

Válasz doktori (Ph.D.) értekezés bírálata

szerző:
Lukács Diána

Dolgozat címe:
Komplex egyensúlyi és hatékonysági paraméterek vizsgálata az ion- és folyadékkromatográfiában

Bíráló:
Nagyné Dr. Szabó Andrea

Tisztelettel köszönöm Nagyné Dr. Szabó Andrea, egyetemi docens (Széchenyi István Egyetem) aprólékos és lelkiismeretes opponensi munkáját, beleértve előbírálóként tett kritikus észrevételeit, melyek jelentős segítséget nyújtottak a kézirat véglegesítésében, és számottevő mértékben hozzájárultak annak végső minőségéhez.

A bírálóban megfogalmazott kérdésekre az alábbi válaszokat kívánom adni.

1. Az ionkromatográfiás elválasztások mellett kiegészítő ICP-OES mérésekre is sor került. A Jelölt az értekezés későbbi részében (a 3.3.2. fejezetben) bemutatja az ICP-OES technikával kapott mérési eredményeit. Szembetűnő ugyanakkor, hogy a kísérleti részben magáról az eljárásról csupán rövid utalást találunk. Kérem a Jelöltet, hogy a bírálatra adott válaszában röviden ismertesse a vizsgálati eljárás főbb jellemzőit.

Az ICP spektroszkópiás módszer alkalmazása esetünkben csak a kromatográfiás fejlesztés Gd-koncentrációinak ellenőrzése célját szolgálták. Az anioncsere-kromatográfiás módszerrel szelektíven elválasztott és detektált, gadolínium-kelátokként, $[\text{GdDTPA}]^{2-}$ illetve $[\text{GdEDTA}]^{-}$ komplex anionként azonosított kromatográfiás csúcsok Gd(III) tartalmának igazolása történt az említett ICP-OES technikával.

Az anioncsere-kromatográfiás szeparációt 1,2 mL/min térfogatáramú, pH = 10,2 kémhatású, 3,5 mM összkoncentrációjú nátrium-karbonát/nátrium-hidrogén-karbonát puffereluens alkalmazása mellett végeztem. Az elválasztott komponenseket a szupresszálist megelőzően, közvetlenül az oszlopról távozó effluensből, „heart-cutting” típusú, manuális frakciószedéssel gyűjtöttem. A frakciógyűjtési időablak $[\text{GdDTPA}]^{2-}$ esetén 3,0 – 4,0 min, míg $[\text{GdEDTA}]^{-}$ komplex esetén 16,0 – 21,0 min volt.

A frakciók ezt követően kerültek spektrometriás elemanalízisre, melynek során egy Spectroflame Modula E típusú ICP-OES készüléken, Smart Analyzer szoftver (SPECTRO Analytical Instruments Inc., Germany) használata mellett, 303,284 nm hullámhosszon, axiális végablakos megfigyelési módban megtörtént a minták Gd(III) tartalmának igazolása és pontos koncentrációjának meghatározása. Az injektált koncentrációkat, valamint az elválasztás és a frakciógyűjtés során bekövetkező hígulásokat figyelembe véve számított frakcióbeli koncentrációkat az ICP technika $[\text{GdDTPA}]^{2-}$ csúcs esetén 86,5 %, míg $[\text{GdEDTA}]^{-}$ csúcs esetén 99,2 %-ban igazolta.

2. Kiemelte, hogy a szemcseméret eloszlás hatásával kapcsolatban született eredmények a folyadékkromatográfiás oszloptöltetek fejlesztési irányainak kijelölésére vonatkozóan szolgáltatnak hasznos információt, míg a kolonnák nyomásesésének elválasztási hatékonyságra gyakorolt hatására vonatkozó eredmények a HPLC–UHPLC módszertranszferek során nyújtanak segítséget a retenciós viselkedés, elsősorban nagyméretű molekuláknál jelentkező változásának értelmezésében. Kérem a Jelöltet, hogy röviden foglalja össze a fejlesztési irányokra vonatkozó elképzeléseit, javaslatait a vizsgálati eredményeinek tükrében.

Számításaim alapján, nagyméretű molekulák folyadékkromatográfiás elválasztása során célszerű a minél kisebb nyomásesés biztosítása, mely leginkább a töltet szemcseátmérőjének növelésével érhető el. A fehérjeanalitika napjainkban egyre inkább a nagyobb, 5 µm-es fázisok használatának irányába mozdul el, mely igazolja kutatási eredményeim helytállóságát. Véleményem szerint óriásmolekulák elválasztásában megfontolandó az 5 µm feletti, akár 10 µm szemcseátmérővel rendelkező töltetek tesztelése is.

A tömörmagvú fázisok használatát – szemcseátmérőtől függetlenül – határozottan előnyösebbnek tartom, mint a teljesen porózus töltetek alkalmazását. A core-shell típusú fázisokra jellemző rövidebb diffúziós úthosszak mellett az elméleti úton általam is igazolt kisebb szemcseméret eloszlás (PSD = particle size distribution) értékek révén ezen fázisok hatékonysága kimagasló. Számításaim alapján a tömörmagvú töltetek előnyös tulajdonságai leginkább a nagyméretű molekulák (> 10 kDa) elválasztása során érvényesülnek.

