



Retenciós folyamatok vizsgálata lineáris és nemlineáris folyadékkromatográfiában

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Készítette
Horváth Szabolcs
okleveles vegyész

Témavezető
Dr. Horváth Krisztián
egyetemi docens

Vegyészmérnöki és Anyagtudományok Doktori Iskola

Veszprém
2023

1. Bevezetés és célkitűzés

Analitikai és preparatív folyadékkromatográfiás elválasztások tervezéséhez, fejlesztéséhez és optimalásához nélkülözhetetlen az elválasztások elméletének megértése, az oszlopban lejátszódó fizikai és kémiai folyamatok alapos felderítése. A kromatográfiás csúcsok szélesedéséhez, torzulásához, és ezen keresztül az elválasztások hatékonyságának csökkenéséhez vezet többek között az elválasztás lassú kinetikája, az állófázis felületi heterogenitása, ill. a minta és az állófázis közötti kölcsönhatásokat leíró egyensúlyi izoterma alakja.

A kutatás célja az oszlopban lejátszódó fizikai és kémiai folyamatok vizsgálata lineáris- és nemlineáris folyadékkromatográfiában.

A munkám során célul tűztem ki a folyadékkromatográfia általános sebességi modelljének továbbfejlesztését kétrétegű, tömörmagvú állófázisok retenciós tulajdonságainak és hatékonyságának jellemzésére az oszlopban lejátszódó kinetikai és egyensúlyi folyamatok figyelembevételével, valamint a fejlesztett modell alkalmazását új típusú kromatográfiás töltetek tervezésének és alkalmazási lehetőségeinek vizsgálatára. Nagyméretű molekulák (például fehérjék) anyagátadási kinetikájának felgyorsítása szempontjából egy potenciális lehetőség egy második, nagy pórusátmérőjű héjjal rendelkező kétrétegű tömörmagvú szemcsékkel töltött oszlop alkalmazása.

Bár a frontális analízis az izotermák meghatározásának rendkívül pontos módszere, nagy mennyiségű mintát és oldószert igényel. Ezzel szemben az inverz módszer kis mintaigényű, de sikeres alkalmazásához szükséges az izoterma egyenlet ismerete, vagyis a módszer modell alapú. Ezért célom volt egy olyan, izoterma egyenlet mentes inverz módszer bemutatása, melynek segítségével adszorpcióis izotermák a frontális analízisével azonos pontossággal határozhatók meg, az inverz módszerek kis mintaigénye mellett.

Céлом volt továbbá gradiens tulajdonságokkal (szemcseméret, ioncsere kapacitás) rendelkező folyadékkromatográfiás oszloptöltetek elválasztási hatékonyságot növelő lehetőségeinek elméleti vizsgálata.

2. Kísérleti rész

Numerikus számításokhoz használt szoftverek

A numerikus számítások Python programnyelven (v. 3.6, Anaconda Python Distribution) készített szoftverrel készültek, a NumPy és SciPy csomagok felhasználásával.

Kétrétegű tömörmagvú állófázisok nagyméretű biomolekulák folyadékkromatográfiás elválasztási hatékonyságának vizsgálata elméleti megfontolások alapján

A kétrétegű szemcsék elválasztási hatékonyságát egy tipikus nagyméretű peptid (pl. inzulin: molekulatömeg, M , ~ 6 kDa, molekuláris diffúziós koeficiens, $D_m, \sim 6 \times 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{min}}$) esetére vizsgáltam. A numerikus számításokhoz szükséges paraméterek értékeit, mint az oszlop paraméterei, a szemcseméret, stb., az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat. A kétrétegű tömörmagvú állófázisok hatékonyságvizsgálata során alkalmazott numerikus paraméterek értékei

Paraméter	Érték
oszlophossz (L)	10 cm
oszlop átmérő (d_c)	0,3 cm
szemcse átmérő (d_p)	2,7 μm
külső porozitás (ε_e)	0,4
intersticiális mozgófázis sebesség (u_e)	5 $\frac{\text{cm}}{\text{min}}$

Szemcseméret gradienssel rendelkező folyadékkromatográfiás oszlopok hatékonyságának elméleti vizsgálata

A numerikus számításokhoz szükséges paraméterek értékeit, mint az oszlop paraméterei vagy a molekuláris paraméterek, a 2. táblázat foglalja össze. Fontos megjegyezni, hogy a retenció érzékenységi paraméter, S (a komponens retenciójának eluens összetétel megváltozására való érzékenysége mértéke), értéke meglehetősen nagy. Ezt a nagy értéket szándékosan választottam nagyméretű polimerek és fehérjék reprezentálása érdekében.

