

Válaszaim Dr. Lambert Nándor egyetemi adjunktus opponensi véleményében megfogalmazott kérdéseire

Mindenek előtt szeretném megköszönni Dr. Lambert Nándor átfogó és alapos bírálatát. A bírálói kérdéseket félkövér kiemeléssel, a válaszamait normál fontokkal jelölöm.

1. A kétrétegű tömörmagvú állófázisok tervezésénél a Jelölt javasolja különböző felületborítottságú rétegek használatát az állófázis szemcsén belül. A Jelölt véleménye szerint ez befolyásolhatja-e a kromatográfiás csúcs alakját, szimmetriáját.

Amennyiben nem megfelelőképpen utószilanizált az állófázis, különböző mértékben borított felületek esetén eltérő csúcsalakokat lehet tapasztalni fordított fázisú kromatográfiában. A módosított szilikagél előállítás során a szilanol csoportok akár 40-60%-a is reagálatlan maradhat, így energetikailag inhomogén állófázis alakul ki. A felületen két eltérő tulajdonságú csoport van jelen. Egyrészt az alkil lánc, amely gyenge diszperziós kölcsönhatás kialakítására képes, másrészt a szilanol csoport, amely erős H-hidas kölcsönhatást tud kialakítani, valamint a mozgófázis pH-jától függően a szabad szilanol csoportok ionizálódnak, így ioncserés kölcsönhatás is létrejöhét. A csúcsszélesedés és -szimmetria szempontjából kedvezőtlen, ha a vizsgálandó molekula szempontjából az erősebb kölcsönhatási helyek vagy felületek aránya kicsi a kisebb kölcsönhatást kialakítókhoz képest. Ilyen esetekben a jelentősen megnövekedett zónaszélesedés és csúcs aszimmetria oka az, hogy az erős kölcsönhatási helyeket túlterheljük, a komponens nagyobbik része a gyenge kölcsönhatási hellyel lép kölcsönhatásba. A túlterhelés és a két szorpciós hely egyensúlyi állandója közötti nagy különbség széles kromatográfiás csúcsokat eredményez.

A nem reagált szilanol csoportok hatásának kiküszöbölésére utószilanizálási reakciókat alkalmaznak. Kétrétegű állófázisok esetén ennek különösen nagy jelentősége van.

2. Dolgozatában a Jelölt megemlíti, hogy a Phenomenex oszlopgyártó cég rendelkezik kétrétegű tömörmagvú szemcsékkel töltött oszloppal. Az ezen oszlopon mérhető hatékonyság mennyire egyezik a számítások során becsült hatékonysággal? A Jelölt tapasztalatai után a gyártó által készített töltet paraméterei mennyire közelítik meg az ideális paramétereket?

A dolgozatban bemutatott modell alapján kétrétegű tömörmagvú szemcsékkel töltött oszlop esetén a legnagyobb hatékonyságot akkor lehet elérni nagyméretű biomolekulák elválasztáskor, ha mindkét réteg esetén gyorsabb a pórusdiffúzió (10^{-5} cm²/min, 300 Å névleges pórusátmérő), a belső réteg pedig kisebb retencióval ($A_i=1,2$, $k=0,75$) rendelkezik, mint a külső ($A_o=3$, $k=2,45$). Elméletben az ilyen tulajdonságokkal rendelkező állófázisok alkalmazásakor léteznek olyan esetek, amikor hatékonyságuk meghaladja az egyrétegű fázisokét.

