

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

**Az állófázisok geometriai változatosságának hatása a
csúcsalakra folyadékkromatográfiában**

PhD értekezés tézisei

Sepsey Annamária

Témavezető:

Dr. Felsing Attila

egyetemi tanár



Pécs, 2016

1. Bevezetés

A kromatográfiában elválasztások során a minta alkotóelemei diszkrét zónákként válnak el egymástól, ezek a sávok azonban az oszlopon való vándorlás során egyre jobban kiszélesednek. Az elválasztás eredménye azon múlik, hogy az egyes összetevők sávjai elég keskenyek maradnak-e, hogy így elkerüljük azok átfedését. Ezáltal a kromatográfia egyik célja a csúcshélesedés minimalizálása. Ennek elérése érdekében szükséges a csúcsok kialakulásához és szélesedéséhez járó folyamatok mélyebb megértése.

A kromatográfiás elválasztások hatékonyságát döntően befolyásolják az oszlop és a mintamolekulák fizikai paraméterei, mint például a pórusméret és annak eloszlása, valamint a mintamolekulák mérete és méreteloszlása. A molekulák méretének pórusmérethez viszonyított arányáról ad tájékoztatást a méretkizárásos kromatográfia, mely lehetővé teszi, hogy tisztább képet kapjunk az eloszlások elválasztásra gyakorolt hatásairól. Az ideális méretkizárás során ugyanis nincs kölcsönhatás a mintamolekulák és az állófázis között, az elválasztást pusztán a molekulák és a pórusok méretének viszonya szabja meg. Ahhoz azonban, hogy figyelembe tudjuk venni az eloszlások csúcsalakra és elválasztásra gyakorolt hatásait, megfelelő modellre van szükségünk.

A kromatográfia sztochasztikus elmélete az elválasztási folyamatot molekuláris szinten írja le, így célszerűvé válik, hogy beépítsük abba a pórusméret-eloszlást és a molekulaméret-eloszlást. Ezáltal egy valósághoz közelebbi képet kaphatunk az elválasztásokról.

2. Célok

Munkánk főbb céljai a következők voltak:

- a pórusméret-eloszlás beépítése a kromatográfia sztochasztikus elméletébe, a karakterisztikus függvény felírása és a kromatográfiás csúcsok statisztikai momentumainak meghatározása;
- különböző pórusalakok feltételezése mellett az eloszlás paramétereinek az elválasztásra és a csúcsalakra gyakorolt hatásainak vizsgálata;
- a pórusszerkezet (pórusméret-eloszlás és pórusalak) meghatározása az új modell segítségével kereskedelmi forgalomban kapható tömörmagvú, valamint teljesen porózus állófázissal töltött kromatográfiás oszlopok esetén;
- első és második generációs szilikagél-alapú monolit állófázisok pórusszerkezet-beli különbségének vizsgálata az új modell segítségével;
- a molekulaméret-eloszlás beépítése a kromatográfia sztochasztikus elméletébe, a karakterisztikus függvény felírása és a kromatográfiás csúcsok statisztikai momentumainak meghatározása az elválasztásra gyakorolt hatás vizsgálata céljából.

3. Kísérleti körülmények és alkalmazott módszerek

Az eloszlásokat tartalmazó új modellek fejlesztéséhez minden számolást és levezetést Mathematica 9 (Wolfram Research) programcsomaggal készítettünk. A csúcsok számítását numerikus inverz Fourier transzformációval végeztük 1024 pontból. A levezetésekkel kapott momentumok helyességét integrálással bizonyítottuk.

A molekulaméret-eloszlásnál alkalmazott Monte Carlo szimulációt is Mathematica 9 program segítségével végeztük el az eloszlás szélességének és a polidiszperzitás értékének összevetéséhez.

Az inverz méretkizárásos mérésekhez Agilent 1100 típusú folyadékkromatográfot használtunk. Különböző típusú C18-as oszlopokat vizsgáltunk, hogy meghatározzuk azok pórusméret-eloszlását: 4 tömörmagvú állófázissal és 3 teljesen porózus állófázissal töltött kromatográfiás oszlopot, valamint két monolit oszlopot vizsgáltunk.

A mérésekhez használt polisztirol standardokat a Variantól (Varian, Inc. USA) szereztük be. Ezen polimerek molekulatömege 580 és 3 250 000 Da közötti tartományt ölelt fel.

HPLC minőségű tetrahidrofuránt (THF) használtunk mozgófázisként és a polimerminták oldószereként, amelyet a Fisher Scientificől (Fisher Scientific, Ltd. UK) szereztünk be. A mozgófázis áramlási sebessége minden esetben $0,50 \text{ cm}^3/\text{perc}$ volt. Az eluens minden esetben 100% THF volt. Az oszlopokat $293,15 \text{ K}$ -re termosztáltuk. A THF-ben feloldott minták koncentrációja $0,50 \text{ mg/cm}^3$ volt, melyekből $1,00 \mu\text{l}$ -t injektáltunk minden esetben. A detektálást 254 nm -en végeztük. Minden polisztirol minta retenciós térfogatát az azonos körülmények között mért oszlopon kívüli térfogattal korrigáltuk.

