

MŰSZAKI SZEMLE

62. szám, 2013.

a 14. Vegyészkonferencia
különszáma

**Szerkesztőbizottság elnöke /
President of Editing Committee**

Dr. Köllő Gábor

**Szerkesztőbizottság tagjai /
Editing Committee**

Dr. Balázs L. György – HU,
Dr. Biró Károly Ágoston – RO,
Dr. Csibi Vencel-József – RO,
Dr. Fedák László – UA,
Dr. Karácsony János – RO,
Dr. Kása Zoltán – RO,
Dr. Kászonyi Gábor – HU,
Dr. Majdik Kornélia – RO,
Dr. Nagy László – RO,
Dr. Péics Hajnalka – RS,
Dr. Puskás Ferenc – RO,
Dr. Szalay György – SK,
Dr. Turchany Guy – CH,
Dr. Sebestyén-Pál György – RO

Kiadja / Editor

Erdélyi Magyar Műszaki
Tudományos Társaság – EMT
Societatea Maghiară Tehnico-Științifică
din Transilvania
Ungarische Technisch-Wissenschaftliche
Gesellschaft in Siebenbürgen
Hungarian Technical Scientific Society
of Transylvania

Felelős kiadó / Managing Editor

Dr. Köllő Gábor

A szerkesztőség címe / Address

Romania
400604 Cluj, Kolozsvár
B-dul 21. Decembrie 1989., nr. 116.
Tel/fax: 40-264-590825, 594042
Levélcím: RO – 400750 Cluj, C.P. 1-140.

Nyomda / Printing

Incitato Kft.

ISSN 1454-0746

www.emt.ro

emt@emt.ro

Content – Tartalomjegyzék – Cuprins

Amfoter karakterű rezolválóágensek vizsgálata Study of Resolving Agents with Amphoteric Character Studiul agenților de rezolvare cu caracter amfoteric	
SZELECZKY Zsolt, FÓDI Balázs, Dr. PÁLOVICS Emese, Dr. FOGASSY Elemér	3
Maxadilan peptidok kémiai szintézise és analitikai vizsgálatai The Chemical Synthesis and Analytical Investigation of Maxadilan Peptides Sinteza chimică și studiul analitic a peptidelor de tip Maxadilan	
Dr. SZOLOMÁJER János, HEGYI Orsolya, Dr. KELE Zoltán, Prof. Dr. TÓTH Gábor	8
Kavitandok retenciós tényezőjének hőmérsékletfüggése C18 és C8 fordított fázisú állófázisokon The Temperature Dependence of the Retention Factor of Cavitands on C18 and C8 Reversed Stationary Phases in HPLC Dependența termică a factorului de retenție a cavitandelor pe C18 și C8 în faza staționară inversă pe HPLC	
BARTÓ Endre, Prof. FELINGER Attila, Prof. KILÁR Ferenc, Dr. PRAUDA Ibolya, Dr. KISS Ibolya	17
Kódolja-e a királis vegyületek tulajdonsága az enantiomer felismerést? Is Encoded the Enantiomeric Recognition in the Properties of Chiral Compounds? Este codificată recunoașterea enantiomerică în proprietățile compușilor chirali?	
PÁLOVICS Emese, SZELECZKI Zsolt, FÓDI Balázs, FAIGL Ferenc, FOGASSY Elemér	23
Kalcium-foszfát folyamatos csapadékosítása: populáció mérleg modellezés ideális és reális keveredési viszonyok között Continuous Precipitation of Calcium Phosphate: Population Balance Modeling in Ideal and Real Mixing Conditions Precipitarea continuă a fosfatului de calciu amorf: aplicarea modelelor de bilanț a populației în condiții de curgeri ideale și reale	
Drd. eng. SZILÁGYI Botond, Dr. eng. prof. Paul Serban AGACHI, Dr. eng. adj. SZILÁGYI József, Dr. eng. adj. BARABÁS Réka, Dr. eng. doc. LAKATOS Béla	31
Algatechnológia és sűrítési műveletek Algae Technology and Densification Methods Tehnologia algelor și metode de densificare	
HODAI Zoltán, RIPPELNÉ Dr. PETHŐ Dóra, Dr. HORVÁTH Géza, Dr. HANÁK László, BOCSI Róbert	39

A kiadvány megjelenését támogatta:
Bethlen Gábor Alapkezelő Zrt. – Budapest



Amfoter karakterű rezolválóágensek vizsgálata

Study of Resolving Agents with Amphoteric Character

Studiul agenților de rezolvare cu caracter amfoteric

SZELECZKY Zsolt¹, FŐDI Balázs¹, Dr. PÁLOVICS Emese², Dr. FOGASSY Elemér¹

¹Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Szerves Kémia és Technológia Tanszék

²MTA Szerves Kémiai Technológia Tanszéki Kutatócsoport
1111 Budapest, Budafoki út 8., Tel.: +36-1-463-1111/5889, Fax: +36-1-463-3648
e-mail: szeleczy@mail.bme.hu

ABSTRACT

During our research we examined the role of compounds having amphoteric character in the chiral-chiral recognition. We intended to study the optical resolution of mandelic acid using as resolving agent, alpha, beta and gamma amino acids.

ÖSSZEFOGLALÓ

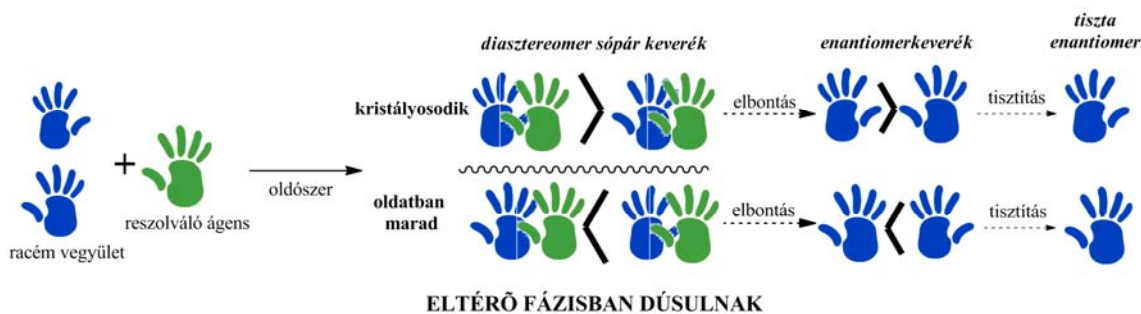
Kutatómunkánk során az amfoter karakterű vegyületek királis-királis kölcsönhatásokban történő szerepét vizsgáljuk. A racém mandulasav modellvegyületünk sóképzéses rezolválásai során α -, β - és γ -aminosav rezolválóágenseket alkalmaztunk.

Kulcsszavak: diasztereomer sóképzéses rezolválás, enantiomerkeverék, eutektikus összetétel, amfoter karakter

1. RACÉM VEGYÜLETEK ELVÁLASZTÁSA

1.1. Racém vegyületek rezolválása

A szintézisek során többnyire racém formába vagyis a jobb és balkezes forma (enantiomerek) egy-egy arányú keverékeként állítják elő a gyógyszerhatóanyagokat és a közti termékeit. A racém vegyületek rezolválása Pasteur felismerésén alapszik, aki szerint az enantiomerek szimmetrikus környezetben azonosan, aszimmetrikus környezetben eltérően viselkednek [1]. A racém vegyület enantiomerjeinek elválasztására továbbra is a legegyszerűbb iparilag alkalmazható eljárás a diasztereomer sóképzéses rezolválás [2]. A racém összetételű bázisok optikailag aktív savakkal a racém összetételű savak optikailag aktív bázisokkal diasztereomer viszonyban álló sópárokat képeznek és ezek sikeres elválasztás esetén eltérő fázisban dúsulnak. Ezek elbontásából enantiomerkeverékek nyerhetőek, amikből különböző enantiomerkeverék tisztítási eljárások után (például frakcionált kristályosítás vagy frakcionált kicsapás) tiszta enantiomerek nyerhetőek (1. ábra).

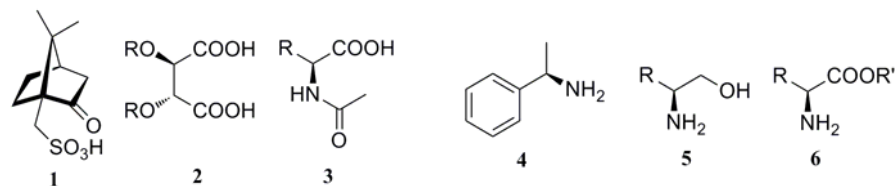


1. ábra

Diasztereomer sóképzéses rezolválás sematikus ábrája

1.2. Rezolválóágensek

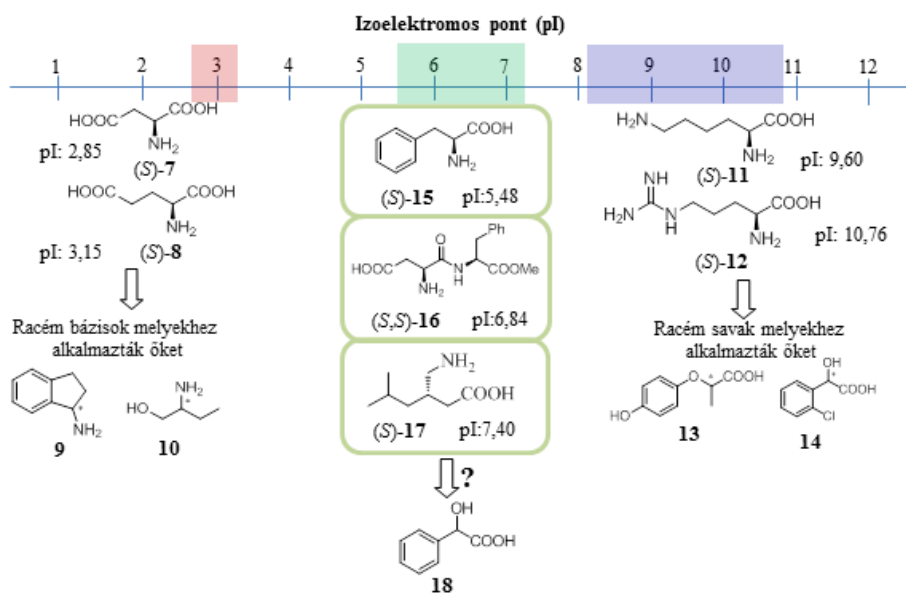
A racém vegyület mellett alkalmazott idegen királis vegyület, a rezolválóágens ipari alkalmazásának különböző kritériumai vannak. A jó rezolválóágens kritériuma, hogy olcsón, könnyen hozzáférhető, nem toxikus és jól regenerálható. A racém bázisok jó rezolválóágensei a természetből származó királis vegyületek és származékaik, mint az (*S*)-kámforszulfonsav (**1**), az (*R,R*)-borkősav és származékai (**2**) és az *N*-védett királis aminosavak (**3**). A racém savak rezolválására a toxikusságuk miatt háttérbe szorult természetes alkaloidok (brucin, kinin, sztichnin) helyett szintetikus királis bázisokat alkalmaznak, mint például (*R*)-1-fenil-etil-amin (**4**), valamint a királis aminosavakból képzett (*S*)-2-amino-alkanolok (**5**) és aminosav észterek (**6**) (2. ábra).



2. ábra

Közkedvelten alkalmazott rezolválóágensek

Azonban a királis amfoter karakterű vegyületek közül az aminosavak is teljesítik a jó rezolválóágens kritériumait. Racém bázisok rezolválására a savas oldalláncú aminosavak, az (*S*)-aszparaginsav ((*S*)-**7**) és az (*S*)-glutaminsav ((*S*)-**8**) is alkalmas. Sikeresen rezolválták az 1-aminoindánt (**9**) félekvivalens (*S*)-aszparaginsavval és a diasztereomersóból a Rasagilin hatóanyag intermediereként felhasználható (*R*)-enantiomert különítették el [3]. Ugyancsak sikeresen alkalmazták a 2-aminobutanol rezolválására a glutaminsavat [4]. A racém savak rezolválására a bázikus oldallánccal rendelkező aminosavak is használhatóak, mint a például az (*S*)-lizin ((*S*)-**11**), amit sikeresen alkalmaztak a Clopidogrel intermediereként alkalmazható 2-klór-mandulasav (**14**) rezolválására [5]. A célunk az volt, hogy 6-os körüli izoelektromos ponttal, és nem bázikus oldallánccal rendelkező aminosavakat alkalmazzunk rezolválóágensként, illetve rezolválóágens keverékeként. Alfa aminosavnak az (*S*)-fenilalanint ((*S*)-**15**) választottuk, béta aminosavnak a könnyen hozzáférhető olcsó édesítőszer, az aszpartámot ((*S,S*)-**16**), gamma aminosavnak pedig az (*S*)-pregabalint ((*S*)-**17**). A modellvegyületünknek a mandulasavat (**18**) választottuk, amely jó királis felismerőképességgel rendelkezik (3. ábra). Célunk volt továbbá, a rezolválóágenssel szerkezetileg hasonló, korábban nem alkalmazott, akirális amfoter karakterű vegyületek használata akirális hozzájárulásként.



3. ábra

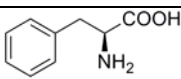
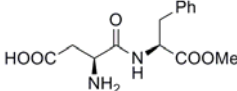
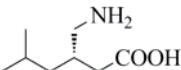
Aminosavak izoelektromos pont szerint és alkalmazásuk rezolválóágensként

2. EREDMÉNYEK

2.1. Várható rezolválhatóság

A rezolválás hatékonyságának mérőszáma az *F* faktor, vagyis rezolválhatóság, ami az enantiomertisztaság (*ee*) és termelés (*T*) szorzata. A tiszta diasztereomerek DSC mérése után a Schröder-van Laar egyenlettel szerkeszthető a biner fázisdiagram. A rezolválások maximális rezolválhatósága kiszámítható a diasztereomerek eutektikus összetételéből ($F=1-2^*x_{eu}/1-x_{eu}$) [6]. A rezolválásokat azonos koncentrációban, vízben végeztük a Pasteur-féle ekvivalens [1], a félekvivalens és a Pope-Peachey-féle [7] módszert, a félekvivalens rezolválóagens mellett félekvivalens akirális bázist (NaOH-ot) alkalmazva. A várható rezolválások, és a kapott eredményeket az 1. táblázat mutatja. A prediktált értékek szerint a (*S*)-17-al várható a legjobb elválasztás. A kísérletek szerint valóban ezzel lehet a legjobb elválasztást elérni a Pasteur-féle ekvivalens és a Pope-Peachey-féle félekvivalens módszer szerint, viszont a félekvivalens módszer esetén az (*S*)-15 bizonyult a legjobbnak. A várható számított rezolválhatóságot az ekvivalens (*S,S*)-16-al végzett rezolválás során sikerült elérni, a másik két rezolválóagens esetében elmaradtunk a prediktált értéktől, ami a diasztereomerek elválasztásának körülményeit megfelelően változtatva feltételezhetően elérhető.

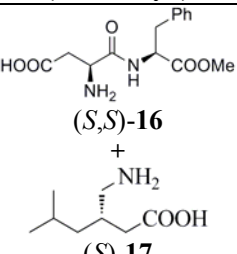
1. táblázat: Várható és kísérleti rezolválhatóság értékek

Rezolválóagens	Kalkulált <i>F</i>	Kísérleti <i>F</i> értékek		
		Pasteur	félekv.	Pope-Peachey
 (<i>S</i>)-15	0,63	0,36	0,34	0,25
 (<i>S,S</i>)-16	0,39	0,39	0,11	0,11
 (<i>S</i>)-17	0,70	0,44	0,22	0,35

2.2. Rezolválóagens keverékek vizsgálata

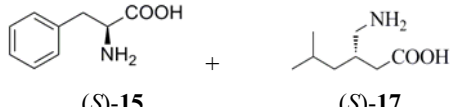
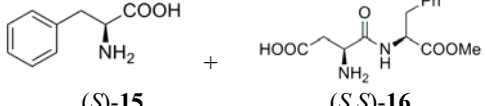
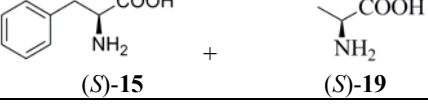
A holland rezolváláson alapulva, ahol is rezolválóagens keverékek alkalmazásával egyes esetekben jobb eredményeket értek el, mint a rezolválóagensekkel külön-külön, az aminosavaink keverékeit alkalmaztuk [8]. Az interakció jellemzésére az egyedi rezolválások rezolválhatóság átlagainak és a rezolválóagens keverékeivel végzett rezolválások rezolválhatóságainak hányadosa jellemzi. Pozitív kölcsönhatás esetén ez a szám nagyobb mint egy, negatív interakció esetén egy alatti érték. A 2. táblázatban a (*S,S*)-16 és (*S*)-17 keverékeivel végzett rezolválások eredményei minden esetben negatív interakciót mutatnak. Vagyis a β és γ -aminosav együttes alkalmazása minden esetben rontja a királis-királis felismerést.