Porózus töltetek esetében a PSD csökkentését, különösen a kisebb szemcseátmérőjű töltetek esetében egy további fejlesztési iránynak találom, míg a tömörmagvú fázisok hatékonyságának növelésére ezen az úton már kevesebb lehetőséget látok.

3. A kutatási eredmények igazolják, hogy a csatolt technikák mellett az egyszerűbb műszer és kevésbé terhelő vegyszerigényű ionkromatográfia is alkalmas lehet a különböző Gd(III)-speciesszek minőségi és mennyiségi meghatározására, míg a kidolgozott retenciós modell mintamátrix-specifikus módszerek kidolgozásához nyújthat segítséget. A Jelölt az értekezés célkitűzés részében felsorolja a szóba jövő csatolt technikákat. Kérem, hogy egy összehasonlító elemzés keretében ismertesse az újonnan kidolgozott ionkromatográfiás eljárásnak a csatolt technikához viszonyított előnyeit, sajátosságait.

Az elterjedten alkalmazott folyadékkromatográfiás technikák, melyek alatt fordított fázisú (RP-HPLC) illetve hidrofil interakciós (HILIC) folyadékkromatográfiás módszerek értendők, nagy mennyiségű, analitikai tisztaságú szerves oldószerek használatát igénylik, így alkalmazásuk jelentős költséget és környezeti terhelést jelent. Előbbiek mellett gyakori probléma a vizsgálandó molekulák magas szerves oldószertartalmú mozgófázisban való oldhatósága. Fordított fázisú folyadékkromatográfiával a poláris és ionos komponensek meghatározása nem vagy csak igen körülményesen végezhető el, míg a HILIC módszerek egyre nagyobb teret nyernek az említett analitsoportok vizsgálatában. Mind RP-HPLC, mind HILIC módszerek esetében további feladatot és költséget jelent a mozgófázis pufferálása, melynek reprodukálhatóságát illetően megoszlik a szakemberek véleménye. Csatolt technikák (pl.: ESI-MS, ICP-OES, ICP-MS) esetében, előbbieken felül további műszer illetve ahhoz kapcsolódó vegyszerigény (pl.: vivőgáz, porlasztógáz, belső standard stb.) és egyéb költségek merülnek fel.

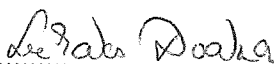
Az ionkromatográfiában alkalmazott mozgófázisok jellemzően híg szervesen savak vagy bázisok, melyek beszerzése kevésbé költséges, használatuk pedig kisebb egészségügyi kockázattal és környezeti terheléssel jár, összevetve a szerves oldószerekkel. A vizsgálandó komponensekkel kapcsolatban, tekintettel a túlnyomóan víz alapú mozgófázisokra, oldhatósági problémák kevésbé jellemzőek, továbbá nincs szükség külön pufferálásra, hiszen az alkalmazott eluens már önmagában biztosítja az elválasztáshoz szükséges kémhatást. A poláris és ionos komponensek vizsgálata ioncsere-kromatográfiás körülmények között könnyen, jól reprodukálható módon, érzékenyen, a szervesen és szerves ionok szimultán történő meghatározásának lehetőségével végezhető el.

Az ioncsere-kromatográfia tekintetében az állófázisok ára, amely kevésbé vonzó tulajdonság, ugyanis ezen oszlopok jellemzően nagyobb költséget jelentenek összehasonlítva a HPLC oszlopokkal. Az említett rendszerek további, számottevő költséget jelentő, viszont több előnyös funkcióval rendelkező része az ún. szupresszor, amely a detektálás érzékenységének jelentős növeléséhez az oszlopból kilépő mozgófázist vízzé alakítja, így egyben alkalmas a kezelendő hulladék mennyiségének csökkentésére is. Ma már léteznek ún. Reagent-Free IC készülékek (Thermo Fisher Scientific, US), amelyekben a szupresszálást zárt rendszerben alkalmazva, trap és tisztító kolonnák segítségével biztosítható a mozgófázis regenerálása és újrafelhasználása. Ezen készülékeknél az eluens oldatok készítésére, a rendszer újrakalibrálására és ekvibrálására fordítandó idő jelentősen lecsökken, mely különösen rutinanalitikai szempontból igen kedvező tulajdonság. Az RI-IC rendszerek fő alkalmazási területe a kis vagy közepes mátrixterhelésű (pl.: ivóvíz, talajvíz, felszíni víz) minták anion vagy kation összetételének meghatározása, karbonát vagy metánszulfonsav eluensek izokratikus elúciós módban való alkalmazása mellett.

Az ionkromatográfiás módszerek önmagukban nyilvánvalóan nem mindig érik el a csatolt technikák érzékenységét, kimutatói határát, de megfelelő mintaelőkészítés mellett megközelítik azt. Előbbieken túl a Gd(III) és egyes specieszeinek (pl.: Gd(III)-kelátok vagy egyéb fémkomplexek) vizsgálata mellett, külön műszerigény nélkül biztosítják szervesen és szerves mátrixanionok szimultán azonosítását, mennyiségi meghatározását.

Végül, ismételten köszönöm Nagyné Dr. Szabó Andrea opponensi munkáját, akitől tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Veszprém, 2019. szeptember 27.


.....
Lukács Diána