

Szakmai zárójelentés

Nagyszelektivitású analitikai elválasztások fejlesztése ionizálható bioaktív vegyületek vizsgálatára

OTKA-azonosító : K 81843

Vezető kutató: Dr. Hajós Péter, Pannon Egyetem, Analitikai Kémia Intézeti Tanszék

A kutatás időtartama: 2010 - 2014

Zsúri: KM 1

A kutatás célkitűzései:

Az elvégzett kutatás - az eredeti koncepciónak megfelelően – három logikusan összefüggő részterületre osztható: (1) Nagyszelektivitású ion-kromatográfias módszer fejlesztése többértékű fém-kelát komplex anionok analitikai elválasztására pellikuláris ioncserélőn.

(2) 2DHPLC rendszer funkcionális paramétereinek optimalása és elméletének fejlesztése az ioncserés és a fordított fázisú kromatográfia kombinálásával. (3) Környezeti szennyező és bioaktív modell-minták fotokémiai bomlásának nyomon követése új ion-és folyadékromatográfias módszerekkel. A kutatás témakörének aktualitása szempontjából ki kell emelni, hogy e feladatok egy dinamikusan fejlődő szakterülethez sorolhatók. A bioaktív ionos komponensek és különösen az alkalmazott metodikák (HPIC, 2DHPLC, UHPLC) a kromatográfias alap kutatások tárgya a világ vezető analitikai kémiai laboratóriumaiban.

A kutatás eredményeinek publikációja:

A kutatómunka eredményeit - az OTKA támogatás feltüntetésével - 7db nemzetközi referált tudományos közleményben publikáltuk a szakterület vezető folyóirataiban, összesített IF= 24.656. 1 cikk beküldése folyamatban van. 25 kutatási anyag nemzetközi konferencián szerepelt. A munka során 1 PhD dolgozat ill. fokozatszerzés és 2 diplomadolgozat született.

A kutatás eredményeinek bemutatása, jelentősége:

1. Nagyszelektivitású ion-kromatográfias módszer kifejlesztése többértékű fém-kelát komplex anionok és ligandumaik analitikai elválasztására pellikuláris ioncserélő fázison.

1./ A.) Felismertük, hogy megfelelő kémiai paraméterek mellett a pozitív fémion anionos kelát komplex formává alakítható és az ionos töltésszám alapján egy injektumból szimultán elválasztásokat lehet végrehajtani szerves, szervetlen anionokra, fém-komplexekre egyaránt. Igazoltuk, hogy ebben a rendszerben akár egy komponensből is két hasznos kromatográfias jel generálható, az anionos fémkomplex ill. a fém-kation eredetileg jelenlévő anionja által $[EDTA^{4-} + MCl_2 \Leftrightarrow (MEDTA)^{2-} + 2Cl^-]$.

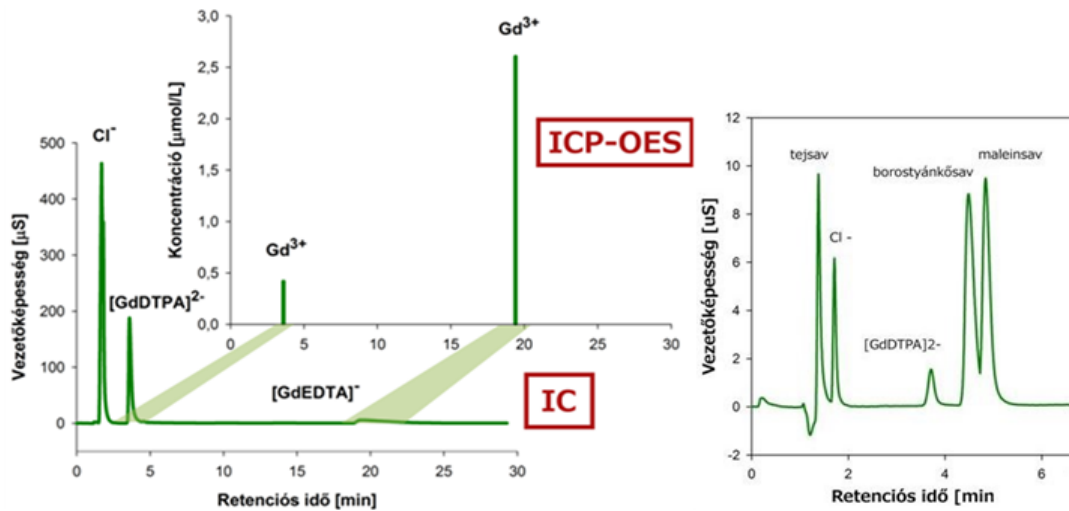
Átmeneti-fém kelát-komplex anionok analitikai elválasztását végeztük el etilén-diamin-tetraacetát (EDTA) és 1,2-diamin-ciklohexán-tetraacetát (DCTA) ligandumok jelenlétében ion-kromatográfias rendszerben érzékeny membrán-szuppresszált vezetőképességi detektálással. A bázisos pH-jú elúció során a mintakomponensek a komplexképző ligandumokkal különböző vegyértékű, változó móltörteloszlású, de stabil anionos komplexeket képeznek, amelyek a kromatográfias folyamatban nyomon követhetők. A módszer előnyös körülménye, hogy a komplexek stabilitása és a szelektív elúció szempontjából azonos lúgos pH tartomány (9-11) a kedvező. A komplexált ML forma ill. a