2. táblázat: β - és γ -aminosav keverék alkalmazása rezolválóagensként

Rezolválóagens keverék (1:1 arányú)	Módszer	<i>ee</i> [%]	<i>T</i> [%]	<i>F</i> [-]	Interakció mértéke
	Pasteur	5	58	0,03	0,07
	félekv.	17	34	0,36	0,36
	Pope-Peachey	51	30	0,11	0,65

További rezolválóagens keverék vizsgálatnál a (*S*)-15-al együtt γ -, β - és α -aminosavakat alkalmaztunk, és az tapasztaltuk, hogy ebben a sorrendben javul a királis felismerés (3. táblázat). Vagyis a szerkezetileg hasonló amfoter karakterű rezolválóagens keverékek alkalmazása előnyös lehet. Annak ellenére, hogy az α -aminosav rezolválóagens keverékben az (*S*)-alanin ((*S*)-19) önmagában képtelen volt királis felismerésre a mandulasavval szemben.

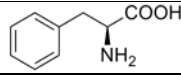
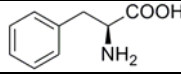
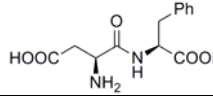
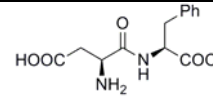
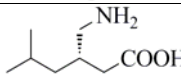
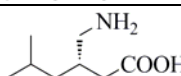
3. táblázat: Szerkezetileg hasonló aminosav keverékek alkalmazása rezolválóagens keverékként

Aminosavak	Rezolválóagens keverékek (1:1 arányú)	Módszer		
		Pasteur	félekv.	Pope-Peachey
$\alpha+\gamma$	 (S)-15 + (S)-17	0,93	0,64	0,74
$\alpha+\beta$	 (S)-15 + (S,S)-16	0,88	1,11	1,55
$\alpha+\alpha$	 (S)-15 + (S)-19	2,27	1,18	1,60

2.3. Akirális hozzátétek vizsgálata

A racém vegülethez vagy a rezolválóagenshez szerkezetileg hasonló akirális hozzátét alkalmazásával ugyancsak javítható a rezolválás hatékonysága [9]. Ezért a rezolválóagenhez szerkezetileg hasonló és ugyancsak amfoter karakterű akirális hozzátétek alkalmaztunk (4. táblázat). A (S)-15 rezolválóagens esetében a vele rokonszerkezetű akirális amfoter karakterű hozzátétként glicint (**20**) alkalmazva, enantiomertisztaság növekedést tapasztaltunk a félekvivalens rezolváláshoz képest (Δee :17%). A rezolválhatóság a félekvivalens rezolváláshoz képest csekély javulást mutatott (ΔF :0,02). Az (S,S)-16 esetében a β -alanin (**21**) hozzátét alkalmazásával jelentősebb enantiomertisztaság növekedést tapasztaltunk (Δee :38%) és jelentős rezolválhatóság érték növekedést (ΔF :0,16). A (S)-17 mellett alkalmazott γ -aminovajsav (**22**) akirális hozzátét esetében csekély mértékű enantiomertisztaság és termelésnövekedés tapasztalható, de a rezolválhatóság emiatt jelentősen javult (ΔF :0,12).

4. táblázat: Amfoter karakterű akirális hozzátétek alkalmazása

Rezolválóagens	Akirális hozzátét	Kísérleti eredmények			Különbség	
		<i>ee</i> [%]	T [%]	F [-]	Δee [%]	ΔF [-]
 (S)-15	-	35	96	0,34	-	-
 (S)-15	H ₂ N-CH ₂ -COOH 20	50	71	0,36	17	0,02
 (S,S)-16	-	11	97	0,11	-	-
 (S,S)-16	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -COOH 21	49	55	0,27	38	0,16
 (S)-17	-	42	53	0,22	-	-
 (S)-17	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH 22	51	66	0,34	9	0,12

3. ÖSSZEFOGLALÁS

Aminosavak enantiomerjei alkalmazhatóak racém savak rezolválása során rezolválóagensként. Technológiai előnyük miatt a klasszikus bázikus karakterű rezolválóagens mellett érdemes kipróbálni őket. A szerkezetileg hasonló rezolválóagens keverékekkel javuló eredmények érhetőek el. Egyes esetekben, ha az önmagában nem hatásos rezolválóagenssel helyettesítjük a hatásos rezolválóagens egy részét, jelentős

rezolválhatóság érték növekedést érhetünk el. Ugyancsak kedvező a rezolválás optimalizálása során az amfoter karakterű akirális hozzáadékok alkalmazása is.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetet mondanak az OTKA (K 104769) és a Richter Gedeon Nyrt. által nyújtott támogatásért.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1] Pasteur, L. *Compt.Rend.* **1853**, 26, 162.
- [2] a). Jacques, J. C.; Collet, A.; Willen, S. H. *Enantiomers, Racemates, and Resolutions*; John Wiley: New York, **1981**. b). Sheldon, R. A. *Chirotechnology, Industrial Synthesis of Optically Active Compounds*; Marcel Dekker: New York, **1993**. c). Kozma, D. *CRC Handbook of Optical Resolutions Via Diastereomeric Salt Formation*; CRC Press: London, **2002**.
- [3] Dymáček, B.: PCT Patent No. 2011/053211, **2012**
- [4] Radke, F. H.; Fearing, R. B.; Fox, S. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 2801.
- [5] a). Bálint, J.; Csatáriné Nagy, M.; Dombrády, Z.; Fogassy, E.; Gajáry, A.; Suba, C.: PCT Patent No. 03/000636, **2001** b). Bousquet, A.; Musolino, A.: US Patent No. 6573381, **2003**
- [6] Kozma, D.; Pokol, G.; Ács, M. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1992**, 435.
- [7] Pope, W. J.; Peachey, S. J. *J. Chem. Soc.* **1899**, 75, 1066.
- [8] Vries, T.; Wynberg, H.; van Echten, E.; Koek, J.; ten Hoeve, W.; Kellogg, R. M.; Broxterman, Q. B.; Minnaard, A.; Kaptein, B.; van der Sluis, S.; Hulshof, L.; Kooistra, J. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, 37, 2349.
- [9] Pálovics, E.; Fogassy, E.; Schindler, J.; Nógrádi, M. *Chirality* **2007**, 19, 1.

Maxadilan peptidek kémiai szintézise és analitikai vizsgálatai

The Chemical Synthesis and Analytical Investigation of Maxadilan Peptides

Sinteza chimică și studiul analitic a peptidelor de tip Maxadilan

Dr. SZOLOMÁJER János^{1,2} tudományos segédmunkatárs, HEGYI Orsolya¹ PhD hallgató,
Dr. KELE Zoltán¹ egyetemi adjunktus, Prof. Dr. TÓTH Gábor¹ intézetvezető egyetemi tanár

¹ SZTE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet, Szeged 6720, Dóm tér 8,
Tel: 62-545136, Fax: 62-545971, <http://www.mdche.u-szeged.hu>

² MTA-SZTE Szupramolekuláris és nanoszerkezetű anyagok kutatócsoport

ABSTRACT

*The research of vasoactive peptides is more and more important because of their widespread effect. Blood-feeding arthropods produce vasoactive compounds in their salivary glands, they serve to counteract the hemostatic processes of the host, when the arthropod obtains a blood meal. The sand flies are vector of leishmaniasis, the major parasitic diseases with several hundred thousand cases occurring annually. In 1991 analysing the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia Longipalis* a 61-amino acid long peptide (containing 2 disulfide bridges) was isolated, which is 500 times more potent vasodilator than the calcitonin gene-related peptide (CGRP) and therefore later it was labelled as Maxadilan. Although there is a very little amino acid sequence homology with pituitary adenylate cyclase activating polipeptide, maxadilan acts as an agonist of type 1 receptor (PAC1) of PACAP and the maxadilan analogue (termed maxadilan 65; amino acids deleted in position 24-42) is a specific antagonist of PAC1. In this presentation the chemical synthesis and mass spectrometric analysis of 61 amino acid containing maxadilan (Maxa61) are described.*

Keywords: vasoactive peptides, Maxa61, Maxa65, PACAP receptors

ÖSSZEFOGLALÓ

Az érrendszerre hatást gyakorló peptidek (vazoaktív peptidek) vizsgálata egyre fontosabb és elterjedtebb a széleskörű hatásuk miatt. A vérrel táplálkozó ízeltlábúak, vazoaktív komponenseket termelnek nyálmirigyekben, amelyek a táplálkozás során a gazdaszervezet hemosztatikus folyamatait gátolják (véralvadásgátlás). A homoki légy a *leishmaniasis* parazita hordozója, amely az egyik legelterjedtebb, több százéves éves nagyságrendben előforduló parazitafertőzés okozója. 1991-ben a *Lutzomyia Longipalis* nyálmirigyait vizsgálva, egy 61 aminosavból álló, két diszulfid hidat tartalmazó polipeptidet izoláltak, amelyet később elneveztek Maxadilannak. Az izolált polipeptid 500-szor hatásosabb értágító hatással rendelkezett, mint az irodalomban addig közölt calcitonin-gén kapcsolt peptid (CGRP). Habár a Maxadilan nem mutat nagymértékű szekvencia analógiát a hipofízis adenil-cikláz aktiváló polipeptiddel (PACAP), a maxadilan a fent említett polipeptid 1-es típusú receptor agonistája, valamint a szekvencia módosított (24-42 közötti rész eltávolítva) maxadilan analóg (Maxadilan 65) specifikus antagonistája a PAC1 receptornak. Jelen prezentációban a 61 aminosavból álló Maxadilan (Maxa61) kémiai szintézisét, valamint tömegspektrometriás szerkezetigazoló vizsgálatait tárgyaljuk.

Kulcsszavak: vazoaktív peptidek, Maxa61, Maxa65, PACAP receptorok

1. IRODALMI ELŐZMÉNYEK

1.1. A maxadilan azonosítása

Az érrendszerre hatást gyakorló peptidek (vazoaktív peptidek) vizsgálata egyre fontosabb és elterjedtebb a széleskörű hatásuk miatt. A vérrel táplálkozó ízeltlábúak vazoaktív komponenseket termelnek nyálmirigyekben,

amelyek a táplálkozás során a gazdaszervezet hemosztatikus folyamatait gátolják (véralvadás-gátlás). A csípés következtében egy gyorsan kialakuló és hosszan tartó bőrpír illetve bőrgyulladás keletkezik, amelyet helyi véralvadás-gátlás kísér. A homoki légy (*Lutzomyia Longipalis*) a leishmaniasis parazita hordozója, amely az egyik legelterjedtebb, több százéves nagyságrendben előforduló parazitafertőzés okozója. Lerner és munkatársai azonosították a fent említett hatásért felelős molekulát. RP-HPLC segítségével a homoki légy nyál-extraktumait fracionálták, majd a megfelelő frakciókat kísérleti nyulak bőrébe injektálták. A tartós bőrgyulladást okozó frakcióban azonosítottak egy vazóaktív peptidet, amelyet maxadilannak neveztek el a kimagasló hatékonysága miatt. A maxadilan 500-szor hatásosabb értágító hatással rendelkezett, mint az irodalomban addig közölt kalcitonin-gén kapcsolt peptid (CGRP). Továbbá a maxadilan peptid pikogramnyi mennyisége emberi bőrbe injektálva, 48 órán át tartó bőrpírt valamint bőrgyulladást okozott.



1. ábra

A homoki légy (Lutzomyia Longipalis) táplálkozás közben

A CGRP valamint a maxadilan N-terminális felőli része hasonló szekvencia részt tartalmaz. Habár a Maxadilan nem mutat nagymértékű szekvencia analógiát a hipofízis adenil-cikláz aktiváló polipeptiddel (PACAP), a maxadilan a fent említett polipeptid 1-es típusú membrán receptor agonistája, valamint a szekvencia módosított (24-42 közötti rész eltávolítva) maxadilan analóg (Maxadilan 65) specifikus antagonistája a PAC1 receptornak. Amíg a PACAP aktiválja a VPAC1 és VPAC2 receptorokat, érdekes módon a maxadilannak nincs hatása az említett receptorokra. [1]

Maxadilan

CDATCQFRKAIDDCQKQAHHSNVLQTSVQTTATFTSMDTSQLPGNSVFKECMKQKKKEFKA

PACAP1-38

HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKKNK

PACAP1-27

HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVL

VIP

HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN

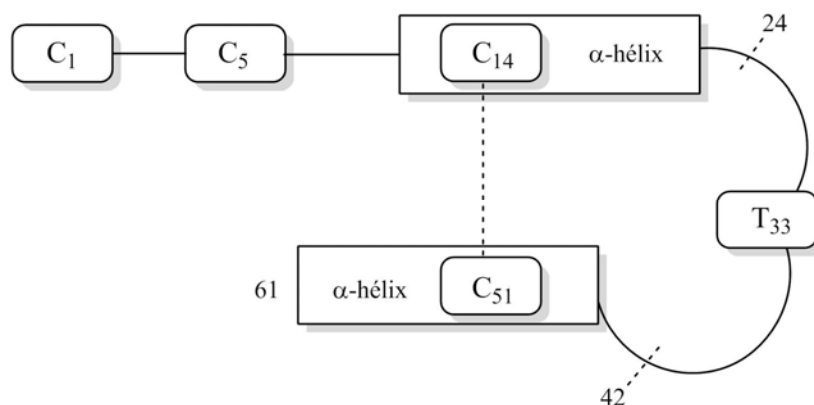
2. ábra

Szekvencia homológia

A PACAP számos fontos élettani hatással rendelkezik az élő szervezetben, amelyek közül a következőket említeném: neurotranszmitter, neuromodulátor, neuroprotektív, szerepe van a reprodukcióban, valamint az emésztőtraktusban is előfordul.

2. A MAXADILAN SZERKEZETE

A maxadilan egy 61 aminosavból álló polipeptid, amely 4 ciszteint tartalmaz 1, 5, 14 valamint 51 pozícióban, amelyek az 1-5 valamint 14-51 helyzetben található diszulfid hidakat alkotják. A peptid másodlagos szerkezete két α -hélix között elhelyezkedő β -redő alakzattal jellemezhető.



3. ábra
A maxadilan peptid szerkezete

A szerkezet-aktivitás kapcsolat vizsgálata során számos maxadilan módosítás készült el, valamint számos természetben előforduló variánszt vizsgáltak, amelyekből az alábbi következtetések vonhatók le:

- 1-5 diszulfid híd nem szükséges az agonista aktivitásához, de a 14-51 diszulfid híd módosításával elvész az aktivitás
- a β -redőben a 24-42 pozíció közötti szekvencia rész törlésével egy specifikus PAC1 receptor antagonistá, a Maxa65 állítható elő
- a C-terminális részen elhelyezkedő lizinek kezdeményezik a kölcsönhatást a PAC1 receptorral, míg a treonin-33 felelős a receptor aktiválásért. [2]

3. CÉLKITŰZÉS

Korábbi munkáink során előállítottuk a PACAP 1-38, 1-27 peptideket, illetve a 6-38 és 6-27 nem szelektív antagonistákat. A PAC1 receptor szelektív aktivitásvizsgálatára célul tűztük ki a Maxa61 mint PAC1 agonista, illetve Maxa65 mint PAC1 antagonistá peptidek előállítását, valamint tömegspektrometriás szerkezetigazoló vizsgálatait. A Maxa61 és Maxa65 vizsgálatával feltérképezhetjük az említett peptidek és a PAC1 receptor közötti kölcsönhatásokat.

4. SZINTETIKUS RÉSZ

4.1. A Maxadilan előállítása

A Maxa61 peptid szintézise szilárd fázisú peptid szintézis segítségével, Fmoc-védőcsoport stratégiát alkalmazva CEM Liberty automata peptid szintetizátor (CEM Liberty® Microwave Peptide Synthetiser) felhasználásával valósult meg. Az alkalmazott gyanta Tenta-Gel R-Ram, amelynek boritottsága 0,19 mmol/g, az előállítandó peptid mennyisége 0,1 mmol.

A Maxa61 szekvenciájának bonyolultsága és hosszúsága miatt, a szintézis során két különböző szekvencia résznél próbahasítást végeztünk a szekvencia ellenőrzése végett. A nyers peptid vizsgálata Agilent 1200 típusú RP-HPLC segítségével történt, Phenomenex Jupiter 10 μ C18 300A töltetű oszlop felhasználásával.

