.
- [58] Jaćkowska, M., Bocian, S., Buszewski, B., *Analyst* 2012, 137, 4610-4617.
- [59] Stern, O., *Z. Elektrochem.* 1924, 30, 508-514.
- [60] Shaw, D. J., *Electrophoresis, Academic Press, London, 1969.*
- [61] Foret, F., Bocek, P., *Adv. Electrophoresis* 1990, 3, 272.
- [62] Salomon, K., Burgi, D. S., Helmer, J. C., *J. Chromatogr.* 1991, 559, 69-80.
- [63] Bocian, S., Buszewski, B., *J. Sep. Sci.* 2012, 35, 1191-1200.
- [64] Bocian, S., Soukup, J., Jandera, P., Buszewski, B., *Chromatographia* 2015, 78, 21-30.
- [65] Pomastowski, P., Walczak, J., Gawin, M., Bocian, S., *et al.*, *Anal. Method.* 2014, 6, 5236-5244.

Brymon Bocian