4. Eredmények

A sztochasztikus elmélet a kromatográfiás folyamatot molekuláris szinten írja le, így abba célszerű beépíteni a pórusméret-eloszlást, hogy ezáltal több információt szerezhessünk a retenciós folyamatról. Munkánk első lépéseként ezért beépítettük a log-normális pórusméret-eloszlást a méretkizárásos kromatográfia sztochasztikus elméletébe. Különböző pórusalakokat feltételezve (ék alak, hengeres, kúpos) számíthatóvá váltak a levezetett egyenletek segítségével a csúcsok statisztikai momentumai. A csúcsprofilok számítása minden esetben megvalósítható a karakterisztikus függvény numerikus inverz Fourier transzformációjával.

A számított csúcsalakok kiértékelésének eredményei bizonyítják, hogy a korábbi várakozásoknak és kísérleteknek megfelelően a pórusméret-eloszlás jelentős hatással van a makromolekulák retenciós tulajdonságaira (retenciós idő, szélesség, szimmetria). Bizonyítottuk, hogy makromolekulák elválasztása esetén a széles pórusméret-eloszlás növeli az elválasztás hatékonyságát. Ennek következménye, hogy minden folyadék-kromatográfiás módszer esetén a makromolekulák hatékony elválasztásához széles pórusméret-eloszlású állófázisokat célszerű használni.

Az általunk kifejlesztett, pórusméret-eloszlást tartalmazó modell használható a méretkizárásos mérések tervezésére és a pórusszerkezet roncsolásmentes meghatározására, mivel a pórusok alakjáról és a pórusméret-eloszlásról is hordoz információt.

Az új modell használatával az inverz méretkizárásos kromatográfia a korábbiaknál sokkal megfelelőbb módszerül szolgál a folyadék-kromatográfiás töltetek pórusszerkezetének felderítésére anélkül, hogy az oszlopot használhatatlanná tennénk. A pórusméret-eloszlást tartalmazó sztochasztikus modell segítségével meghatároztuk kereskedelmi forgalomban kapható, különböző típusú állófázisok pórusméretét és annak eloszlását: négy oszlop tömörmagvú, három oszlop teljesen porózus és két oszlop monolit állófázist tartalmazott. Az eloszlást nem tartalmazó modellhez képest az új modellenél minden esetben szignifikánsan jobb illeszkedést tapasztaltunk a kísérleti adatokra. Az illesztésekkel pontosabb képet kaphatunk az állófázisok szerkezetéről, ezáltal képesek lehetünk a legmegfelelőbb oszlop kiválasztására komplex minták elemzéséhez.

Az új, pórusméret-eloszlást tartalmazó sztochasztikus modellt használtuk első és második generációs monolit oszlopok mezopórus-méretének és annak eloszlásának meghatározására

inverz méretkizárásos kromatográfiás adatokból. A polisztirol standardok retenciós térfogatait a molekulák forgási sugara függvényében ábrázolva kapott kalibrációs görbék jelentős különbséget mutattak a két monolit generáció esetén. A hidrodinamikai tartományban kapott különbségek a mezopórusokból kizáródó, csak a makropórusokba beférő molekulák eltérő viselkedéséből származik, ezáltal a makropórusok mérete meghatározható. Eredményeink alapján a két különböző monolit generáció esetén 22,7%-os csökkenés tapasztalható a makropórusok méretében (1,55 μm az első, míg 0,95 μm a második generációs monolit esetén), ami a monolit váz kialakításának módjából ered. Bár a mezopórusok méretének eloszlása keskenyebbé vált a második generációs monolitoknál, az eloszlás várható értéke igen hasonló értéket ad a két generációnál (8,8 és 8,9 nm).

A méretkizárásos kromatográfia sztochasztikus elméletébe beépítettük a molekulák méretének eloszlását (polidiszperzitását). Vizsgáltuk mind a normális, mind a log-normális valószínűségi sűrűségfüggvénnyel leírt molekulaméret-eloszlások csúcsalakra és annak statisztikai momentumaira gyakorolt hatását különböző pórusalakok feltételezése mellett. A modellek levezetése során arra a következtetésre jutottunk, hogy a molekulaméret- és a pórusméret-eloszlásának hatásai nem különíthetők el egymástól sem elméleti, sem gyakorlati szinten.