- hasítási körülmények: 5ml hasító elegy, 3,5 óra
- hasító elegy: TFA 88%, víz 10%, TIS 2%, DTT 5%
- eluens: (A) 0.1% TFA and (B) 80% MeCN, 0.1% TFA
- gradiens: 5-80% (B), 25 perc, 1,2 ml/perc, 220 nm

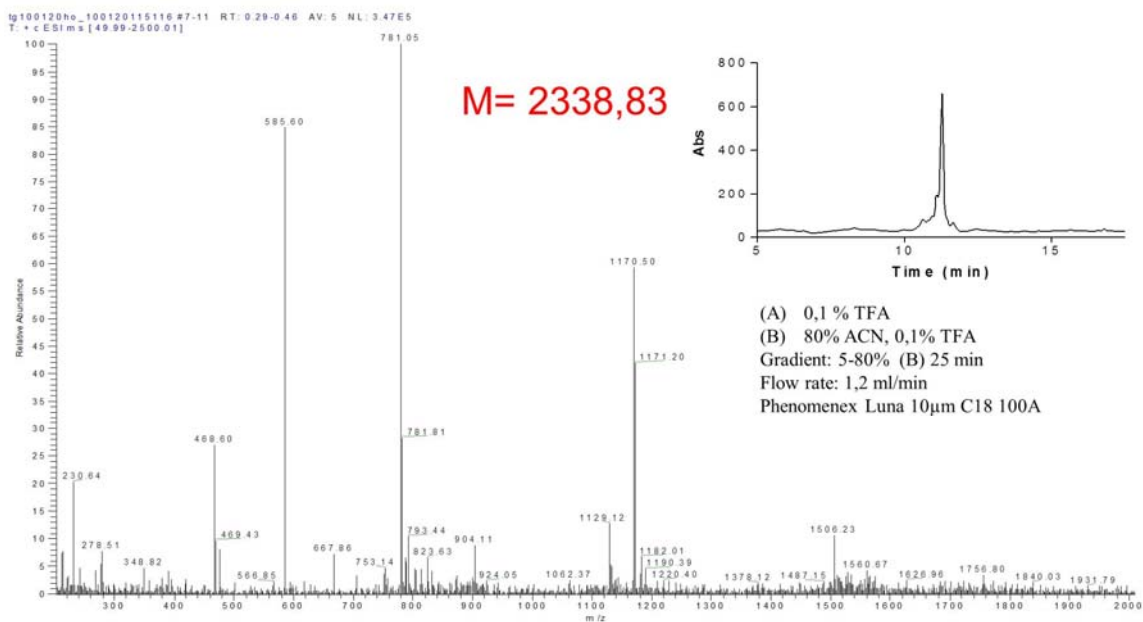
LPGNSVFKECMKQKKKEFKA-NH₂
(M = 2338,83)

NVLQTSVQTTATFTSMDTSQLPGNSVFKECMKQKKKEFKA-NH₂
(M = 4481,14)

CDATCQFRKAIDDCQKAHHSNVLQTSVQTTATFTSMDTSQLPGNSVFKECMKQKKKEFKA-NH₂
(M = 6869,76)

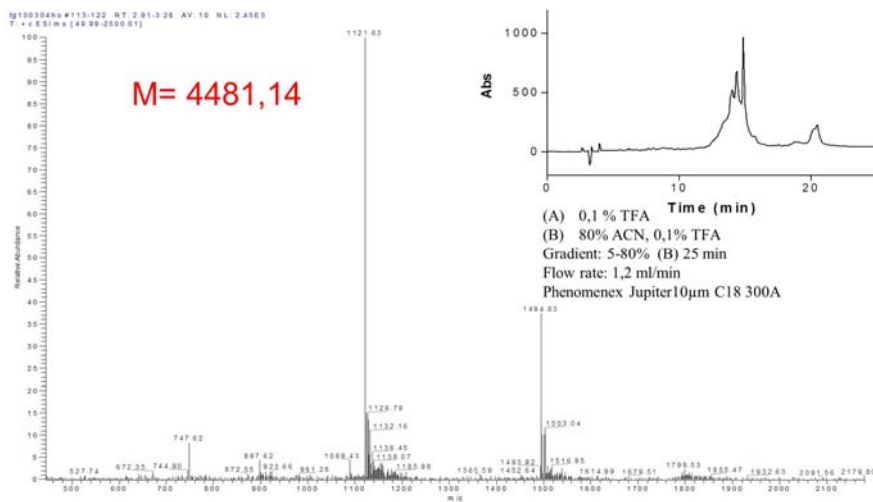
4. ábra
Ellenőrzött fragmensek

Az első próbahatás és ellenőrzés 20 aminosav kapcsolása után történt. Az ellenőrzött fragmens szekvenciája: LPGNSVFKECMKQKKKEFKA, M= 2338,83



5. ábra
LPGNSVFKECMKQKKKEFKA nyers fragmens kromatogramja, valamint tömegspektruma

A második próbahatás valamint ellenőrzés 40 aminosav kapcsolása után következett be. Az ellenőrzött fragmens szekvenciája: NVLQTSVQTTATFTSMDTSQLPGNSVFKECMKQKKKEFKA, M= 4481,14



6. ábra

NVLQTSVQTTATFTSMDSQLPGNSVFKECMKQKKKEFKA nyers fragmens kromatogramja, valamint tömegspektruma

A szintézis végeztével az elkészült peptid gyantáról való hasítása az előbbieken feltüntetett módon történt, majd az így előállított 56 mg nyers Maxadilan peptid tisztítása preparatív Knauer HPLC segítségével valósult meg.

Tisztítási körülmények:

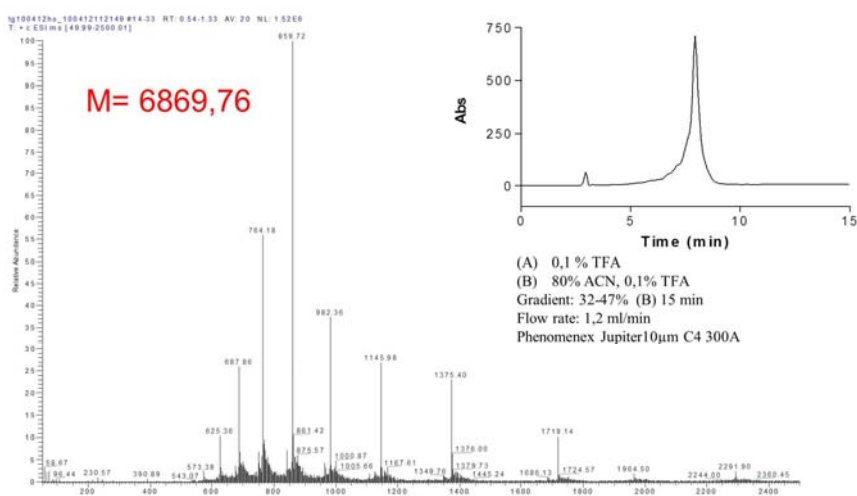
- eluens: (A) 0.1% TFA, (B) 80% MeCN, 0.1% TFA
- gradiens: 0-20% (B) 5 perc, 20-60% (B) 85 perc lineáris gradiens, 4.0 ml/perc áramlási sebesség, 220 nm, Phenomenex Jupiter 10µ C4 300A, 250 x 21 mm

A nyers peptid RP-HPLC tisztítása valamint liofilizálása után a tisztított Maxa61 tömege: 4 mg

Az előállított Maxa61 szekvenciája:

CDATCQFRKAIDDCQKQAHHSNVLQTSVQTTATFTSMDSQLPGNSVFKECMKQKKKEFKA,

M= 6869,76



7. ábra

A tisztított Maxa61 peptid kromatogramja, valamint tömegspektruma

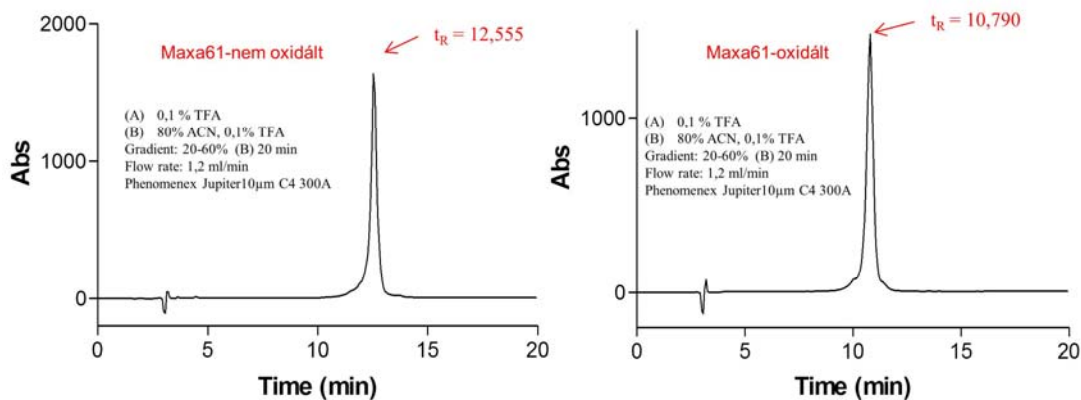
A Maxa61 CEM Liberty automata peptid-szintetizátor segítségével történő szintézisének végeztével, következetesként elmondhatjuk, hogy az első ellenőrzött nyers fragmens kromatogramja (20 aminosav kapcsolása után) valamint tömegspektruma optimálisnak tekinthető, minimális mellékreakciók keletkezése mel-

lett. A következő ellenőrzött nyers fragmens (40 aminosav kapcsolása után) kromatogramjában, valamint tömegspektrumában viszont melléktermékek keletkezését figyelhetjük meg, ami megnehezítette a következő 21 aminosav kapcsolását. Tekintve a szintézis következtében felmerülő nehézségeket valamint a szerény termelést, a továbbiakban a Maxa61 polipeptid előállítására egy új szintézis-stratégiát dolgoztunk ki.

A Maxa61 előállítása után a diszulfid hidak kialakítása következett. Erre a célra a már jól ismert jódos oxidációs eljárást alkalmaztuk. A Maxa61 nyers peptid (0,0073 mmol, 50 mg) vizes oldatát jód/ aceton oldattal (50 ml) színállandóságig titráltuk, a reakció előrehaladását RP-HPLC segítségével követtük. A nyers, oxidált Maxa61 RP-HPLC tisztítását követően, a tisztított anyag tömege: 2 mg.

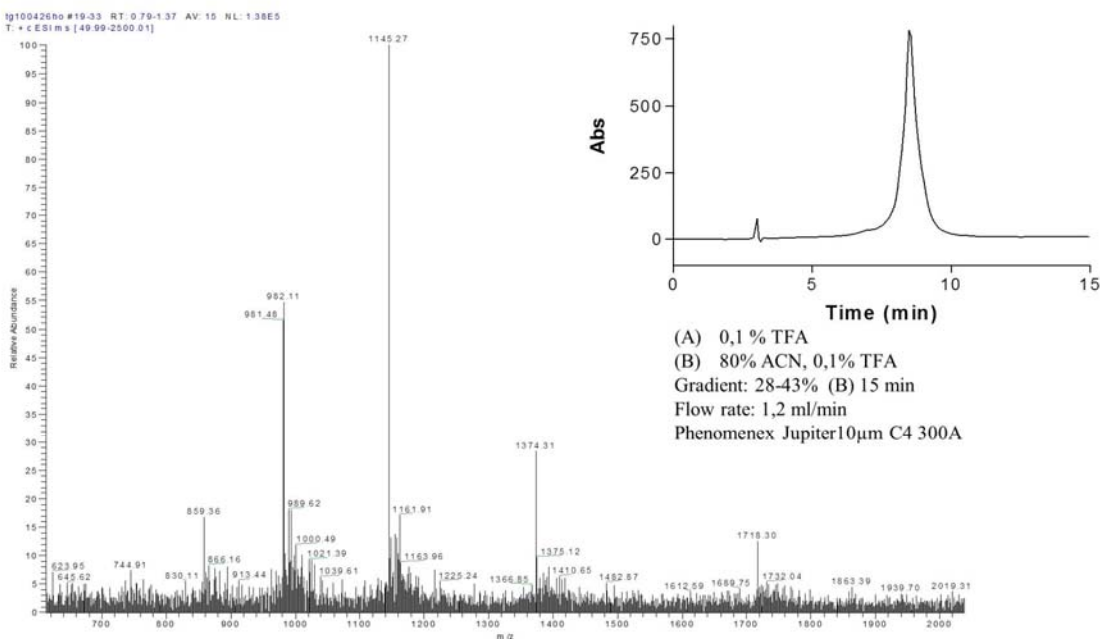
Tisztítási körülmények:

- eluens: (A) 0.1% TFA, (B) 80% MeCN, 0.1% TFA
- gradiens: 0-20% (B) 5 perc, 20-60% (B) 85 perc lineáris gradiens, 4.0 ml/perc áramlási sebesség, 220 nm, Phenomenex Jupiter 10 μ C4 300A 250 x 21 mm



8. ábra

A tisztított, nem oxidált Maxa61 (bal oldal), valamint a tisztított, oxidált Maxa61 (jobb oldal)



9. ábra

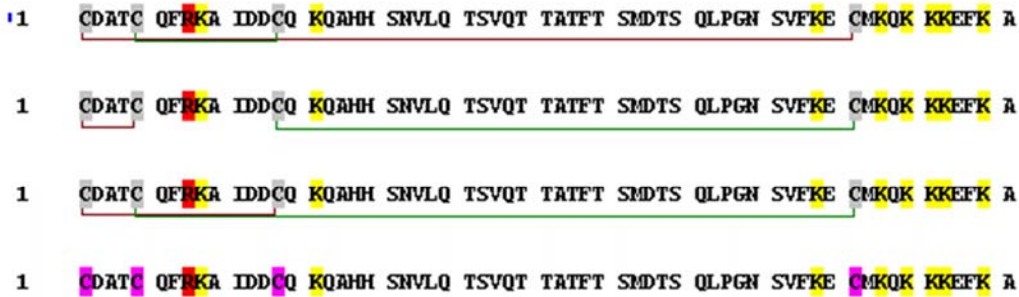
A tisztított, oxidált Maxa61 peptid kromatogramja, valamint tömegspektruma

4.2. A diszulfid hidak helyzetének igazolása

Mivel a Maxa61 peptid négy cisztein egységet tartalmaz 1, 5, 14, 51 helyzetben, az oxidációs lépést követően a két diszulfid híd három különböző variációban alakulhatott ki.

Average Mass = 6865.8202, Monoisotopic Mass = 6861.2652

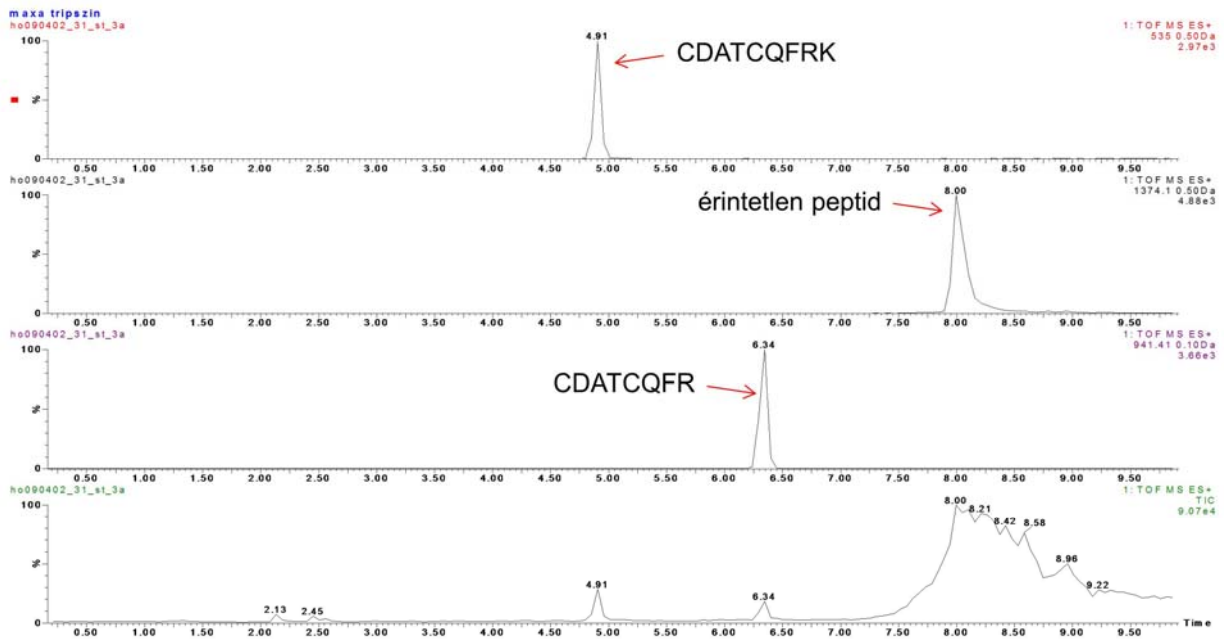
N-Terminus = H, C-Terminus = NH2



10. ábra

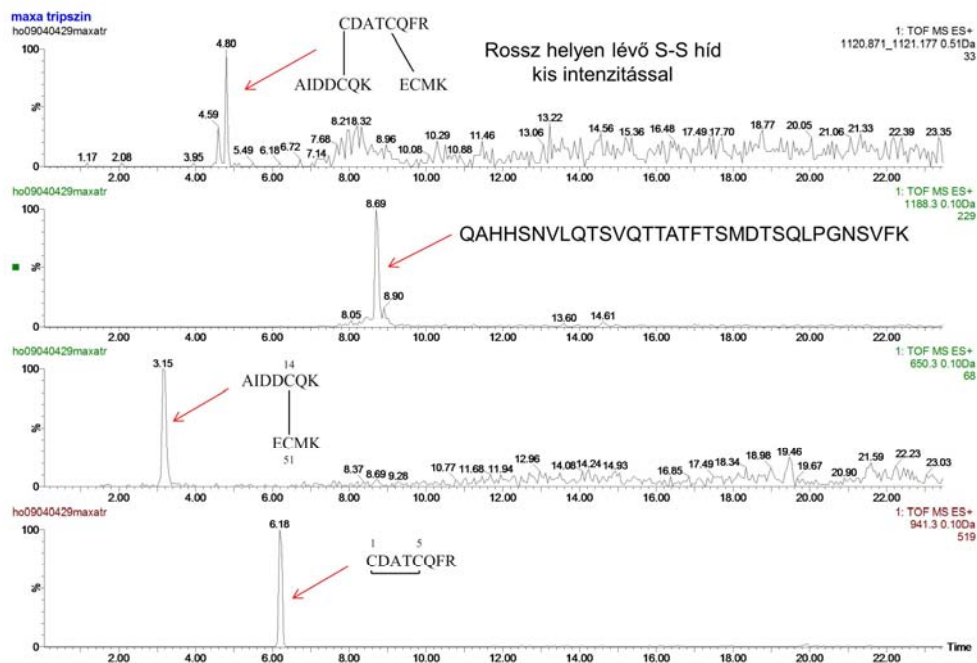
A diszulfid hidak kialakulásának lehetőségei

Annak érdekében, hogy meggyőződjünk arról, hogy a diszulfid hidak a megfelelő pozíciókban, az 1-5 illetve 14-51 helyzetben lévő ciszteinek között alakultak ki, a Maxa61 peptidet tripszines emésztésnek vetettük alá, majd a diszulfid hidat tartalmazó peptid fragmenseket egy tömegspektrométerhez kapcsolt RP-HPLC segítségével vizsgáltuk.