disszociált L forma átalakulásának kinetikáját is vizsgáltuk - a sebességi állandók figyelembevételével – valószínűségi sűrűségfüggvény, $P(L,ML)(x)$ felállításával. Kromatogram ugyanis felírható, mint a komplexált anion és a disszociált anion mólfrakcióival súlyozott valószínűségi függvények összege. A súlyozott függvények által kvantitatív módon leírtuk és demonstráltuk a két fázisban lejátszódó megoszlási folyamatot ill. elúciós profilt. Megmutattuk, hogy a komplexek és a ligandumok egyidejű megjelenése a kromatogramban kinetikus okokból elvileg nem akadályozott, ha a konverzió mértéke kisebb, mint $10^{-2}/\text{min}$. A protonált formák megjelenése kizárható a protolízis nagy sebessége miatt. Az elválasztások mechanizmusának meghatározása ill. a szelektivitás javítása iterációval és retenciós egyensúlyi modell¹ számításai alapján történt (pH, komplex stabilitási értékek, komplex móltört, moláris frakciók, ioncsere-kapacitás, komponensek pK értékei, eluens összetétel). Meghatároztuk az elválasztásokat befolyásoló optimális paramétereket, amelyek alapján retenciós sorrendet azonosítottunk Cu-EDTA, Cu-DCTA, Zn-EDTA, Zn-DCTA, Al-EDTA, Al-DCTA komplexekre ill. a kísérő többértékű ligandumok komponenseire egyaránt. Az aminopolikarboxilát ligandumok 2-, 3- és 4- negatív töltésű formái is elválaszthatók egymástól. Az EDTA ligandum esetében ezek a komponensek a koeluálódó $\text{EDTA}^{4-} + \text{HEDTA}^{3-}$ ill. a NaEDTA^{3-} és a $\text{Na}_2\text{EDTA}^{2-}$. A retenciós sorrend igazolására „heart-cutting” módszert vezettünk be. Az egyes komplexeknek megfelelő kromatográfiai csúcsok retenciós sávjában térfogati frakciókat preparáltunk, és a fémionokat ICP atomspektroszkópiával, a ligandumokat FTIR spektroszkópiával (ATR reflexió) kontrolláltuk. A szerkezetet a ligandumra jellemző szimmetrikus és aszimmetrikus COO- vegyértékrezgések ($1800 - 1300 \text{ cm}^{-1}$) igazolták a kromatogramból származó minták spektrumain. A fémionok a kelát ligandumok által mobilizálódhatnak és nem kívánatos biológiai, környezeti, biogeokémiai körfolyamatokban vehetnek részt. Ezért a kifejlesztett szelektív módszer alkalmazásának jelentőségét hangsúlyozni kell. Jelenlegi ismereteink szerint a kelát-komplexek, ligandumaik és kísérő anionjainak szimultán kromatográfiai módszere és annak részletes leírása a szakirodalomban első ízben általunk lett publikálva: *Tófalvi R.; Horváth K.; Hajós P.: High Performance Ion Chromatography of Transition Metal Chelate Complexes and Aminopolycarboxylate Ligands. Journal of Chromatography A, 1272, 26.,2013. IF: 4,612*