5. Tézispontok

1. A méretkizárásos kromatográfia sztochasztikus elméletébe beépítettük a pórusméret-eloszlást. Több pórusalak esetén számítottunk kromatográfias csúcsokat, melyek momentumait a levezetett egyenleteinkkel meghatároztuk, majd integrálással validáltuk.
2. Az eloszlás paramétereit egyenként változtatva vizsgáltuk azok elválasztásra, csúcsalakra gyakorolt hatásait. A pórusméret-eloszlás hatása a makromolekuláknál és hengeres vagy kúpos pórusalaknál kifejezett jelentőségű.
3. Teljesen porózus és tömörmagvú állófázissal töltött kromatográfias oszlopok inverz méretkizárásos mérési adataiból meghatároztuk azok pórusméret-eloszlását és pórusalakját. Igazoltuk, hogy a tömörmagvú részecskék pórusméret-eloszlása mindig szélesebb a teljesen porózus részecskék eloszlásánál, ami a szintézis módjából ered.
4. Meghatároztuk az első és második generációs szilikagél-alapú monolit oszlopok mezopórusainak méretét és azok eloszlását. Bizonyítottuk, hogy bár a második generációs monolitok mezopórusméret-eloszlása keskenyebb, az átlagos pórusméret azonos a két generáció esetén.
5. A méretkizárásos kromatográfia sztochasztikus elméletébe beépítettük a molekulák méretének eloszlását (polidiszperzitását). Csúcsalakok, valamint azok momentumainak számításával vizsgáltuk az eloszlás elválasztásra gyakorolt hatását. Bizonyítottuk, hogy a molekulák méreteloszlása retenciósíelő-eltolódáshoz és csúcshélesedéshez vezethet.

6. Megjelent közlemények

A PhD értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények

1. Sepsey, A., Bacskay, I., Felinger, A., Molecular theory of size exclusion chromatography for wide pore size distributions, *J. Chromatogr. A*, 2014, 1331, 52–60, IF: 4.169 (Q1/D1)
2. Bacskay, I., Sepsey, A., Felinger, A., Determination of the pore size distribution of high-performance liquid chromatography stationary phases via inverse size exclusion chromatography, *J. Chromatogr. A*, 2014, 1339, 110–117, IF: 4.169 (Q1/D1)
3. Bacskay, I., Sepsey, A., Felinger, A., The pore size distribution of the first and the second generation of silica monolithic stationary phases, *J. Chromatogr. A*, 2014, 1359, 112–116, IF: 4.169 (Q1/D1)
4. Sepsey, A., Bacskay, I., Felinger, A., Polydispersity in size-exclusion chromatography: A stochastic approach, *J. Chromatogr. A*, 2014, 1365, 156–163, IF: 4.169 (Q1/D1)

A PhD értekezés témájában készült nem referált konferencia absztraktok

1. Bacskay, I., Sepsey, A., Felinger, A., Fordított fázisú HPLC állófázisok pórusméret-eloszlása, Elvásztástudományi Vándorgyűlés 2014, 2014.10.12–10.14., Egerszalók
2. Sepsey, A., Bacskay, I., Felinger, A., Kromatográfiás állófázisok pórusméret-eloszlásnak és pórusalakjának vizsgálata, Elvásztástudományi Vándorgyűlés 2014, 2014.10.12–10.14., Egerszalók
3. Bacskay, I., Sepsey, A., Felinger, A., Comparison of the pore size distribution of the two generations of silica-based monolithic stationary phases, 30th International Symposium on Chromatography, 2014.09.14–09.18. Salzburg
4. Sepsey, A., Bacskay, I., Felinger, A., The effect of polydispersity in chromatography, 30th International Symposium on Chromatography, 2014.09.14–09.18, Salzburg
5. Bacskay, I., Sepsey, A., Felinger, A., Comparison of pore size distribution of RP-HPLC stationary phases with molecular theory of size exclusion chromatography, 30th International Symposium on Microscale Bioseparations, 2014.04.27–05.01., Pécs
6. Sepsey, A., Bacskay, I., Felinger, A., A Stochastic approach to the polydispersity in size exclusion chromatography, 30th International Symposium on Microscale Bioseparations, 2014.04.27–05.01., Pécs
7. Sepsey, A., Bacskay, I., Felinger, A., Introducing the effect of polydispersity into the stochastic theory of size-exclusion chromatography, Interdiszciplináris doktorandusz konferencia, 2014.04.16., Pécs
8. Sepsey, A., Bacskay, I., Felinger, A., Integrating the pore size distribution into the molecular theory of size exclusion chromatography, 9th Balaton Symposium on high-performance separation methods, 2013.09.04–09.06., Siófok
9. Bacskay, I., Sepsey, A., Felinger, A., Estimation of pore size distribution of HPLC stationary phases with the molecular theory of size-exclusion chromatography, 9th Balaton Symposium on high-performance separation methods, 2013.09.04–09.06., Siófok
10. Sepsey, A., Bacskay, I., Felinger, A., Molecular theory of size exclusion chromatography for wide pore size distributions, 39th international symposium on high performance liquid phase separations and related techniques (HPLC 2013), 2013.06.16–06.20., Amsterdam