11. ábra

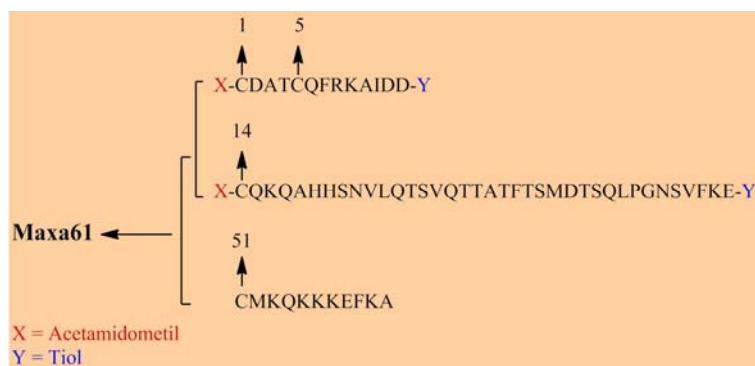
Az érintetlen peptid, valamint diszulfid hidat tartalmazó fragmensek tömegkromatogramjai



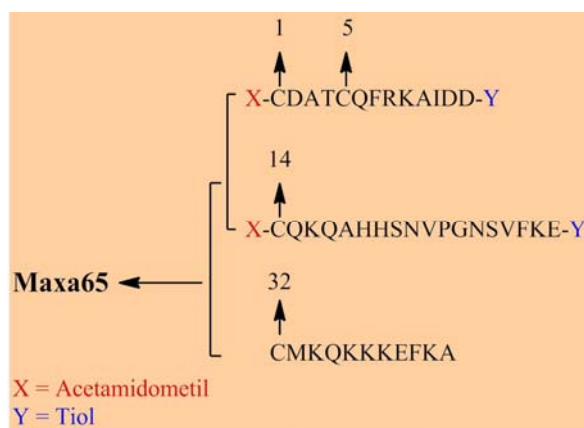
12. ábra
Hosszú tripszines hidrolízis után készített tömegkromatogramok

5. FOLYAMATBAN LÉVŐ SZINTÉZISEK, TOVÁBBI TERVEK

Tekintve a Maxa61 peptid szekvenciájának bonyolultságát illetve a szekvencia hosszúságát valamint a Maxa61 szilárd fázison történő szintézise során bekövetkezett nehézségeket, egy új, többlépéses szintézis tervet dolgoztunk ki a Maxa61 valamint a Maxa65 peptidok előállítására. A szintézishez MBHA gyantát (0,6 mmol/g) választottunk, amelyre első aminosavként egy Fmoc-ciszteint (Fmoc-Cys-Trt-OH) kapcsolunk. A kapcsolást követően a Fmoc-amino védőcsoportot eltávolítottuk piperidin/DMF felhasználásával, majd a szabadon maradt aminosoprotot ecetsavanhidrid segítségével acileztük. A következő lépésben a cisztein oldal-láncában lévő tritil védőcsoportot eltávolítottuk TFA/H₂O/DTT segítségével, majd az adott fragmens szintézisét a szabadon maradt tiol csoporton folytattuk, Boc szintézisstratégiát alkalmazva. Az említett védőcsoport stratégiát alkalmazva, szilárd fázisú peptidszintézis segítségével előállított peptid fragmenseket, natív kémiai ligáció segítségével egymáshoz kapcsoljuk, majd a megfelelő oxidációs lépést követően előállítjuk a Maxa61 és Maxa65 peptideket. [3] Az előállított peptid fragmensek natív kémiai ligációval való egymáshoz kapcsolása jelenleg folyamatban van.



13. ábra
A Maxa61 peptid szintézise natív kémiai ligáció segítségével



14. ábra

A Maxa65 peptid szintézise natív kémiai ligáció segítségével

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Szilárd fázisú peptidszintézis segítségével, a megfelelő védőcsoport stratégia alkalmazásával előállítottuk a Maxa61 (PAC1 agonista) 61 aminosavból álló, két diszulfid hidat tartalmazó peptidet, majd az ezt követő oxidációs lépés során a megfelelő helyen kialakuló diszulfid hidak jelenlétét tömegspektrometriás módszer segítségével igazoltuk.

A Maxa65 (PAC1 antagonist) szilárd fázisú szintézise, valamint szerkezetigazoló analitikai vizsgálatai jelenleg folyamatban vannak.

7. RÖVIDÍTÉSEK

TFA – trifluorecetsav; TIS – triizopropil-szilán; DTT – ditiotreitól; MeCN – acetonitril; DMF – dimetil-formamid; Fmoc – 9-fluorenil-metiloxi-karbonil; Boc – terc-butil-oxi-karbonil; MBHA – 4-metil-benzhidril-amin

FELHASZNÁLT IRODALOM

- [1] Ethan A. Lerner, Aurel O. Iuga, Vemuri B. Reddy; Peptides 28 (2007), 1651–1654
- [2] Vemuri B. Reddy, Yhong Li, Ethan A. Lerner; J Mol Neurosci (2008), 36, 241–244
- [3] Györgyi Váradi, Gábor K. Tóth, Zoltán Kele, László Galgóczy, Ádám Fizil, Gyula Batta; Chem. Eur. J. (2013), 19, 12684–12692

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0047

Kavitandok retenció tényezőjének hőmérsékletfüggése C_{18} és C_8 fordított fázisú állófázisokon

The Temperature Dependence of the Retention Factor of Cavitands on C_{18} and C_8 Reversed Stationary Phases in HPLC

Dependența termică a factorului de retenție a cavitandelor pe C_{18} și C_8 în faza staționară inversă pe HPLC

BARTÓ Endre¹, Prof. FELINGER Attila^{1,2,3}, Prof. KILÁR Ferenc^{1,3,4},
Dr. PRAUDA Ibolya^{1,3}, Dr. KISS Ibolya^{1,3}

¹Pécsi Tudományegyetem TTK Kémia Intézet Analitikai és Környezeti Kémia Tanszék,
H-7624 Pécs, Ifjúság útja 6., Tel.: +36 72 503 600, Fax: +36 72 501 518,
kemiaint@gamma.ttk.pte.hu <http://www.kemia.ttk.pte.hu/analitika>

²MTA-PTE Molekuláris kölcsönhatások az elválasztástudományban Kutatócsoport
H-7624 Pécs, Ifjúság útja 6. Tel.: +36 72 503 600, Fax: +36 72 501 518

³Pécsi Tudományegyetem Szentágothai Kutatóközpont
Analitikai Kémiai és Geoanalitikai kutatócsoport,
H-7624 Pécs, Ifjúság útja 20., Tel.: +36 72 501 500, Fax: +36 72 501654,
info@szkk.pte.hu, <http://www.szkk.pte.hu>

⁴Pécsi Tudományegyetem Bioanalitikai Intézet, H-7624 Pécs, Honvéd utca 1.,
H- 7624 Pécs, Szigeti út 12., Tel.: +36 72 536 255, Fax: +36 72 536 254, bioanalitika@aok.pte.hu,
<http://www.aok.pte.hu/bioanalitika>

ABSTRACT

Cavitands are cavity-shaped cyclic oligomers and they can create host-guest interactions. We have investigated the retention of two types of cavitands on different stationary phases (C_8 , C_{18}) with High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Our purpose was to ascertain the retention mechanism from van't Hoff equation. The slopes and the intercepts of the van't Hoff equation were used for calculations of thermodynamic constants for transfer of solute from the mobile phase to the stationary phase.

ÖSSZEFOGLALÓ

A kavitandok olyan, üreggel rendelkező makrociklusos vegyületek, amelyek alkalmasak úgynevezett gazda-vendég (host-guest) kölcsönhatásokra. Két, különböző típusú kavitand kromatográfiás viselkedését hasonlítottuk össze fordítottfázisú nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfiával (RP-HPLC) különböző állófázisokon (C_8 , C_{18}). A termodinamikai paramétereket a retenció tényező hőmérsékletfüggéséből a van't Hoff egyenlet alapján számoltuk.

Kulcsszavak: Kavitand, retenció tényező, retenció mechanizmus, van't Hoff egyenlet, fordított fázis.

1. BEVEZETŐ

A kavitandok olyan, üreggel rendelkező makrociklusos molekulák, amelyek szerves és szervetlen vegyületekkel egyaránt alkalmasak úgynevezett gazda-vendég (host-guest) kölcsönhatások kialakítására.

A makrociklusos ciklodextrineket, kalixaréneket, rezorcinaréneket reverzibilis komplexképző sajátosságuk miatt elterjedten alkalmazzák nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) állófázisok ligandumaként.

A szakirodalomban olvasottak szerint a rezorcinarén alapú kavitandokat három féle módon is alkalmazzák kromatográfiás állófázisként. Aromás helyzeti izomerek [7], [1], geometriai izomerek [6] és királis molekulák enantiomerjeinek [7] elválasztására a legtöbb esetben a szilikagélhez kémiaiilag kötött kavitandokat tartalmazó állófázisokat használnak. Egy másik alkalmazási lehetőség mozgófázis adalékként történő felhasználásuk [5], [9]. Pietraszkiwicz és munkatársai pirimidin bázisok elválasztását valósították meg C_{18} -as állófázisokhoz másodlagos kötőerőkkel kötött rezorcinarén származékokkal [4].

A rezorcinarén alapú kavítandók széleskörű kromatográfiai alkalmazásával ellentétben a kromatográfiai tulajdonságaik, viselkedésük vizsgálata nem elterjedt. Az irodalomban csupán egyetlen hivatkozást találunk, ahol kavítand származékot mintaként kromatográfiasan is vizsgáltak [8].

Munkánkban célunk az eltérő szerkezeti sajátságú kavítandók kromatográfiai viselkedésének tanulmányozása C_8 és C_{18} állófázison.

Valamely vegyület folyadékkromatográfiai viselkedéséért azok a kölcsönhatások felelősek, amelyek a vegyület és a kromatográfiai fázisok között alakulnak ki. Ezekért pedig az adott vegyület szerkezete, mindenekezlött funkciós csoportjai, valamint az álló és mozgó fázis minősége, elsősorban – de nem kizárólag – funkciós csoportjai tehetők felelőssé. A retenció mechanizmust a retenció tényező és a termodinamikai paraméterek közötti összefüggés segítségével vizsgálhatjuk. Japán kutatók a retenció tényező hőmérsékletfüggéséből számították a minták állófázishoz történő kötődésének entalpia-, entrópiaváltozását, valamint a folyamat hajtóerejét meghatározó szabadentalpia-változását, és ebből következtettek a retenció mechanizmusra [3].

2. KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

2.1. Kromatográfiai körülmények

A kísérleteinket, méréseinket Agilent 1290 Infinity típusú HPLC készüléken végeztük, amely kétcsatornás pumpával, légmentesítő egységgel, automata mintaadagolóval, kolonna termosztáttal és diódasoros detektorral volt felszerelve.

A méréseket izokratikus körülmények között végeztük, acetonitril és víz (55:45 v/v%) elegyét használva mozgófázisként.

Állófázisként teljesen porózus fordított fázisú oszlopokat használtuk:

1. Thermo Scientific BDS HYPERSIL C_{18} (100 mm × 4,6 mm, szemcseméret 3 μm , pórusátmérő 120 \AA)
2. Waters Xterra RP8 C_8 , (100 mm × 4,6 mm, szemcseméret 3 μm , pórusátmérő 131 \AA)

A hőmérsékletet 15–45°C között változtattuk. A detektálás hullámhossza minden esetben 230 nm volt. A minta koncentrációja 0,5 mg/ml, oldószere acetonitril volt. A méréseket 1 ml/perc áramlási sebesség mellett végeztük.

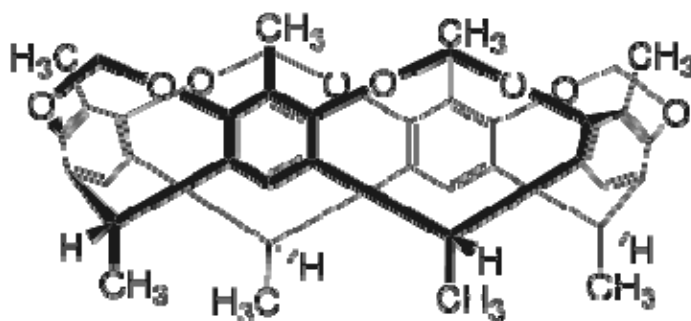
2.2. Szoftverek

A mérési adatokat az Agilent ChemStation Rev. B.04.03(16) szoftverrel értékeltük ki, a táblázatokat és az ábrákat pedig Microsoft Excel segítségével készítettük el. A mintáink molekula szerkezetének a felrajzolásában a Chemdraw program volt segítségünkre.

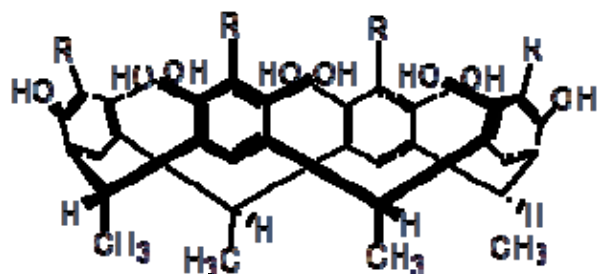
2.3. Felhasznált vegyszerek és minták

A kísérletben használt mozgófázis HPLC tisztaságú acetonitril és víz (Sigma) elegyből tevődött össze. A holtidőket tiokarbamidral (Sigma, 99%-os tisztaságú) határoztuk meg. Az általunk vizsgált mintákat a Pécsi Tudományegyetem Szervetlen Kémia Tanszékén állították elő.

Két típusú makrociklusos vegyületet vizsgáltunk, a felső részen hidrogént vagy metil-csoportot tartalmazó rezorcinaréneket és a merevebb szerkezetű 2-metil-kavítandot. A minták szerkezetét nézve látható, hogy a 2-metil-kavítand (1. ábra) felső peremén ellentétben a rezorcin[4]arénokkal (2. ábra) nincsenek szabad hidroxil csoportok, hanem helyettük az oxigéneket összekötő metilén hidak találhatóak. Ennek köszönhetően a 2-metil-kavítand nem csak szerkezetileg merevebb, hanem apolárisabb molekula is, mint a rezorcinarén származékok.



1. ábra
2-metil-kavitand szerkezete (Kavitand)



2. ábra

Rezorcinarén származékok szerkezeti képlete

$R = CH_3$; 2-metil-C-tetra-metilcalix[4]rezorcinarén (MRM)

$R = H$; C-tetra-metilcalix[4]rezorcinarén (HRM)

2.4. A folyadékkromatográfia termodinamikai jellemzői

Izokratikus elúciót alkalmazva a retenciós mechanizmus a retenciós tényező és a termodinamikai paraméterek közötti összefüggéssel értelmezhető. A minta adszorpciós folyamatának termodinamikai egyensúlyi állandója kifejezhető az állófázishoz kötődés közben bekövetkező szabadentalpia-változással az (1,2) egyenlet alapján:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K \quad (1,2)$$

$$\ln K = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (3)$$

$$\ln K = \ln k\beta = \ln k \frac{V_S}{V_M} \quad (4)$$

ahol ΔG a szabadentalpia-változást, ΔH az entalpiaváltozást, T az abszolút hőmérsékletet, ΔS az entrópiaváltozást, R az egyetemes gázállandót, K az egyensúlyi állandót, k a retenciós tényezőt, β a fázisarányt, V_M a mozgófázis térfogatát, V_S pedig az állófázis térfogatát jelöli.