1/ B.) A fém-kelát komplexek és a különböző amino-polikarboxilát ionos rendszerek körét és kromatográfiai módszerét továbbfejlesztettük az orvosi képalkotó rendszerekben (MRI, MRA) in vivo kontrasztanyagként fontos gadolínium-kelátok; a Gd-EDTA és diagnosztikailag jelentős Gd-dietilén-triamin-pentaecetsav (DTPA) részletes vizsgálatára. A ferromágneses gadolínium komplex-vegyületek alkalmazása bomlási reakciói révén kockázatos, amelynek analitikai követése és a mechanizmus felderítése alapvető feladat. Nagyszelektív anion-kromatográfiai módszert dolgoztunk ki e bonyolult összetételű komponensek szimultán analitikai meghatározására (Dionex 300 IC, CA, USA). Ez lehetővé teszi, hogy a fő komponens mellett a kísérő ligandumok, mátrix ionok is vizsgálhatók. Komplexképződési és protonálódási egyensúlyi számításokkal terveztük a komponensek várható retenciós sorrendjét. Móltört eloszlási és stabilitási számításokat végeztünk a két ligandumra az eluens pH-tartományban. Meghatároztuk a módszer optimális elválasztási ill. detektálási körülményeit (oszlopkapacitás, mozgófázis összetétel és pH), a szervetlen és szerves ionok zavaró hatását, ill. kimutatási határát (0.33 mikromól).

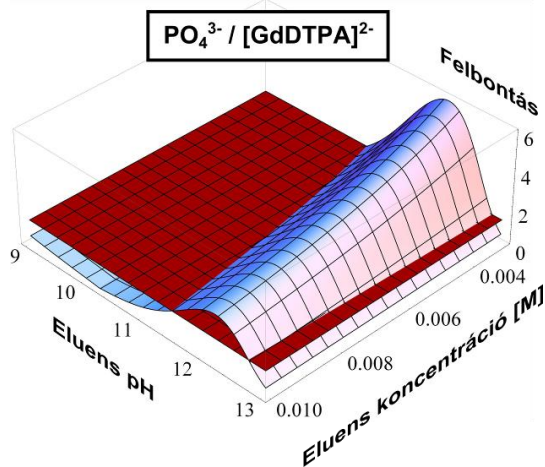
¹Hajós P., Horváth O., Denke V.: *Analytical Chemistry*, 67, 434-441, 1995

1.ábra



Az egyes Gd komplex ionok kromatográfiai jelenlétét ICP-OES (Perkin Elmer Optima 2000) spektroszkópiás módszerrel igazoltuk (Id.1/A. és 1.ábra) Szilárd fázisú mikroextrakciós módszerrel előnyösen bővítettük az eljárást, melynek során a kationos cartridge a központi Gd fémionra vonatkozóan dúsítást -, a zavaró nagykoncentrációjú szerves és szervetlen anionok esetén viszont szelektív eltávolítást eredményezett.

2.ábra



A felbontási értékek a célkomponens és a kísérő mátrix ionok között megfelelő értékűek ($R_s > 1.3$) kell legyenek. Ezért az egyensúlyi retenciók modell alkalmazásával számított retenciók adatok és a származtatott R_s függvény alapján a felbontás értékeit az elúció paramétereire optimáltuk (2. ábra). Az eljárás különösen a foszfát-ion esetében bizonyult hasznosnak, mert az optimum mellett kijelölhető és értelmezhető volt a retenció sorrendváltás is az elúció körülményeinek változásakor. (Hajós P.; Lukács D.; Horváth K. : *Profiling of Gadolinium-Chelates as MRI*

Contrast Agents by High Performance Ion-Chromatography. 7th European Bioanalysis Forum, Barcelona, Spanyolország, November 19-21.,2014, közlemény beküldés alatt, J. Chrom.A.)

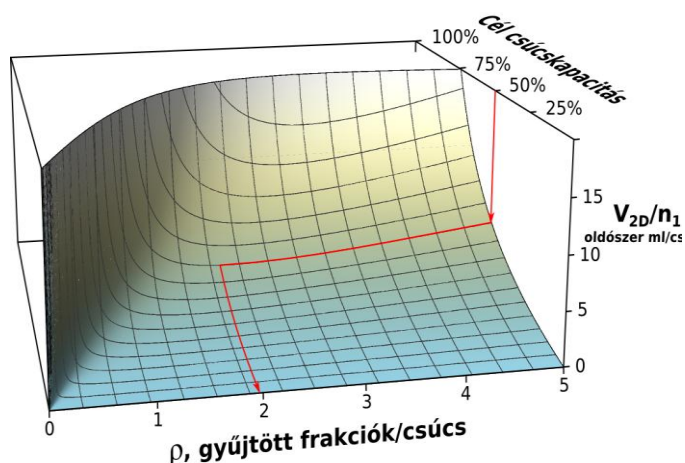
2. A 2DHPLC (ioncsere- és fordított fázisú kromatográfia) funkcionális paramétereinek optimalálása és elméletének fejlesztése.