2. táblázat. A szemcseméret gradienssel rendelkező folyadékkromatográfiás oszlopok hatékonyságvizsgálata során alkalmazott numerikus paraméterek értékei

Paraméter	Érték
oszlophossz (L)	0,05 m
a Knox egyenlet paraméterei (A, B, C)	1; 1,5; 0,5
molekuláris diffúziós koefficiens (D_m)	10^{-8} m ² /s
az oszlop ellenállási tényezője (ϕ)	1000
lineáris mozgófázis sebesség (u_0)	0,0111 m/s
eluens viszkozitás (η)	10^{-3} Pa s
az erősebb eluens kezdeti móltörtje (φ_0)	0,05
az eluens összetétel megváltozása ($\Delta\varphi$)	0,7
retenciós tényező $\varphi = 0$ -ra (k_0)	10^4
retenciós érzékenység (S)	30
gradiens idő (t_G)	600 s

Adszorpció izotermák folyadékkromatográfiás meghatározása modell mentes inverz módszerrel

Eszközök és anyagok

A kísérletek Agilent 1100 Series folyadékkromatográf (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) segítségével történtek, amely tartalmazott egy gradiens pumpát, automata injektort, oszlop termosztátot, UV-vis detektort és egy HP Chemstation adatgyűjtő rendszert. A butil-benzoát (Sigma-Aldrich) sávprofiljainak felvétele 290 nm-en történt. A mérésekhez használt oszlop egy 50 mm $\times$ 2,1 mm Waters Cortecs C18 oszlop 5 μ m-os szemcséssel töltve. Eluensként metanol-víz 65:35 arányú elegyét használtam. Az eluens áramlási sebessége 0,2 ml/perc, az oszloptér hőmérséklete 30°C, a butil-benzoát minta koncentrációja 7,25 g/l volt.

Számítások

A kidolgozott, izoterma egyenlet mentes módszerben az izoterma deriváltját az egyes izoterma pontokra illesztett spline (szakaszosan parametrikus polinomokkal leírt görbe) deriváltja helyettesíti. A illesztéshez köbös spline-t használtam, amely esetén az egymást követő pontok harmadfokú polinomok-

kal vannak összekötve. A mért és számolt sávprofilok eltérés négyzetösszegének minimalizálása az egyes izoterma pontok pozíciójának optimalizálásával történt Nelder-Mead szimplex módszerrel [1]. Az izoterma pontok kezdeti értékének meghatározása a klasszikus inverz módszeren alapult, Langmuir izotermát feltételezve. Az izoterma pontok száma és eloszlása a mért sávprofil alakjától függ.

Statikus longitudinális ioncsere gradiens kromatográfia elmélete

A numerikus számításokhoz szükséges paraméterek értékeit, mint az oszlop paraméterei vagy a mozgófázis paraméterek, a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat. Az ioncsere-kapacitás gradienssel rendelkező folyadékkromatográfias oszlopok hatékonyságvizsgálata során alkalmazott numerikus paraméterek értékei

Paraméter	Érték
oszlophossz (L)	25 cm
mozgófázis sebesség (u)	25 cm/min
kezdeti eluens koncentráció ($[\text{OH}^-]_0$)	1 mM
az eluens koncentráció változásának sebessége (β)	10 mM/min

A számításokhoz használt modell ionokat és ioncsere szelektivitási koefficienseket [2] a 4 táblázat foglalja össze.

4. táblázat. A számításokhoz használt modell ionok és ioncsere szelektivitási koefficienseik

Anion	$K_{\text{A/OH}}$
klorid	1,51
nitrát	5,04
szulfát	29,05
fumarát	66,21

3. A tudományos eredmények összefoglalása

Tudományos munkám eredményeit az alábbi tézispontokban foglaltam össze:

1. Kétrétegű folyadékkromatográfiás állófázis szemcsék akkor biztosítanak nagyobb elválasztási hatékonyságot a hagyományos héjszerkezetű fázisokkal szemben, ha a külső réteg visszatartása, illetve pórus diffúziója nagyobb, mint a belső rétegé. Ily módon a kétrétegű szemcseszerkezet az oszlop hatékonyságát 15-20%-kal növelheti.
2. Gradiens elúciós módban negatív – azaz az oszlop vége felé haladva csökkenő – szemcseméret gradienssel rendelkező oszlopok az extra sávkompressziós hatásnak köszönhetően, a szemcseméret gradiens profiljától függően $\sim 1\text{-}4\%$ hatékonyságnövekedést mutatnak összehasonlítva azonos permeabilitású konstans szemcsemérettel rendelkező oszlopokkal. A határoló szemcseméreteket optimalizálva ez az előny tovább növelhető $\sim 5\text{-}8\%$ -ra.
3. Az izotermák meghatározására fejlesztett, izoterma egyenlet mentes inverz módszer, amelyben az izoterma egyenlet helyett az izoterma pontokra illesztett spline deriváltját használjuk a Martin-Synge algoritmus tömegmérleg egyenletében, a frontális analízisével összevethető pontossággal alkalmazható izotermák meghatározására.
4. Ioncsere kapacitás gradienst eluens koncentráció gradienssel kombinálva hatékonyságnövekedés érhető el az azonos analízis idejű konstans ioncsere kapacitással rendelkező oszlophoz képest. Ez a hatékonyságnövekedés az ionok retenciós idő különbségének növekedésén, valamint sáv szélességének csökkenésén keresztül nyilvánul meg.