A vizsgált minta retenciós tényezőjét a hőmérséklet függvényében ábrázolva a van't Hoff összefüggéshez jutunk:

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \frac{V_S}{V_M} \quad (5)$$

A retenciós tényező a (6) egyenlettel számolható, ahol t_R a retenciós idő, t_M pedig a holtidő:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (6)$$

A van't Hoff egyenlet azon a hőmérséklet tartományon belül lineáris, ahol az összefüggésben szereplő ΔH és ΔS értékek állandóak, tehát hőmérséklet függetlenek. Amennyiben ΔH és ΔS értéke hőmérsékletfüggő, úgy a van't Hoff egyenlet nem lineáris, hanem egy, a hőmérséklet értékeket is tartalmazó összetett kifejezés.

A retenciós tényezők természetes alapú logaritmusát ábrázolva az abszolút hőmérséklet reciprokának ($1/T$) függvényében, a kapott egyenes meredekségéből a minta állófázison történő megkötődésének entalpiaváltozása, valamint az egyenes tengelymetszetéből az entrópiaváltozása számolható. Az entalpia- és entrópiaváltozás pedig az (1) egyenlet alapján megadja a folyamat szabadentalpia-változását.

A van't Hoff egyenletből következően, ha a retenciós mechanizmus nem változik a hőmérséklet emelésével, akkor összehasonlíthatók az entalpia- és entrópiaváltozás értékek különböző minták esetén, azonos állófázison, illetve egyetlen minta esetén különböző állófázisokon.

3. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A kétféle rezorcinarén származék és a kavitand kromatogramjait szobahőmérsékleten, a kísérleti részben leírt körülmények között vettük fel, majd a minták retenciós tényezőjét és elúciós sorrendjét hasonlítottuk össze az eltérő lánchosszúságú alkilcsoporttal módosított szilikagél állófázisokon (C_8 , C_{18}).

A C₈-as töltetű oszlop oktilcsoportokat, a C₁₈-as töltetű oszlop pedig oktadecilcsoportokat tartalmaz ligandumként. A különböző gyártók által előállított oszlopok eltérő utókezelési eljárásokkal (pl. „endcapping”) készülnek, ennek következtében a felületi borítottságuk eltérő lehet.

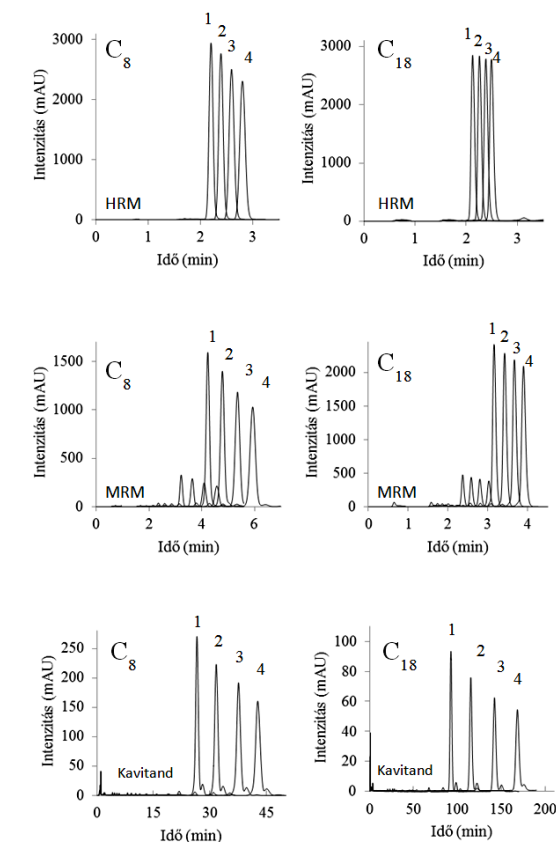
A kísérleti eredmények alapján a kavítand retenciós tényezője szobahőmérsékleten 10-szerese az MRM, és 25-szerese a HRM retenciós tényezőjének a C₈ töltetű oszlopon, valamint 50-szerese az MRM és 120-szorosa a HRM retenciós tényezőjének a C₁₈ töltetű oszlopon. Továbbá megfigyelhető, hogy a rezorcinarének és a kavítand fordított sorrendben eluálódnak a kétféle állófázison (1. táblázat).

1. táblázat: HRM, MRM és Kavítand retenciós tényezője C8 és C18 állófázison 25 °C-on

	Oszlop típusa	HRM	MRM	KAVITAND
Retenciós tényező (k)	Thermo Scientific BDS HYPERSIL C ₁₈	1,18	2,55	137,06
	Waters Xterra® RP ₈	1,37	4,05	35,35

A rezorcinarének és a kavítand eltérő kromatográfiai viselkedése eltérő szerkezeti sajátóságukból fakad, és ennek következtében különböző módon kötődnek az állófázisokhoz. Az állófázissal történő kölcsönhatás értelmezéséhez, a retenciós mechanizmus tanulmányozásához a mintákat különböző hőmérsékleten vizsgáltuk, kromatografáltuk. A 3. ábra mutatja az egyes minták egymásra vetített kromatogramját különböző hőmérsékleten és adott állófázison.

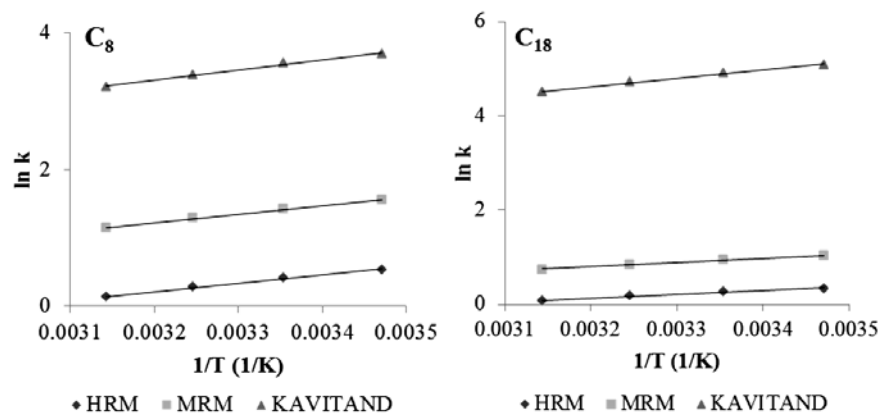
A retenciós idő a várakozásnak megfelelően minden minta és állófázis esetében az 1-es számmal jelölt 45°C-on volt a legkisebb, és a 4-es számmal jelölt 15°C-on volt a legnagyobb. A hőmérséklet csökkenésével a retenciós idő lineárisan növekedett. A kavítand retenciós ideje a C₁₈ töltetű oszlopon 93–168 perc, ezzel szemben a C₈ töltetű oszlopon 26–42 perc között változott.



3. ábra

A minták kromatogramja C₈ és C₁₈ állófázison.

(1. = 45°C; 2. = 35°C; 3. = 25°C; 4. = 15°C hőmérsékletet jelöli)



4. ábra

Kavitand, MRM és HRM retenciós tényezőinek hőmérsékletfüggése

A hőmérséklet reciprokanak függvényében ábrázoltuk a retenciós tényező természetes alapú logaritmusát (4. ábra), az egyenesek meredekségéből és tengelymetszetéből megkaptuk a folyamat entalpia-, illetve entrópiaváltozását (2. táblázat). Ismert, hogy minél erősebb a kölcsönhatás az állófázis és a vizsgált minta között, az entalpiaváltozás annál negatívabb. Míg a C_8 állófázison a minták entalpiaváltozása közel azonos érték, addig a C_{18} állófázison a kavitand entalpiaváltozása kétszer negatívabb a rezorcinarénok megfelelő értékéhez képest.

2. táblázat: HRM, MRM és Kavitand termodinamikai paraméterei C_8 és C_{18} állófázisokon.

Állófázis	Termodinamikai paraméterek	Minták		
		HRM	MRM	KAVITAND
C_8	ΔS (J/ K mol)	-26,64	-19,28	-7,82
	ΔH (kJ/ mol)	-10,16	-10,48	-12,33
	$T_{\text{átl}} \Delta S$ (kJ/ mol)	-8,07	-5,84	-2,37
	ΔG (kJ/ mol)	-2,09	-4,64	-9,96
C_{18}	ΔS (J/ K mol)	-16,03	-11,86	-5,37
	ΔH (kJ/ mol)	-6,61	-7,02	-14,90
	$T_{\text{átl}} \Delta S$ (kJ/ mol)	-4,86	-3,59	-1,63
	ΔG (kJ/ mol)	-1,75	-3,43	-13,27

Az anyagátadás a mozgófázisból az állófázisba annál kedvezményezettebb, minél pozitívabb az entrópiaváltozás. Mindkét állófázison 3–6-szor kisebb a kavitand $T\Delta S$ negatív értéke, mint a rezorcinarénok $T\Delta S$ szorzata. A folyamat szabadentalpia-változása ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) egy nagyságrenddel nagyobb negatív érték a kavitand esetén, mint a rezorcinarénok esetén, továbbá a rezorcinarénok ΔG értéke kisebb a C_8 állófázison, mint a C_{18} töltetű oszlopon.

4. ÖSSZEGZÉS

Munkánk során, méréseink alapján jelentős különbséget tapasztaltunk a rezorcinarén és a kavitand típusú makrociklusos vegyületek elúciós viselkedésében C_8 és C_{18} töltetű HPLC oszloponokon. A retenciós tényező

hőmérsékletfüggéséből számolt termodinamikai paraméterek számszerű értékei tükrözik a kavitand erősebb kötődését az általunk alkalmazott állófázisokon, elsősorban a C₈, de különösen a C₁₈ állófázison.

A jelenség pontosabb megértéséhez a méréseket megismételjük ugyanolyan utókezelési eljárással készült állófázisokkal, hogy kiküszöböljük a különböző gyártók által előállított oszlopok közti különbséget.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatás a következő támogatók segítségével valósult meg: Collegium Talentum, OTKA-K106044 és TÁMOP-4.2.2. A-11/1/KONV-2012-0065

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1] C. Ding, K. Qu, Y. Li, K. Hu, H. Liu, B. Ye, Y. Wu, S. Zhang, Preparation and characterization of six calixarene bonded stationary phases for high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1170 (2007) 73-81.
- [2] D.S. Jensen, T. Teutenberg, J. Clark, M.R. Linford, Elevated Temperatures in Liquid Chromatography, Part III: A Closer Look at the van 't Hoff Equation, *Lc Gc North America*, 30 (2012) 1052-+.
- [3] M. Kazusaki, T. Yamaguchi, Enthalpy-Entropy Compensation of Halogenated Benzylamines in Reversed-Phase Liquid Chromatography, in, *Chromatography -Tokyo- Society For Chromatographic Sciences*, 2006, pp. 57-62.
- [4] O. Pietraszkiewicz, M. Pietraszkiewicz, Separation of pyrimidine bases on a HPLC stationary RP-18 phase coated with calix 4 resorcinarene, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 35 (1999) 261-270.
- [5] T. Sokoliess, M. Gronau, U. Menyes, U. Roth, T. Jira, Separation of (Z)- and (E)-isomers of thioxanthene and dibenz b,e oxepin derivatives with calixarenes and resorcinarenes as additives in nonaqueous capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 24 (2003) 1648-1657.
- [6] T. Sokoliess, A. Opolka, U. Menyes, U. Roth, T. Jira, Separation of racemic drugs on chiral resorcinarene-bonded HPLC-columns, *Pharmazie*, 57 (2002) 589-590.
- [7] H.M. Tan, S.F. Soh, J. Zhao, E.L. Yong, Y. Gong, Preparation and application of methylcalix[4]resorcinarene-bonded silica particles as chiral stationary phase in high-performance liquid chromatography, *Chirality*, 23 (2011) E91-E97.
- [8] M. Urbaniak, W. Iwanek, Synthesis of alkoxymethyl derivatives of resorcinarene via the Mannich reaction catalysed with iminodiacetic acid, *Tetrahedron*, 62 (2006) 1508-1511.
- [9] L.M. Yuan, Effect of mobile phase additive on chiral separation, *Separation and Purification Technology*, 63 (2008) 701-705.

Kódolja-e a királis vegyületek tulajdonsága az enantiomer felismerést?

Is Encoded the Enantiomeric Recognition in the Properties of Chiral Compounds?

Este codificată recunoașterea enantiomerică în proprietățile compușilor chirali?

PÁLOVICS Emese¹, SZELECZKI Zsolt², FÓDI Balázs², FAIGL Ferenc², FOGASSY Elemér²

¹ MTA Szerves Kémiai Technológia Tanszéki Kutatócsoport,

² BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék, H-1111 Budapest, Budafoki út 8

ABSTRACT

To obtain the pure enantiomers is necessary to find the appropriate conditions and resolving agent. On the basis of our and others observations we can declare that exist correlation between behaviours of enantiomeric mixture and diastereoisomers, and the eutectic compositions of enantiomeric mixtures of racemic compound and resolving agent influence the average ee value of enantiomers isolated from diastereoisomers.

ÖSSZEFOGLALÁS

A tiszta enantiomerek előállításánál meghatározó a megfelelő rezolválóagens kiválasztása, valamint az optimális körülmények megtalálása. Saját és más kutatók megfigyeléseit alapul véve kijelenthetjük, hogy az enantiomer- s diasztereomerkeverékek viselkedését a rezolválásokban résztvevő (racém vegyület és rezolválóagens) enantiomerkeverékek átlagos eutektikus összetétele határozza meg. A rezolválás során kapott diasztereomer sókból elkülönített enantiomerek átlagos enantiomertisztasága megegyezik a nagyobb értékű átlagos enantiomer tisztaságokkal.

Kulcsszavak: rezolválás, rezolváló ágens, racém vegyület, eutektikus összetétel, enantiomer-keverékek

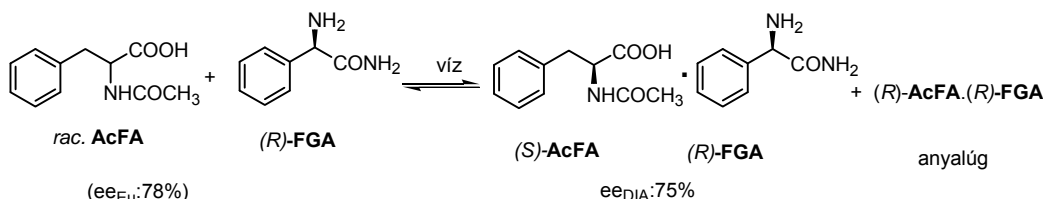
BEVEZETÉS, ELŐZMÉNYEK

Az élő szervezet különböző módon reagál különböző enantiomerekre (citrom- ill. narancsillatú Limonén enantiomerek, keserű ill. édes Aszparagin enantiomerek, különböző terápiás hatású enantiomerek). Ez nem meglepő, hiszen az élő szervezet építőkövei (RNS, DNS, fehérjék, cukrok amelyek szintén enantiomerek) ezekkel az enantiomerekkel diasztereomereket képeznek, melyek megoszlanak két fázis között (szilárd-gáz, szilárd-folyadék). Az élő szervezetek ezen receptorai rezolválóagensként viselkednek, melyek válogatnak az enantiomerek között. Kérdés, hogy az enantiomerek válogathatnak-e? A kérdés megválaszolásához ismernünk kell az enantiomer keverékek (a legegyszerűbb keverék) viselkedését, amelynek két fázis közötti megoszlását nem lineáris összefüggések jellemzik [1]. Megállapíthatjuk, saját és mások munkáinak eredményeit [2-11] tanulmányozva, hogy az enantiomerkeverékek molekulaszervezetüknek megfelelő, szupramolekuláris felépítésű asszociátumokat képeznek, melyekre jellemző az összetételük (az arányuk). Az eutektikum esetén mind a szilárd mind olvadék enantiomer aránya azonos. Ez érvényes minden esetben mikor az enantiomer keverékek valamilyen oknál fogva (körülmények, kémiai reakció) két fázis közötti megoszlásra kerül sor.

Az esetek túlnyomó részében az elválasztások során idegen királis vegyületet (rezolválóagenst) alkalmazunk amikor diasztereomerek keletkeznek, amelyeket valamilyen módon szintén két fázis közötti megoszlásra kell kényszerítenünk.[2-10] Feltételeztük, hogy a diasztereomerek keverékeire ugyanaz a viselkedés a jellemző.

Hogy ezt alátámasszuk, először olyan rezolválóagenst alkalmaztunk, amely rokon molekulaszervezetű a racém vegyület enantiomerjével. Az elvégzett kísérletek eredményei alapján, azt találtuk, hogy a kapott kristályosan kivált diasztereomerek konfigurációinak (homo- ill. heterokirális) aránya (17%:83%) jól egyezik az

enantiomerkeverékeknel becsült aránnyal (20%:80%) [4]. Tehát kvázi konglomerátum ill. racemát viselkedésűek. Ugyanakkor a kristályosan kivált diasztereomerekből elkülönített enantiomerek átlag tisztasága jól közelíti a racém vegyület enantiomerkeverékének eutektikus összetételét.