A nagyszámú komponenst tartalmazó minták analízise meghaladja a konvencionális, egydimenziós kromatográfiai rendszerek teljesítőképességét. A probléma megoldására nagy figyelem fordul a többdimenziós folyadékkromatográfia fejlesztéseire, melyekkel elérhető, ill. meghaladható a komplex mintákhoz szükséges kromatográfiai hatékonyság. Az elméleti megalapozottságú alap kutatás és a gyakorlati kivitelezések megvalósításában első lépésként a csatolt 2D elválasztási műszerrendszert sikeresen összeépítettük, és így szimultán

üzem módban nagy szelektivitású elválasztásokra nyílt lehetőség két különböző retenciós mechanizmus (IEX+RPHPLC analitikai oszlopok) egyidejű alkalmazásával. A megfelelő funkcionális paraméterek kijelölése, a két készülék illesztése (Agilent 1290 Infinity + 1100 Series, USA), összehangolt működése feltétele volt a megbízható elválasztásoknak.

2./A Új algoritmust fejlesztettünk 2DLC elválasztások optimalizálására kationcserét alkalmazva az első-, fordított fázisú állófázist a második dimenzióban. Az optimaló algoritmus (1) minimalizálja az elválasztás során felhasznált eluens mennyiségét, így annak környezeti hatását, (2) ugyancsak minimalizálja az analízisidőt és a mintavesztéséget, (3) az eddigi paraméterek és a rögzített ill. igényelt csúskapacitás mellett maximálja az elválasztás hatékonyságát. A tesztelés során triptikus emésztett szérumból albumin fehérje (BSA, Mt = 66,5 kDa) minták vizsgálatára került sor. A minta tripszin hatására létrejött peptidok és polipeptidok keveréke. Az off-line elrendezésű kétdimenziós analitikai elválasztási rendszerben az első dimenzióban egy szilika alapú erősen savas kationcserélő tulajdonságú SCX oszlopot, második dimenzióban egy fordított fázisú, C18 alkil láncot tartalmazó analitikai oszlopot használtunk. Az optimalási algoritmus igényelte az elválasztási rendszerek hatékonysága szempontjából optimális térfogatáram értékét, amelyet alkalmas kísérlet-sorozat adataiból a módosított van Deemter egyenlettel (Knox) állapítottunk meg.

3. ábra



Az olyan 2DHPLC rendszerbeállítások, amelyek ennek az optimaló szintnek megfelelően történtek, alkalmasak a lehető legnagyobb csúskapacitás-értékek és hatékonyság elérésére minimális eluens felhasználása mellett (3. ábra). Horváth K.; Sepsey A.; Hajós P.: *Solvent minimization in two-dimensional liquid chromatography*, **Journal of Chromatography A**, doi: 10.1016/j.chroma.2014.12.001, 2014.

IF :4.258

2./B.) A 2DHPLC rendszer további fejlesztésében több funkcionális paraméter (hatékonyság, állófázis részecskeméret-szerkezet, -eloszlás, dimenziók közötti hígulás) körülményeit vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a két dimenzió közötti mintatranszfer során, szérumból albumin vizsgálatában a komponensek a mintavételezés fázisától függően kb. 50-szeres hígulást szenvednek mire a második dimenzióba érnek. Ez a körülmény befolyásolhatja a detektálási viszonyokat. Liofilizálást alkalmazva, off-line esetben ez a hatás 1/5 részére csökkenthető. Az elválasztások gyors és hatékony elválasztásokat igényelnek a második dimenzióban. A hatékonyabb állófázisok, melyek kielégítik ezen követelményeket, héjszerkezetűek. Vizsgáltuk a porózus héj vastagságának hatását az elválasztás hatékonyságára. A folyadékromatográfia általános sebességi modelljét megoldva meghatároztuk különböző méretű komponensek (kisméretű molekulák, közepes méretű peptidok, nagy méretű peptidok, közepes méretű fehérjék) HETP görbéjét. Megállapítottuk, hogy az elválasztás hatékonysága vékonyabb porózus héj esetén jelentősen nagyobb, mint teljesen porózus részecskék alkalmazásánál. Gritti F.; Horvath K.; Guiochon G.: *How changing the particle structure can speed up protein mass transfer kinetics in liquid chromatography*,