A Phenomenex oszlopgyártó cég által készített prototípus oszlop esetén a szemcsék belső rétegének pórusmérete 100 Å, a külső rétegé 300 Å. Ilyen paraméterekkel a modell alapján nem várható jobb hatékonyság összvetve az egyrétegű struktúrákkal, így kijelenthető, hogy a kétrétegű prototípus oszlop kialakítása nem volt ideális. Ezt alátámasztja az alábbi publikáció, melyben a különböző állófázis struktúrájú - köztük az említett prototípus - oszlopok hatékonyságát vizsgálták különböző méretű molekulák elválasztása esetén:

F. Gritti, et al., *How changing the particle structure can speed up protein mass transfer kinetics in liquid chromatography*, J. Chromatogr. A (2012), <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.030>

3. A Jelölt véleménye szerint a szemcseméret gradienssel rendelkező folyadékkromatográfiás oszlopok esetén, az oszlop mentén nem lineárisan változó nyomásesés befolyásolhatja-e a nagymolekulák retenciós viselkedését és csúcsszélesedését?

A folyadékkromatográfiás oszlopban nyomás – és hőmérsékletgradiens retenciós tulajdonságokra gyakorolt hatása jól ismert jelenség. Fehérjék esetében a retenciós tényező eltolódása a moláris térfogat nyomás okozta változásával magyarázható. Egy, a kutatócsoportunk keretében nemrégiben publikált közlemény (Journal of Chromatography A 1704 (2023) 464135, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464135>) alapján kijelenthető, hogy a statikus nyomságradiens izokratikus elválasztások esetén jelentősen csökkentheti az elválasztások hatékonyságát. A hatás fehérjék és UHPLC körülmények esetén különösen jelentős. Mivel a dolgozatomban a szemcseméret gradiens fázisokat mozgófázis gradienssel együtt javaslok alkalmazni, ezért várhatóan ilyen esetekben nem, vagy csak nagyon elhanyagolható mértékű a nyomásesés csúcsalakra gyakorolt hatása. Ugyanakkor a kérdés végleges tisztázása további vizsgálatokat igényel.

Fontos megjegyezni, hogy a fehérjék nagy nyomáson bekövetkező konformációváltozása is valószínűsíthető. Egy még publikálatlan tanulmányunkban, PhD időszakom alatt, fehérjék UHPLC körülmények közötti retenciós viselkedésének kvalitatív értelmezésére dolgoztunk ki egy modellt, amely figyelembe veszi a hőmérséklet- és nyomásgradiens hatását, valamint a fehérjék konformációs változását. Különböző fehérjék van't Hoff-görbéit ábrázolva különböző nyomásesések esetén a görbék nem lineáris alakja az oszlopban keletkező nyomáseséssel hozható összefüggésbe. A nem lineárisan változó nyomásesés hatásának figyelembevételéhez szükséges lenne a modell további kiegészítése.

4. Miből lehet következtetni arra, hogy a butil-benzoát adszorpciós energiaeoszlásának két maximumát a szabad szilanol és C18-as csoportok jelenléte okozza és nem a bi-BET izotermára jellemző többrétegű adszorpció, vagy a szerves oldószer felületi dúsulása?

A számításoknál lokális izotermaként eleve BET izotermát feltételeztem, emiatt nem várható, hogy a két adszorpciós csúcs megjelenése a többrétegű adszorpciónak lenne köszönhető. A szerves oldószer felületi dúsulásának hatását is kizárom, ugyanis az adszorpciós energiaeoszlás meghatározására alkalmazott módszer validálva lett különböző mértékben utószilanizált állófázisok esetén (K. Horváth, et al., *Multilayer adsorption in liquid chromatography – The surface heterogeneity below an adsorbed multilayer*, J. Chromatogr. A (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.05.020>). Teljesen utószilanizált fázis esetén csak egy, míg a részleges utószilanizálás esetén esetén több adszorpciós maximum figyelhető meg. Ebből arra lehet következtetni, hogy az adszorpciós maximumok száma az adszorpciós felület heterogenitásával hozható összefüggésbe, amit ebben az esetben a szilanol csoportok okoznak, amik nagyobb enegiajú kötőhelyek, mint az oktadecil csoport.

Veszprém, 2023.08.25.

Horváth Szabolcs

Horváth Szabolcs