1. ábra

A racém acetil-fenilalanin rezolválása a rokon szerkezetű FGA enantiomerrel

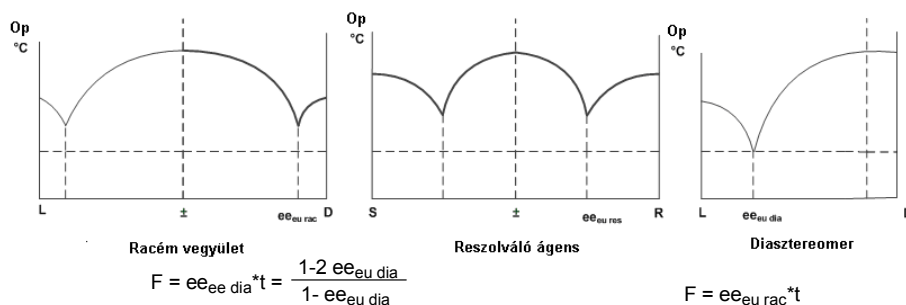
Összehasonlítva a racém AcFa rokon molekulaszereztű rezolválóágensekkel (8 rezolválás eredménye) kapott diasztereomerek enantiomertisztaságainak átlagát (82%), azt tapasztaltuk, hogy ez jól közelíti a racém vegyület eutektikus összetételét (78%).

A következő kérdés az volt, hogy milyen összefüggést tapasztalunk akkor, ha a rezolválóagens nem feltétlenül rokon molekulaszereztű a racém vegyület enantiomerjével. Ezért összehasonlítottuk 45 rezolválás eredményeit és azt tapasztaltuk, hogy a kiváló diasztereomerekből elkülönített enantiomer keverékek enantiomertisztaságainak (ee_{Dia}) az átlaga (78%) és a kiindulási racém vegyületek enantiomerkeverékének kimért eutektikus összetételeinek (ee_{EuRac}) az átlaga (73%) igen közeli értéket ad. Azokban az esetekben (29 rezolválás) amikor a rezolválóágensek enantiomerkeverékének eutektikus összetétele (ee_{EuRes}) magasabb volt, a kristályosan kiváló diasztereomerekből elkülönített enantiomer keverékek (ee_{Dia}) összetételének az átlaga (80%), az előbbieknél is jobban egyezik a rezolválóágensek enantiomerkeverékére jellemző eutektikus összetételek átlag értékével (78%) (1. táblázat) [13].

1. táblázat: A korábban elvégzett rezolválások átlag eredményei

Kísérletek száma	ee_{EuRac} (átlag)%	ee_{EuRes} (átlag)%	ee_{Dia} (átlag)%	F
45	73	-	78	0.56
29	-	78	80	0.54

Tehát amellett, hogy a diasztereomerek keverékének olvadási biner fázisdiagramjának eutektikus összetétele (ee_{EuD}) és az F (rezolválhatóság) között összefüggést [12] (2. ábra) állapítottunk meg, láthattuk, hogy vagy a racém vegyület vagy pedig a rezolválóagens enantiomerkeverékének eutektikus összetétele meghatározza a keletkezett diasztereomer enantiomertisztaságát is.



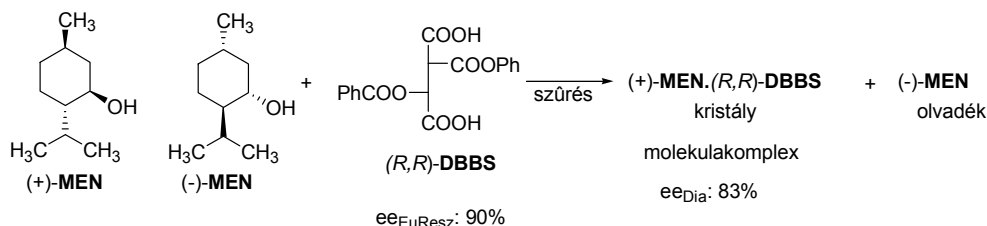
2. ábra

A racém vegyületek és rezolválóágensek enantiomerkeverékének hatása a belőlük keletkezett diasztereomerkeverékek enantiomertisztaságára az olvadási biner fázisdiagramokon ábrázolva.

Természetesen az elválasztások során nemcsak a kiindulási molekulák tulajdonságai játszanak fontos szerepet, hanem az alkalmazott elválasztási módszer és a körülmények is. A diasztereomerkeverékek elválasztására hasonló módszerek alkalmazhatóak, mint az enantiomerkeverékek esetében.

DIASZTEREOMEREK ELVÁLASZTÁSA OLVADÉK-KRISTÁLYOSÍTÁSSAL

A diasztereomerek keverékei is elválaszthatók olvadék-kristályosítással, ha megolvasszjuk a racém vegyület és rezolválóagens keverékét, és az olvadék hűtésekor a stabilabb szerkezetű, gyorsabban kristályosodó diasztereomer kialakulása teszi lehetővé az elválasztást (ha mód van rá, akkor szűréssel elkülönítjük a kristályosan kivált diasztereomert). Erre példaként a Mentol (**MEN**) és a **DBBS** olvadékából történő **MEN-DBBS** molekulakomplex kristályosodását mutatjuk be [13] (3. ábra). Tehát megállapíthatjuk, hogy nemcsak a diasztereomer sókra érvényes ez a viselkedés, hanem általában a diasztereomerekre (a molekulakomplexekre, koordinációs komplexekre).

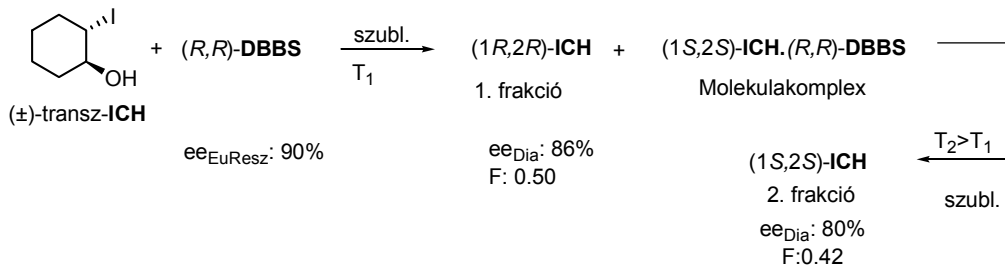


3. ábra

Elválasztás olvadékból való kristályosítással

DIASZTEREOMEREK ELVÁLASZTÁSA FRAKCIONÁLT SZUBLIMÁCIÓVAL

Egy másik elválasztási mód, amikor 2-jód-transz-ciklohexanol (**ICH**) **DBBS**-el végzett rezolválásakor szilárd-szilárd reakcióval keletkezett diasztereomerek keverékét (három hónapi várás után) vákuumban frakcionáltan szublimáljuk [15]. Azt tapasztaltuk, hogy mind az első mind pedig a második frakcióban kapott molekulakomplex (itt is molekulakomplex keletkezik) enantiomertisztasága közelíti a rezolválóagens eutektikus összetételét (4. ábra).

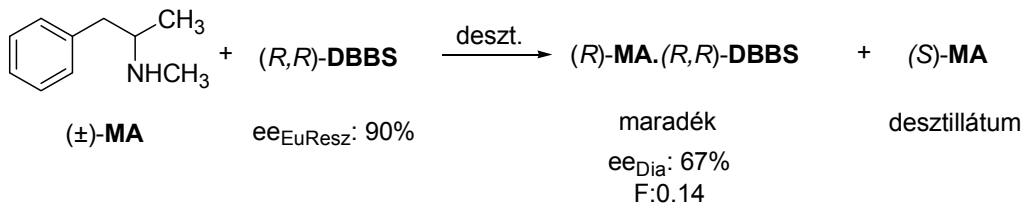


4. ábra

Diasztereomer keverék elválasztása frakcionált szublimációval.

DIASZTEREOMEREK ELVÁLASZTÁSA DESZTILLÁCIÓVAL

A racém metil-Anara (**MA**) félekvivalens mennyiségű **DBBS**-el olvadékból (5. ábra) a kristályosodást követően vákuumban történő desztillációval elválasztható [16], kidesztillálható a keverékből az egyik enantiomer és a visszamaradó diasztereomer elválasztásával megkapjuk a másik enantiomert is. A diasztereomer enantiomertisztaságát a rezolválóagens eutektikus összetétele határozza meg.

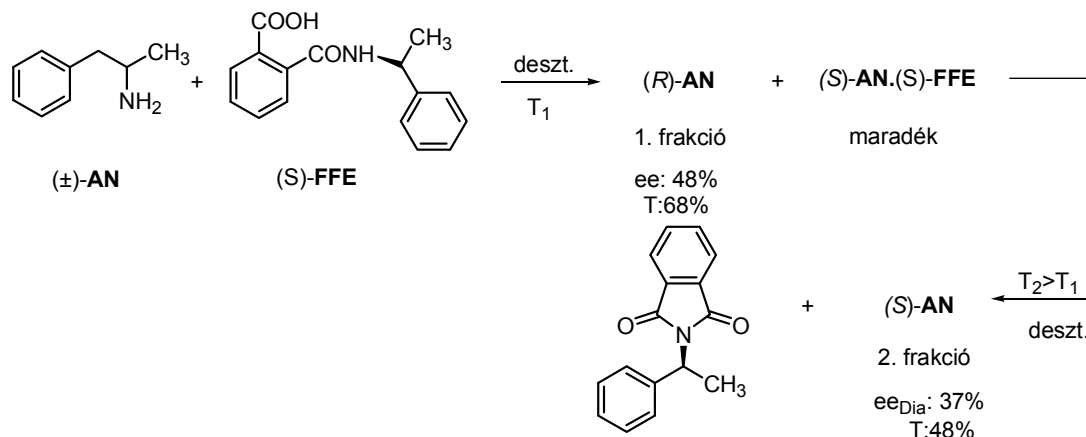


5. ábra

Diasztereomer keverék elválasztása desztillációval

DIASZTEREOMER ELVÁLASZTÁS A KEVERÉK FRAKCIONÁLT DESZTILLÁCIÓJÁVAL

Ez a módszer frakcionált elválasztásra is alkalmas akkor, hogyha a rezolválóagensünk ugyancsak sót képez és ez a só képes károsodás nélkül elbomlani. Erre példa a racém Anara (AN) rezolválása a lényegében rokon molekulaszervezetű FEA-nak a ftaloilezett származékával (FFE). A kristályosodást követően vákuumban a szabadon maradt FEA enantiomert desztilláljuk, majd magasabb hőmérsékleten a diasztereomer sónk elbomlik, és így az eddig megkötött enantiomer kidesztillálható [17] (6. ábra). A diasztereomer enantiomertisztaságát mind az első mind pedig a második frakcióban feltételezhetően a rezolválóagens eutektikus összetétele határozza meg.

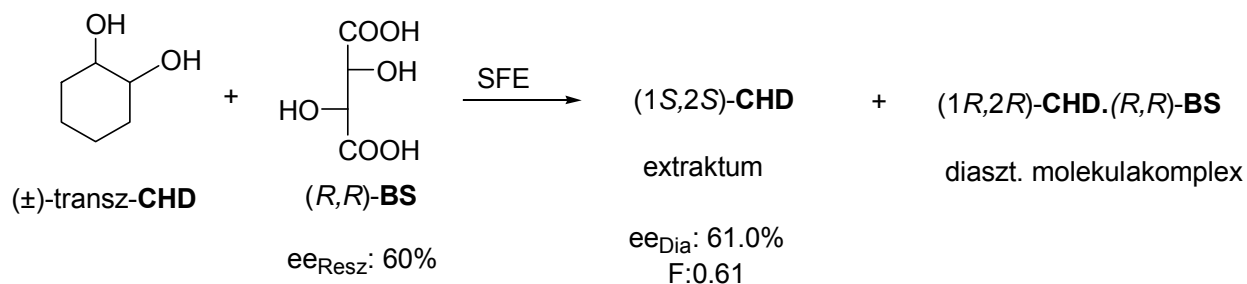


6. ábra

Diasztereomer keverék elválasztása frakcionált desztillációval

EXTRAKCIÓ SZUPERKRITIKUS ÁLLAPOTÚ CO₂-AL

Természetesen a racém vegyület és rezolválóagens keverékéből a kristályosodást követően extrakcióval is eltávolíthatjuk a szabadon maradt enantiomer hányadot és az extrakciót szuperkritikus állapotú fluidummal (CO₂) is el lehet végezni (7. ábra). Ebben az esetben a kapott diasztereomer enantiomertisztasága nagyon jól közelíti a rezolválóagens eutektikus összetételét.

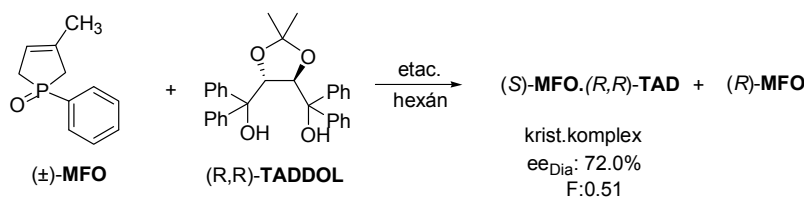


7. ábra

Extrakció szuperkritikus állapotú CO₂-al

MOLEKULAKOMPLEXEK ELVÁLASZTÁSA FRAKCIONÁLT KRISTÁLYOSÍTÁSSAL

Nemcsak C kiralitáscentrumot tartalmazó racém vegyületek rezolválása oldható meg ilyen módszerekkel hanem pl. P kiralitáscentrumot tartalmazó vegyületek is elválaszthatók így. Például egy sor 3-metilfoszfolén származék elválasztásánál a rezolválóagenssel molekulakomplexet képezhetnek az enantiomerek, majd a stabilabb molekulakomplexet képező diasztereomer kikristályosodik és szűréssel elkülöníthető [18] (8. ábra). A kapott enantiomer tisztaságát itt is feltételezhetően a rezolválóagens eutektikus összetétele határozza meg.

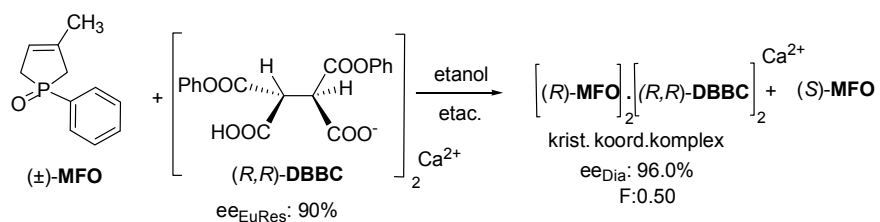


8. ábra

Molekulakomplexek elválasztása frakcionált kristályosítással

KOORDINÁCIÓS KOMPLEX DIASZTEREOMEREK ELVÁLASZTÁSA

Más esetben a P heteroatomot tartalmazó gyűrűs királis vegyületek koordinációs komplex képzéssel keletkező diasztereomerek elválasztásával is enantiomerkeverékekre bonthatók. Rezolválóágensként a **DBBS** Ca vagy Mg sóit használhatják [19] (9. ábra). A diasztereomer enantiomertisztaságát a rezolválóágens eutektikus összetétele határozza meg.

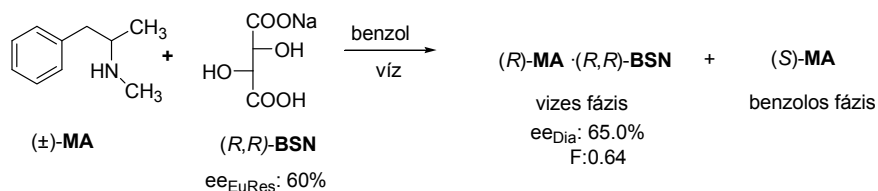


9. ábra

Koordinációs komplexekek elválasztása frakcionált kristályosítással

KÉT OLDÓSZERFÁZIS KRISTÁLYOSÍTÁS NÉLKÜL

Lehet olyan diasztereomer elválasztás is, hogy két folyadék fázis között jön létre a megoszlás. Erre példa a racém metil-anara (**MA**) rezolválása félekvivalensnyi **BS**-nak a mono-Na sójával [20] (10. ábra). Az elért enantiomertisztaságot ebben az esetben is a rezolválóágens eutektikus összetétele határozta meg.

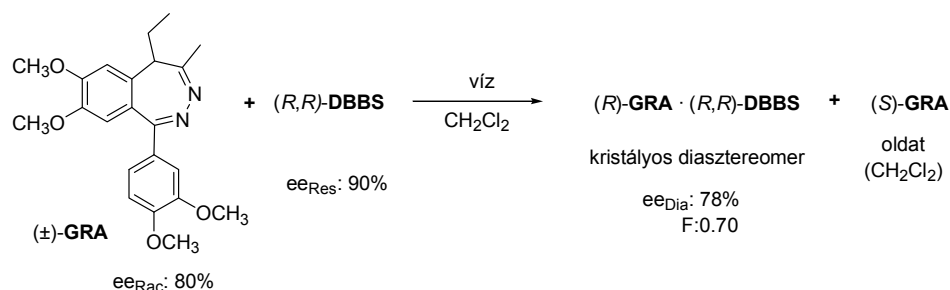


10. ábra

Két oldószerfázis közötti megoszlás kristályosítás nélkül

KÉT OLDÓSZERFÁZIS KRISTÁLYOSODÁSSAL

A két oldószerfázis abban az esetben, hogyha kristályosodással jár a diasztereomer keletkezése és nem oldódik egyik fázisban sem, különösen jó enantiomerelválasztást is biztosíthat. Erre példa a racém Grandaxint rezolválása félekvivalens mennyiségű **DBBS**-al víz és kloroform (vagy DKM, DKE) keverékében [21] (11. ábra). A kapott enantiomertisztaságot mindkét kiindulási molekula eutektikus összetétele befolyásolta.