Journal of Chromatography A, 1263, 84., 2012 IF:4,612; Horváth K.; Hajós P.: *One Step Further on the Way Toward the Ultimate Stationary Phase: Analysis of Efficiency of Bi-Layer Core-Shell Particles, 39th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2013), Amsterdam, Június 15-21. 2013.*, felkért előadás, Abstr.OR8, p.10-11.,

A kromatográfia sebességi modellje alapján számításokat végeztünk arra vonatkozóan is, hogy a korszerű nagyhatékonyságú töltetek méreteloszlásának szórása hogyan befolyásolja a hatékonyságot. A minta molekulaméret növelésével a szórás hatása szignifikáns módon csökkent. Az 5 mikronos fázisok esetén 1,0 µm-es szórás mellett közepes molekula méretű peptidre közel 10%-os hatékonyság romlást tapasztaltunk, mely proteinek esetében elérte a 15%-ot. Az elválasztások tervezésénél számításainkkal becsülhetők a várható hatékonyság értékek a szilárd fázisok szerkezeti, fizikai tulajdonságai alapján.

3.) Környezeti szennyező és bioaktív modell-minták fotokémiai bomlásának nyomon követése új ion-és folyadékkromatográfias módszerekkel.

Ultra nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias (UHPLC) és ion-kromatográfias (HPIC) módszereket dolgoztunk ki felületaktív anyagok ózonnal kombinált fotokatalizált degradációjának nyomon-követésére. A felületaktív anyagok növelik a biológiai akkumulációban résztvevő hidrofób szerves vegyületek oldhatóságát, és ezen keresztül káros környezeti hatását. Ezért környezetkémiai szempontból különösen fontos a különböző katalitikus mentesítési eljárások hatékonyságának minősítése, a mechanizmusok felderítése, a köztitermékek, bomlástermékek megbízható monitorizálása. Lineáris alkilbenzol-szulfonátok (LAS C10-C13) oxidatív degradációjára vonatkozó vizsgálatok során a keletkező szulfid- és szulfát-ionok HPIC meghatározására bázisos eluent és szuppresszált vezetési detektort alkalmaztunk. Ezzel párhuzamosan vizsgáltuk (HPLC Agilent 1290 Infinity) a LAS molekulák koncentrációjának csökkenését víz/metanol rendszerben UV detektálással. Ezen módszerek kvantitatív eredményei alapján megállapítható volt a heterogén fotokatalízis paramétereinek hatása és a bomlási mechanizmus (oxidáció, aromás gyűrű nyitása) részletes összefüggései. Zsilák Z.; Fónagy O.; Szabó-Bárdos E.; Horváth O.; Horváth K.; Hajós P.: *Degradation of industrial surfactants by photocatalysis combined with ozonation. Environ. Sci. Pollut. Res.* 21(19), 11126., 2014, IF: 2,757; Zsilák Z.; Szabó-Bárdos E.; Fónagy O.; Horváth O.; Horváth K.; Hajós P.: *Degradation of benzenesulfonate by heterogeneous photocatalysis combined with ozonation. Catalysis Today* 230, 55., 2014, IF: 3,309; Hasonló célból UHPLC módszert alkalmaztunk a biológiai folyamatokban különösen nehezen lebontható oktilfenol-polietoxilát (TritonX-100) detergens fotokatalizált degradációjának követésére. Gradiens elúcióban az eluens paramétereit és az analízis időt optimalítottuk az egyes oligomer köztitermékek teljes körű felbontása céljából. Hegedűs P.; Szabó-Bárdos E.; Horváth O.; Horváth K.; Hajós P.: *TiO₂ mediated photocatalytic mineralization of a non-ionic detergent: comparison and combination with other advanced oxidation procedures, Materials. Manuscript ID: materials-69907, 2014, doi: 10.3390/ma8010231 IF: 1,879.*

A kutatás időtartam módosítása: A Pannon Egyetem kémiai tanszékeinek a futamidő alatti közmű- és infrastrukturális átépítése miatt - a 3 éves költségterv változtatása nélkül - a befejezési határidő 2014. december 31-re módosult. OB Kollégium engedélye: MIK-07721/2012.11.09, MIK-00650/2014.02.05.