11. Bacskay, I., Sepsey, A., Felinger, A., Influence of wide pore size distribution in size-exclusion chromatography, 39th international symposium on high performance liquid phase separations and related techniques (HPLC 2013), 2013.06.16–06.20., Amsterdam
12. Sepsey, A., Bacskay, I., Felinger, A., Introducing pore size distribution into the stochastic theory of size exclusion chromatography, 9th János Szentágothai Interdisciplinary Conference & Student Competition, 2013.05.03–05.04., Pécs
13. Sepsey, A., Bacskay, I., Felinger, A., Modeling wide pore size distributions in size exclusion chromatography, CECE 2013 10th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, 2013.04.25–04.27., Pécs
14. Bacskay, I., Sepsey, A., Felinger, A., Experimental validation of the molecular theory of size-exclusion chromatography with wide pore size distribution, CECE 2013 10th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, 2013.04.25–04.27., Pécs

A PhD értekezés témáján kívül készült tudományos közlemények

1. Pasti, L., Marchetti, N., Guzzinati, R., Catani, M., Bosi, V., Dondi, F., Sepsey, A., Felinger, A., Cavazzini, A., Microscopic models of liquid chromatography: From ensemble-averaged information to resolution of fundamental viewpoint at single-molecule level, TRAC, 2016, IF: 6.472 (Q1/D1)
2. Horváth K., Sepsey, A., Hajós P., Solvent minimization in two-dimensional liquid chromatography, J. Chromatogr. A, 2015, 1378, 32–36, IF: 4.169 (Q1/D1)
3. Horváth K., Lukács D., Sepsey, A., Felinger A., Effect of particle size distribution on the separation efficiency in liquid chromatography, J. Chromatogr. A, 2014, 1361, 203–208, IF: 4.169 (Q1/D1)
4. Tófalvi R., Sepsey, A., Horváth K., Hajós P., Environmental significance and identification of metal-chelate complexes using ion chromatography, Hung. J. Ind. Chem., 2011, 39, 95–99, IF: 0

A PhD értekezés témáján kívül készült nem referált konferencia absztraktok

1. Sepsey, A., Felinger, A., The theory of “Batman peaks”: dynamic interconversions during the chromatographic separation, Balaton Symposium on High-Performance separation methods, 2015.09.02–09.04., Siófok
2. Sepsey, A., Felinger, A., Stochastic theory of “Batman” peaks: a novel model for enantiomer separation, 15th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, 2015.07.13–07.18., Marosvásárhely
3. Sepsey, A., Felinger, A., Molecular dynamic theory of “Batman” peaks: enantiomer separation using the stochastic theory of chromatography, 42nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2015.06.21–06.25., Genf
4. Horváth, K., Sepsey, A., Hajós, P., New strategy for solvent optimization in multidimensional green chromatography, 1st EuCheMS Congress on Green and Sustainable Chemistry, 2013.10.13–10.15., Budapest
5. Horváth K., Sepsey, A., Hajós P., Novel approaches for the optimization of off-line two-dimensional liquid chromatography, 29th International Symposium on Chromatography (ISC'2012), 2012.09.09–09.13., Torun
6. Horváth, K., Sepsey, A., Lukács, D., Felinger, A., Influence of width of particle size distribution on separation efficiency in liquid chromatography, 9th Balaton Symposium on high-performance separation methods, 2013.09.04–09.06. Siófok

7. Horváth, K., Sepsey, A., Hajós, P., Solvent minimization in two-dimensional liquid chromatography, 9th Balaton Symposium on high performance separation methods, 2013.09.04–09.06. Siófok
8. Sepsey, A., Horváth K., Hajós P., Az off-line kétdimenziós folyadékkromatográfia optimalizálásának újszerű megközelítése, Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2012, 2012.11.07–11.09., Hajdúszoboszló
9. Tófalvi, R., Sepsey, A., Horváth, K., Hajós, P., Simultaneous analytical separation of metal-chelate complexes and their ligands using high performance ion chromatography, 36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques(HPLC 2011), 2011.06.19–06.23., Budapest
10. Tófalvi, R, Sepsey, A., Horváth, K., Hajós, P., Fémkelát komplexek és ligandumok szimultán analitikai elválasztása nagyhatékonyságú ionkromatográfiával, Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2010., 2010.11.10–11.12., Tapolca
11. Tófalvi, R, Sepsey, A., Hajós, P., Fém-kelát komplexek analitikai elválasztása és azonosítása folyadékkromatográfiai módszerrel, Műszaki Kémiai Napok 2010 (Conference of Chemical Engineering 2010), 2010.04.27–04.29., Veszprém