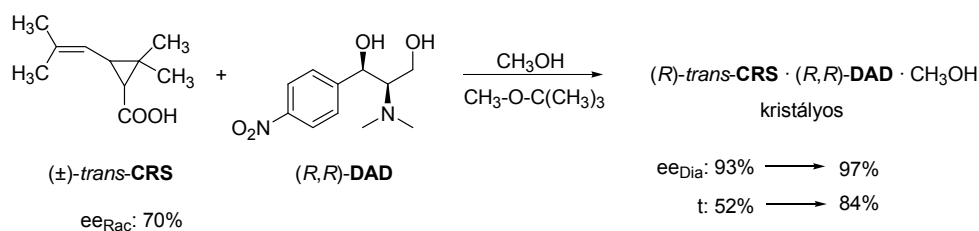


11. ábra

Két oldószerfázis közötti megoszlás kristályosítással

DIASZTEREOMER KRISTÁLYOSÍTÁS SZOLVÁTKÉPZÉSEL

Nagyon gyakori a diasztereomerek elválasztása során, hogy csak akkor kedvező az enantiomer elválasztás enantiomer tisztasága és a termelés mértéke, ha szolvát képzéssel történik a diasztereomer kristályosítása [22] (12. ábra).

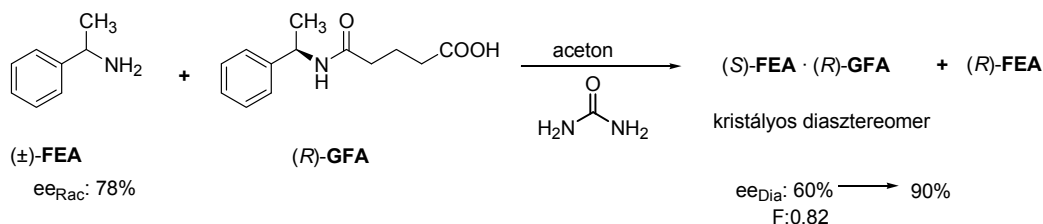


12. ábra

Diasztereomer kristályosítás szolvátképzéssel

A DIASZTEREOMER KRISTÁLYOSODÁSA AZ AKIRÁLIS HOZZÁTÉTEN INDUL

Abban az esetben, ha a rezolválóagens egy részével rokon molekulaszervezetű akirális vegyületet is alkalmazunk, akkor jobb enantiomertisztaságot érhetünk el, amit a racém vegyület enantiomerkeverékének az eutektikus összetétele határoz meg [23] (13. ábra).



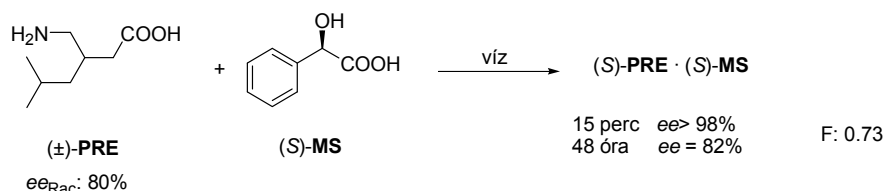
13. ábra

Akirális hozzátét alkalmazása előnyös a diasztereomer elválasztásra

AZ IDŐ SZEREPE

Kinetikus kontroll érvényesülése

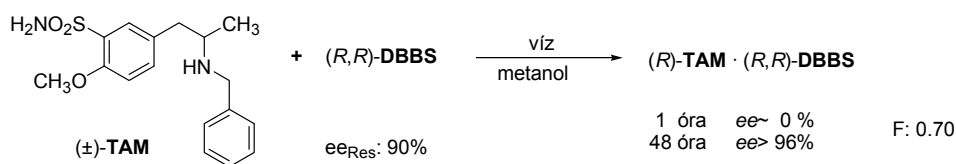
Nemcsak az oldószer, vagy az alkalmazott módszer megválasztása fontos, hanem az időnek is meghatározó szerepe van. A racém Pregabalin (**PRE**) rezolválásakor (*S*)-**MS**-al vizes közegben a kinetikus kontroll érvényesülését tapasztaltuk [24] (14. ábra). A racém vegyület enantiomerkeverékének az eutektikus összetétele lesz a meghatározó még a termodinamikai egyensúly beálltakor is.



14. ábra
Kinetikus kontroll érvényesülése

Termodinamikus kontroll érvényesülése

Ugyanakkor a Tamsulozin (**TAM**) egyik intermedierjének a rezolválása során a termodinamikus egyensúly beállta eredményezte a megfelelő enantiomertisztaságot, melyet a rezolválóagens eutektikus összetétele kódolt [25] (15. ábra).



15. ábra
Termodinamikus kontroll érvényesülése

Összehasonlítva a bemutatott rezolválások során kapott átlag enantiomertisztaságokat a racém vegyületeink ill rezolválóágensek eutektikus összetételeinek az átlagával, azt tapasztaltuk, hogy az elválasztási módszertől függetlenül a diasztereomerekből elkülönített enantiomerek tisztaságát kódolja a kiindulási vegyületek tulajdonsága, eutektikus összetétele (2. táblázat).

2. táblázat: Az elvégzett kísérletekben résztvevő vegyületek átlag ee értékei

A kísérletek száma	$ee_{\text{EuRac}}/ee_{\text{EuRes}}$ Átlag értékei	ee_{Dia} Átlag értékei	F Átlag értékei
13 (10*)	80%	78%	0.58

*A kiindulási molekulák nem rokon molekulaszervezetűek

KÖVETKEZTETÉSEK

Az elválasztások során meghatározó az enantiomerkeverékek szimmetriára való törekvése, melynek következménye a két fázis közötti megoszlás. A keverékekre jellemző eutektikus összetétel megszabja, hogy melyik fázisba kerüljön a szimmetrikusabb és melyikbe az aszimmetrikusabb asszociátum. Ugyanez a törekvés a meghatározó idegen királis molekula jelenlétekor, viszont a magasabb eutektikus értékkel rendelkező vegyület hatása lesz a domináns.

Mind a királis-királis felismerés mind pedig a szimmetriára való törekvés elősegíti az enantiomerelválasztást illetve a terápiás hatást. Ugyanakkor a kívánt eredmény eléréséhez a résztvevő enantiomerek geometriája és töltéseloszlása is megfelelő kell legyen, hiszen a komplementaritásukkal a szimmetriára való törekvést segíti, amely az élet mozgató rugója is.

Mindezek alapján nagy valószínűséggel a királis molekulák felépítésükben és térszerkezetükben hordozzák a részvételükkel lejártszódó királis-királis folyamatok kódját is.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetet mondanak az OTKA (K 104769 és K 104528), valamint a Richter Centenárium Alapítvány által nyújtott anyagi támogatásért.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Pálovics E, Fogassy E, Schindler J, Nógrádi M., *Chirality* 2007/19, 1-4 ,
- [2] Newman P., *Optical resolution procedures of chiral compounds 1-3*, NY, 1978-1984.
- [3] Wilen S. H., *Topics in Stereochemistry*, (ed. By E. L. Eliel), Wiley-Interscience, New York. 1972/ 6, 107.
- [4] Jaques J., Wilen S. H., Collet A., *Enantiomers Racemates and Resolution*, Wiley-Interscience, N.Y, 1981.
- [5] Faigl F. Kozma D., *Enantiomer Separation: Fundamentals and Practical Methods*, (Ed. F. Toda), Kluwer Academic Press, Dordrecht, 2004, 73.
- [6] Fogassy E., Nógrádi M., Pálovics E., Schindler J., *Synthesis*, 2005/10, 1555.
- [7] Fogassy E., Nógrádi M., Kozma D., Egri G., Pálovics E., Kiss V., *Org. Biomol. Chem*, 2006/16, 3011.
- [8] Faigl F., Fogassy E., Nógrádi M., Pálovics E., Schindler J., *Tetrahedron: Asymm.*, 2008/4, 519.
- [9] Sheldon R. A., *Chirotechnology*, Marcel Dekker Inc. New York, 1993.
- [10] Wilen S.H., Collet A., Jaques J., *Tetrahedron*, 1977/33, 2725.
- [11] Kobayash Y., Kodama K., Saigo K., *Org. Lett.*, 2004/17, 2941.
- [12] Kozma D, Pokol G., Ács M.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, 1992/ 2, 435
- [13] Pálovics E., Szelezky Zs., Faigl F., Fogassy E., New trends and strategies in the chemistry of advanced materials, (Ed. S.G. Muntean, R. Tudose) 2013, 74-79.
- [14] Simon K, Vincze Z, Marthi K, Lévai G, Pokol Gy, Fogassy E, Kozma D: *J. Therm. Anal.Col.*2004/75, 787.
- [15] Kassai Cs, Kozma D, Fogassy E: *Synth. Commun.* 2006/36, 1015.
- [16] Ács M, Mravik A, Fogassy E, Böcskei Zs.: *Chirality*, 1994/6, 314.
- [17] Molnár P, Thörey P, Bánsághi Gy, Székely E, Poppe L, Tomin A, Kemény S, Fogassy E, Simándi B: *Tetrahedron:Asymm.*, 2008/19, 1587
- [18] Novák T, Schindler J, Ujj V, Czugler M, Fogassy E, Keglevich Gy: *Tetrahedron:Asymm.*, 2006/17, 2599
- [19] a).Ujj V, Schindler J, Novák T, Czugler M, Fogassy E, Keglevich Gy: *Tetrahedron:Asymm.*, 2008/19, 1973
- [20] Ács M, Kozma D, Fogassy E: *ACH. Mod. Chem.*, 1995/132, 475.
- [21] Fogassy E, Tóth G, Simon K, Láng T, Ladányi L, Párkányi L.:*J. Mol. Struct.*, 1978/147,143.
- [22] Ács M, Kozma D, Kozsda É, Keserű Gy, Böcskei Zs, Szilágyi J, Simon K, Bertók B, Fogassy E: *J.Chem.Soc.Perkin Trans 2.*, 2000, 149.
- [23] Schindler J, Egressy M, Bereczki L, Pokol Gy, Fogassy E, Marthi K:*Chirality*, 2007/19,239,
- [24] a). Neu J, Fogassy E, Szalma N, Kálvin P, Schindler J, Jakab G, Garadnay S, Pálovics E: 1000186 sz szabadalmi bej. 2010; b) Fogassy E, Pálovics E, Szelezky Zs: P 1200227 sz. szabadalmi bej. 2012
- [25] Gizur T, Törley J, Fogassy E, Egri G, Bálint J, Demeter Á: 202 963 sz szabadalom 2002

**Kalcium-foszfát folyamatos csapadékosítása:
populáció mérleg modellezés ideális
és reális keveredési viszonyok között**

**Continuous Precipitation of Calcium Phosphate:
Population Balance Modeling in Ideal and Real Mixing Conditions**

**Precipitarea continuă a fosfatului de calciu amorf:
aplicarea modelelor de bilanț a populației
în condiții de curgeri ideale și reale**

Drd. eng. SZILÁGYI Botond¹, Dr. eng. prof. Paul Serban AGACHI¹,
Dr. eng. adj. SZILÁGYI József², Dr. eng. adj. BARABÁS Réka³, Dr. eng. doc. LAKATOS Béla⁴

¹ Babes-Bolyai Tudományegyetem, Kémia és Vegyészmérnöki Kar, Vegyészmérnöki Intézet,
400028 Kolozsvár, Arany János Utca 11, tel: 40-264-593833, e-mail: chem@chem.ubbcluj.ro,
fax: 40-264-590818, web: www.chem.ubbcluj.ro

² Sapientia EMTE, Műszaki és Társadalomtudományok Kar,
530104 Csíkszereda, Szabadság Tér 1, tel: 40-266-317121,

e-mail: dekanihivatal.mttk@sapientia.siculorum.ro, fax: 40-266-372099, web: mttk.csik.sapientia.ro

³ Babes -Bolyai Tudományegyetem, Kémia és Vegyészmérnöki Kar, Magyar Kémia és Vegyészmérnöki Intézet,
400028 Kolozsvár, Arany János Utca 11, tel: 40-264-593833, e-mail: chem@chem.ubbcluj.ro,
fax: 40-264-590818, web: www.chem.ubbcluj.ro

⁴ Pannon Egyetem, Mérnöki Kar, 8200 Veszprém, Folyamatmérnöki Intézeti Tanszék,
Egyetem utca 10, tel: +3688/524-000, e-mail: pr@uni-pannon.hu, web: www.mk.uni-pannon.hu

ABSTRACT

In the case of calcium phosphate precipitation to enhance the mixing of reagent streams usually micromixer-tubular reactor combo devices are used. The precipitation can be described with population

balance models. The effects of mixing conditions were studied as follows: an ideal mixing and a CFD model was developed and the same population balance was coupled to them. The differences between the simulation results are caused by the different mixing model approaches, of which useful conclusions can be made related to operation of tubular precipitation reactors.

ÖSSZEFOGLALÓ

A kalcium-foszfát lecsapásakor a reagens oldatok gyorsabb keveredését elősegítendő a lecsapást gyakran végzik mikrokeverő-csőreaktor készülékben. A csapadékosítás populáció mérleg modellel írható le. A keveredési viszonyok hatását a következőképpen vizsgáltuk: egy ideális és egy numerikus áramlástanai modellt szerkesztettünk, amelyhez ugyanazt a populáció mérleget kapcsoltuk. A szimulációs eredménybeli különbségeket az eltérő keveredési modellek okozzák, amelyből hasznos következtetések vonhatók le a csapadékosító csőreaktorok modellezésére és működtetésére vonatkozóan.

Kulcsszavak: kalcium-foszfát, kristályosítás, populáció mérleg, CFD modellezés, szimuláció

BEVEZETŐ

Kiváló biokompatibilitásának köszönhetően a hidroxipapatitnak (továbbiakban HA) számos alkalmazása van [1-2]. A HA egy környezetbarát, olcsó és tiszta előállítási módszere a csapadékosítási reakció. Korábbi jelentések alapján a csapadékosítása egy ún. többlépéses kristályosítással megy végbe „magas kristályossági fokú és tisztaságú terméket eredményezve [3]. Első lépésben az amorf kalcium-foszfát képződik (továbbiakban AKF), amely egy szilárd fázisú átalakulással fog HA-á alakulni. Mivel a HA tulajdonságait szemcséinek mérete és morfológiája is befolyásolja [4], a szemcse képződési (csapadékosítási) lépés kontrollálása fontos-

nak bizonyul. A hidroxipatit előállítását és jellemzését intenzíven tanulmányozták [5], azonban ami a folyamat kinetikáját illeti, kevés tanulmány létezik [6]. Szilágyi és társai a csapadékosítás kinetikáját vizsgálták [7] Y-keverő – csőreaktor készülékben, egy, a szilárd szemcsék nukleációját, növekedését és agglomerációját magába foglaló részletes populáció mérleg modell által, de a reaktorban a folyást ideálisnak tekintette (reagens áramok pillanatszerű keveredése az Y keverőben és dugószerű áramlás a csőreaktorban). Ezen a ponton felmerül az a fontos kérdés, hogy egy részletes áramlási modell képes lenne-e a szimuláció pontosságát jelentősen megnövelni, amely igen fontos kritérium ilyen rendszerek folyamatoptimalizálási és fejlesztési problémáinak megoldásakor. Jelen kutatás célja ezen probléma numerikus szimuláció általi vizsgálása, az AKF csapadékosítását leíró populáció mérleg modellhez egy részletes numerikus áramlási modellt (az angol Computational Fluid Dynamics-ból a továbbiakban CFD) kapcsolva. A populáció mérleg modell-egyenlet momentum egyenlet rendszerre volt redukálva, amely kvadratúrás formájához kapcsoltuk a 3 dimenziós CFD modellt.

1. A FOLYAMAT MATEMATIKAI MODELLEZÉSE

A kísérletekben használt csőreaktor hossza 300, átmérője 50 milliméter volt, az Y keverő szárai által bezárt szög 80° . A reaktor kezdetben üres, a $t = 0$ pillanatban az Y keverőn keresztül elkezdjük feltölteni a csőreaktort a reagensek meghatározott koncentrációjú oldataival (analitikai tisztaságú vegyszerekből készített és desztillált vízzel hígított). Az Y keverőben a gyors kémiai reakció lejátszódik (amely pillanatszerűnek volt tekintve), képezvén a kristályosodó anyagot. A csőreaktorban, a reagens oldatok további keveredését követően, a szilárd szemcsék nukleációja, növekedése valamint agglomerációja következik be, a szilárd szemcsés fázis jól meghatározott szemcseméret eloszlását (továbbiakban SzME) hozva létre, amelyet kísérletileg mérünk egy Coulter Counter készülékkel a reaktor kimeneténél.