4. A szerző tudományos munkássága

4.1. Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó publikációk

1. **Szabolcs Horváth**, Fabrice Gritti, Róbert Kormány, Krisztián Horváth: Theoretical analysis of efficiency of multi-layer core-shell stationary phases in the high performance liquid chromatography of large biomolecules, *Molecules*, 2019, 24 (15), 2849.
DOI:10.3390/molecules24152849
2. **Szabolcs Horváth**, Fabrice Gritti, Krisztián Horváth: Theoretical study of the efficiency of liquid chromatography columns with particle size gradient, *J. Chromatogr. A*, 2021, 1651, 462331.
DOI:10.1016/j.chroma.2021.462331
3. **Szabolcs Horváth**, Diána Lukács, Evelin Farsang, Krisztián Horváth: Study of efficiency of capacity-gradient ion exchange stationary phases, *Separations*, 2023, 10(1),
DOI:10.3390/separations10010014
4. **Szabolcs Horváth**, Diána Lukács, Evelin Farsang, , Krisztián Horváth: Unbiased Determination of Adsorption Isotherms by Inverse Method in Liquid Chromatography , *Molecules*, 2023, 28(3),
DOI:10.3390/molecules28031031

4.2. Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó konferencia előadások és poszterek

Nemzetközi konferencián bemutatott előadások és poszterek

1. **Szabolcs Horváth**, Fabrice Gritti, Krisztián Horváth: Effect of multi porous layer on the efficiency of core-shell particles, 24TH International

Symposium on Separation Sciences : ISSS (2018), 17-20 June 2018, Jasná, Slovakia

2. **Szabolcs Horváth**, Evelin Farsang, Krisztián Horváth : Theoretical study of the efficiency of HPLC columns with particle size gradient, 48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 16-20 June 2019, Milan, Italy
3. Krisztián Horváth, **Szabolcs Horváth** : Applicability and Efficiency of Gradient Stationary Phases in HPLC, 12th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 11-13 September 2019, Siófok, Hungary
4. Krisztián Horváth, **Szabolcs Horváth** : Design and Optimization of Capacity Gradient Stationary Phases, 33rd International Symposium on Chromatography: ISC 2022, 18-22 September 2022, Budapest, Hungary

4.3. Az értekezés tématerületét érintő publikációk

1. Krisztián Horváth, **Szabolcs Horváth**, Diána Lukács: Effect of axial temperature gradient on chromatographic efficiency under adiabatic conditions, J. Chromatogr. A, 2017, 1483, 80-85.
DOI:10.1016/j.chroma.2016.12.063

4.4. Az értekezés tématerületét érintő konferencia előadások és posztterek

Nemzetközi konferencián bemutatott előadások és posztterek

1. Evelin Farsang, **Szabolcs Horváth**, Krisztián Horváth: Study of retention behavior of bioactive macromolecules in ultrahigh pressure liquid chromatography, 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques: HPLC 2017, 18-22 June 2017, Prague, Czech Republic

2. Evelin Farsang, **Szabolcs Horváth**, Krisztián Horváth: The effect of axial temperature and pressure gradients on the separation efficiencies of macromolecules, 24th International Symposium on Separation Sciences : ISSS (2018), 17-20 June 2018, Jasná, Slovakia
3. Evelin Farsang, **Szabolcs Horváth**, Regina Törőcsik, Márton Szigeti, András Guttman, Krisztián Horváth: Development of HILIC Method for Liquid Chromatographic Separation of Maltodextrins with UV Detection, 9th International Symposium on the Separation and Characterization of Natural and Synthetic Macromolecules, 30 January-1 February 2019, Amsterdam, Netherlands
4. **Szabolcs Horváth**, Krisztián Horváth: Qualitative interpretation of retention behaviour of proteins under UHPLC condition, 12th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 11-13 September 2019, Siófok, Hungary

Hazai konferencián bemutatott előadások és poszterek

1. Horváth Krisztián, **Horváth Szabolcs**, Farsang Evelin, Surguta Miklós, Lukács Diána: Axiális hőmérséklet gradiens hatása kromatográfiás elválasztások hatékonyságára, Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2016, 2016 november 9-11, Kecskemét, Magyarország
2. **Horváth Szabolcs**, Törőcsik Regina, Szigeti Márton, Guttman András, Horváth Krisztián: HILIC módszer fejlesztése maltodextrinek folyadékkromatográfiás elválasztására UV detektálás alkalmazásával, Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2018, 2018 november 8-10, Tapolca, Magyarország

Hivatkozások

- [1] J. A. Nelder, R. Mead, A Simplex Method for Function Minimization, The Computer Journal 7 (1965) 308–313. doi:10.1093/comjnl/7.4.308.
- [2] K. Horváth, P. Hajós, Retention profiles and mechanism of anion separation on latex-based pellicular ion exchanger in ion chromatography, J. Chromatogr. A 1104 (1) (2006) 75 – 81. doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.064.