1.1. A populáció mérleg

A populáció mérleg modell fogalmát Hulburt és Katz vezette be 1964-ben, és azóta is széles körben használatos kristályosítási rendszerek matematikai leírására. A populáció mérleg modell leírja a szilárd szemcsés fázis szemcseméret eloszlását, és annak időbeni alakulását, amely a jelen esetben a következő modell-egyenlettel fogalmazható meg:

$$\frac{\partial n(L, r, t)}{\partial t} + \nabla[\mathbf{v}(r)n(L, r, t)] + \frac{\partial}{\partial L}[G(r)n(L, r, t)] = B_p(r, t) - n(L, r, t) \int_0^\infty \beta(L, \lambda)n(\lambda, r, t)d\lambda + \frac{L^2}{2} \int_0^L \frac{\beta\left[\left(L^3 - \lambda^3\right)^{1/3}, \lambda\right]}{\left(L^3 - \lambda^3\right)^{2/3}} n\left[\left(L^3 - \lambda^3\right)^{1/3}, r, t\right] n(\lambda, r, t)d\lambda \quad (1)$$

Az 1. egyenletben $n(L, r, t)$ jelöli a SzME függvényt a tér adott pontján t időpillanatban, L egy lineáris szemcseméret (felfogható úgy, mint a gömb alakú szemcse átmérője), $G(r)$ a növekedési függvényt jelöli és β jelöli az agglomerációs magfüggvényt. Az egyenlet első két tagja írja le a SzME tér és időbeni változását, a harmadik tag a szemcsék nukleációját és növekedését jelöli, a jobb oldal pedig a szemcsék agglomerációját veszi figyelembe.

A kristályosítás kinetikáját (kristálygócok képződésének sebessége, kristályok növekedése valamint azok agglomerációja) a következő egyenletekkel lehet leírni:

$$B_p(S) = k_{p0} \exp\left(-\frac{k_B}{T}\right) \exp\left(-\frac{k_e}{\ln^2 S}\right) \quad (2)$$

$$G(S) = k_{g0} \exp\left(-\frac{k_G}{T}\right) (S-1)^g \quad (3)$$

$$\beta(L, \lambda) = b_0 (L + \lambda)^3 \quad (4)$$

A populáció mérleg egyenlet az Ansys Fluent program Population Balance Module-val oldottuk meg, a kvadratúra momentum módszer alkalmazásával (QMOM), amely a következő átalakításon alapszik:

$$\mu_k(r, t) = \int_0^{\infty} L^k n(L, r, t) dL \cong \sum_{i=1}^I w_i(r, t) L_i^k(r, t), \quad k = 0, 1, 2, \dots \quad (5)$$

Az integrál az 5. egyenletben a momentum átalakítást jelöli, amelyet Larson és Randolph vezetett be [8]. A momentum átalakítás lehetővé teszi az eloszlás momentumainak a számítását, amely numerikusan, kvadratúrák segítségével közelíthető, amelyet McGraw javasolt [9]. Ebben a dolgozatban a szemcseméret eloszlás első hat momentumával dolgoztunk ($k = 0, 1, \dots, 5$).

1.2. A CFD modell és az anyagmérleg

A kísérletekben használt készülék modellje az Ansys programban építettük fel és a Fluent alprogramot használtuk a modell megoldásához. A *Mixture* multifázis modellt használtuk, amely jóval egyszerűbb az *Eulerian* modellnél, viszont a jelen problémához elégséges, és egyszerűségéből adódóan a szimuláció gyorsabb. Részletesebb leíráshoz lásd [10].

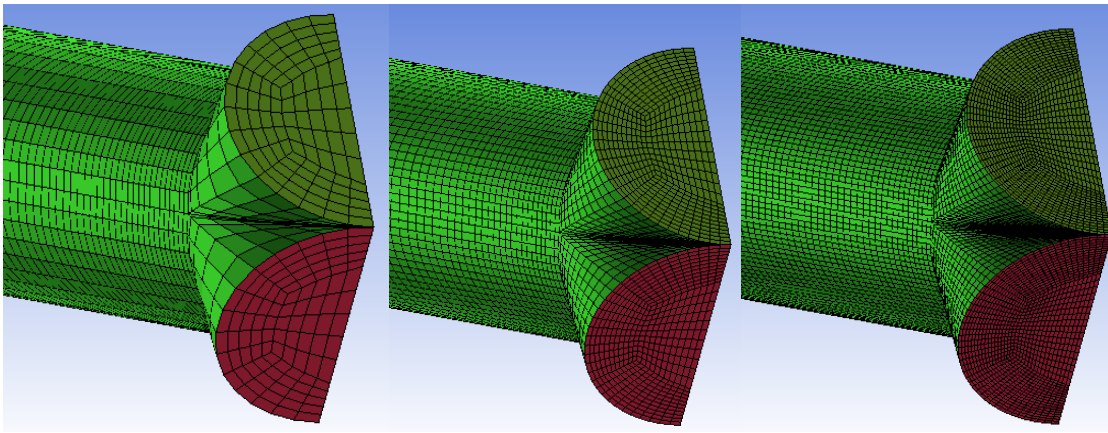
Marchisio és társai [11] bebizonyították, hogy ha a szemcsék mérete nem haladja meg a 20-30 mikrométert, akkor az áramlásra kifejtett hatásuk elhanyagolható és a Reynolds Átlagolt Navier Stokes áramlási modelleket lehet alkalmazni. Ebben a munkában a *relizálható* k - ϵ turbulencia modellt használtuk, amely a problémához a legjobb választásnak tűnik. Ez a modell meghatároz egy transzport egyenletet a turbulens kinetikus energiának (ϵ) és a turbulens kinetikus energia disszipációjának (k), amelyeket felhasználva számítható ki a turbulens viszkozitás. Részletesebb leíráshoz lásd [10].

A *Species Transport* modult használtuk a kémiai reakció szimulálására, amiután a Fluent program adatbázisát kiegészítettük a reakciókban szereplő anyagok tulajdonságaival. A *Finite Rate Volumetric Reaction* opciót használtuk a reakció szimulálásához, nagyon kis (100 J/kg) aktiválási energiát határozva meg a hőmérsékletfüggetlen pillanatszerű reakció modellezéséhez. A *Population Balance Module QMOM* opcióját használtuk a kristályosítás modellezéséhez (1. és 5. egyenlet), amelyre az előzetesen felírt és Matlab környezetben megoldott modell is épül. A kristályosítás kinetikáját, vagyis a nukleációt, kristálynövekedést és agglomerációt *kompilált sajátfüggvények* segítségével adtuk meg. A kristályosodó anyag folyadékfázisbeni anyagmérlege a következő képpen alakul (a diffúziót elhanyagolva):

$$\frac{\partial c(r, t)}{\partial t} + \nabla[\mathbf{v}(r)c(r, t)] = -k_V \rho L_n^3 B_p(r, t) - \nu \rho k_V \nabla[\mathbf{v}(r)\mu_3(r, t)] \quad (6)$$

Ebben az egyenletben az első tag a koncentráció időbeni megváltozását, a második a koncentráció divergenciáját jelöli, a jobb oldal pedig a szilárd szemcsék nukleációja és növekedése okozta koncentráció csökkenését adja.

A numerikus szimulációkat az Ansys Fluent programmal végeztük, *párhuzamos 3 dimenziós dupla precíziójú stacioner* szolver használatával. A számítás idejének csökkenésére egy szimmetria síkot határoztunk meg, amely a reaktort hosszanti irányban két részre vágja, valamint az Y keverőt tápláló csőszakasz hosszát 0-ra csökkentettük. Ebből kifolyólag a belépő áramok áramlási sebességét nem konstans értéként adtuk meg, hanem a nekik megfelelő stacionárius sebességprofil előzőleg számoltuk ki, elmentve és behozva az aktuális szimulációba. A konvergenciakritérium 0.001-re volt állítva, a konvergencia biztosítása érdekében nagyon kis, 0.05 relaxációs faktorokat használtunk a momentumok és a koncentráció esetén, a turbulencia számítására 0.8 volt beállítva. A diszkretizációs séma *Phase Coupled SIMPLE* volt a nyomás-sebesség kapcsolásra, *Least Square Cell Based* a gradiensnek, *QUICK* a térfogatrésznek, *First Order Implicit* a dinamikának és az összes többi mennyiségnek *Second Order Upwind*. A hálót az ICEM CFD programban készítettük, sűrűbb felosztást használva a keverő környékén és a csőfal közelében. A hálót a *Grid Convergence Index* módszerrel validáltuk. A háló validálásának a szükségességét az 1. ábra szemlélteti, amely nem jelent mást, mint a háló finomságának meghatározása. Ezt a lépést itt most nem célszerű részletezni.

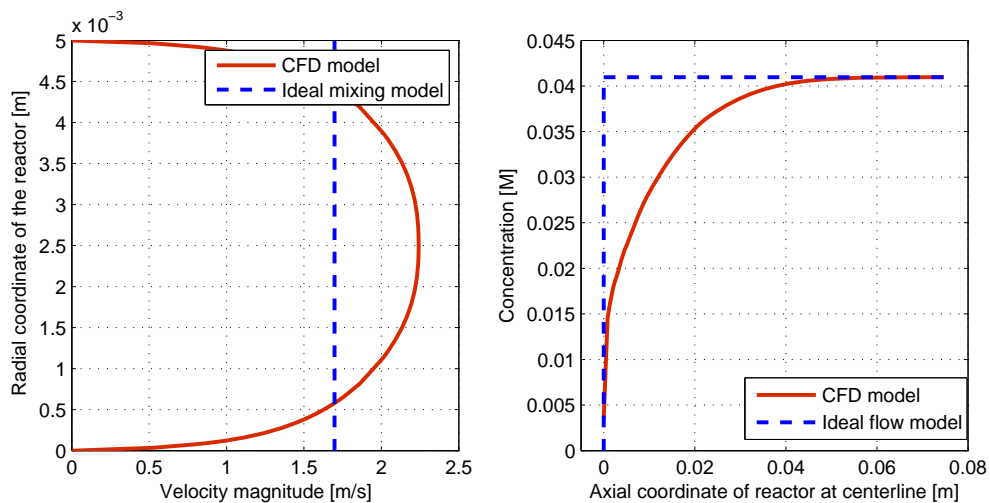


1. ábra
A reaktor lehetséges felosztásai

A háló méretének a beállítása után a modellt készen áll a szimulációk futtatására, amelyeket a következő fejezet fog részletezni.

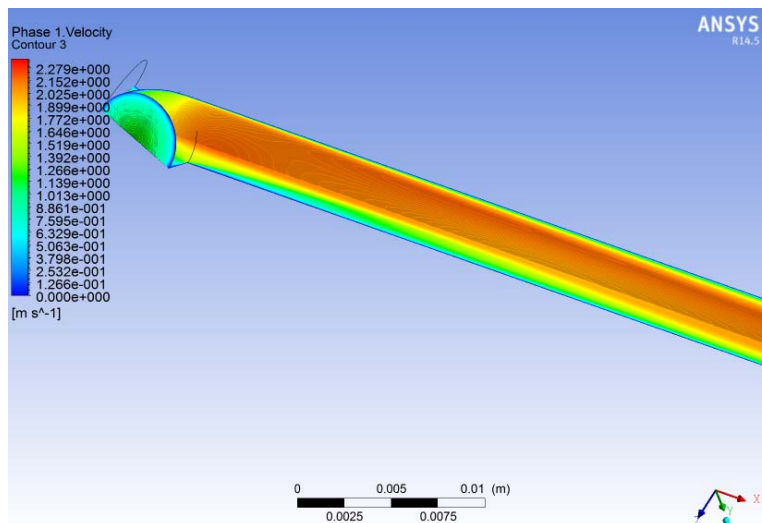
2. EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSEI

A csőreaktorban a keveredési és áramlási viszonyokat a *realizálható k-ε* modell számította, amely eredményeit a 2. ábra szemlélteti. Az ábra alapján az áramlás a reaktorban közel sem ideálisan dugószerű és a keveredés sem pillanatszerű.



2. ábra
Az ideális és reális keveredés szemléltetése

A kristályosodó anyag koncentrációjának stacioner értéke (a kristályosítás szimulálásának hiányában, jobb oldali ábra) megközelítőleg 50 mm-re az oldatok keverése után alakul ki, ami a reaktor hosszának 16.67 %-át teszi ki, így a reaktor jelentős részében a keveredési viszonyok távol állnak az ideálistól. A 3 – 4. ábrák az áramlás minőségét szemléltetik.



3. ábra

A sebesség eloszlása a mikrokeverő utáni zónában

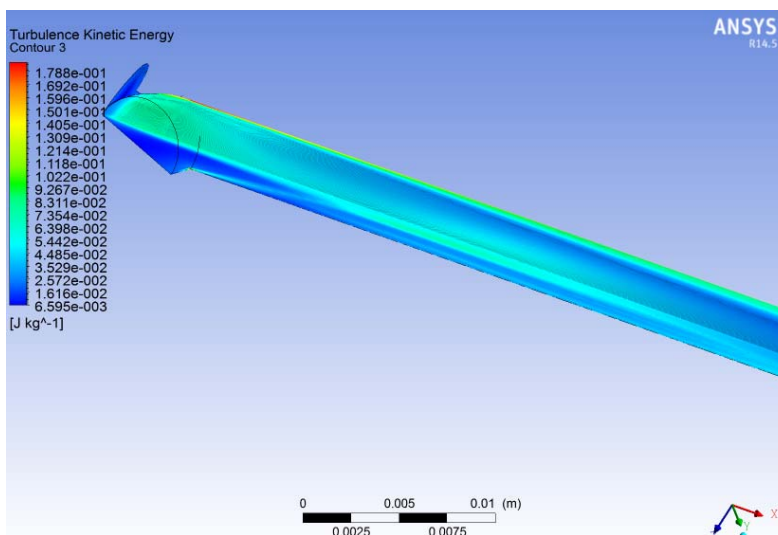
A 3. ábra alapján közvetlenül a mikrokeverő utáni zónában a szimmetria síkra merőleges síkban rendkívül intenzív keveredés figyelhető meg, az áramlás megközelíti az ideális dugószerű áramlást. Ezzel szemben a szimmetria síkban a sebességvonalak összehúzódása, vagyis kontrakciója figyelhető meg. Ez a jelenség jó összhangban van az előzetes feltételezéseinkkel.

A 4. ábra alapján a legintenzívebb turbulencia (avagy a turbulens kinetikus energia mértéke) a mikrokeverőben és a közvetlenül utána következő zónában található. Ez annak tudható be, hogy a két fluidum áram egymással egy bizonyos szöget zár be, a találkozásuknál pedig intenzív keveredés és turbulencia lép fel.

1. táblázat. Szimulált momentumok (IÁM – Ideális Áramlású Modell)

Menny.	T=295 K, Ca ₀ =0.27 M		T=318 K, Ca ₀ =0.01 M		T=333 K, Ca ₀ =0.09 M	
	IÁM	CFD	IÁM	CFD	IÁM	CFD
μ _i [m ¹ /kg]	IÁM	CFD	IÁM	CFD	IÁM	CFD
μ ₀ * 10 ⁻¹¹	1.408	1.325	0.383	0.365	2.510	2.448
μ ₁ * 10 ⁻⁵	3.297	3.225	1.041	1.018	5.958	5.726
μ ₂	2.010	1.937	0.327	0.323	2.136	2.046
μ ₃ * 10 ⁵	3.054	3.054	0.113	0.113	1.018	1.018
μ ₄ * 10 ¹⁰	7.768	7.890	0.042	0.044	0.596	0.623
μ ₅ * 10 ¹⁵	25.86	27.67	0.016	0.018	0.407	0.428

Az 1. táblázat az ideális és reális áramlási viszonyok között számított szemcseméret eloszlás momentumait tartalmazza. A táblázat adatai alapján megjelenik egy bizonyos eltérés a különböző áramlási modellekkel számított momentumok között, amely eltérések szórása 0.01. Ez az érték felfogható úgy, mint az áramlás hatásának figyelembe nem vételével bevezetett hiba, vagyis az áramlás hatása a csapadékos kristályosításra egy olyan készülék esetén, amely folyadékok keverésének maximalizálására van kifejlesztve (innen ered a mikrokeverő elnevezés is). Ez az 1 % szórás gyakorlatilag azt jelenti, hogy megközelítőleg 65 % a valószínűsége annak, hogy az ideális áramlású modellt feltételező szimuláció hibája 1 % alatt van a reális áramlással számított értékekhez képest. Ez felfogható úgy, mint annak az „ára”, hogy a teljes keveredést feltételező matematikai modellt ugyanaz a számítógép néhány másodperc alatt oldja meg, míg a CFD modellel kapcsolt kristályosítás szimulációja napokat vesz igénybe. Ilyen típusú készülékek esetén az ideális keveredést feltételező modell megfelelő pontosságot biztosít átlagos alkalmazásokhoz. Amennyiben kutatási/fejlesztési céljaink vannak már, a CFD modellel által nyújtott plusz pontosság is szükséges lehet.



4. ábra
A turbulens kinetikus energia eloszlása a mikrokeverő utáni zónában

A következő részekben az eddig bemutatott valós keveredés hatását fogjuk vizsgálni a csapadékosítási kristályosítás folyamatára.

A momentumok ismeretében a SzME megközelítőleg visszaállítható. Erre több matematikai módszer is létezik, ebben az esetben a SzME-t egy Gamma valószínűségi sűrűségfüggvénnyel közelítettünk (7. egyenlet):

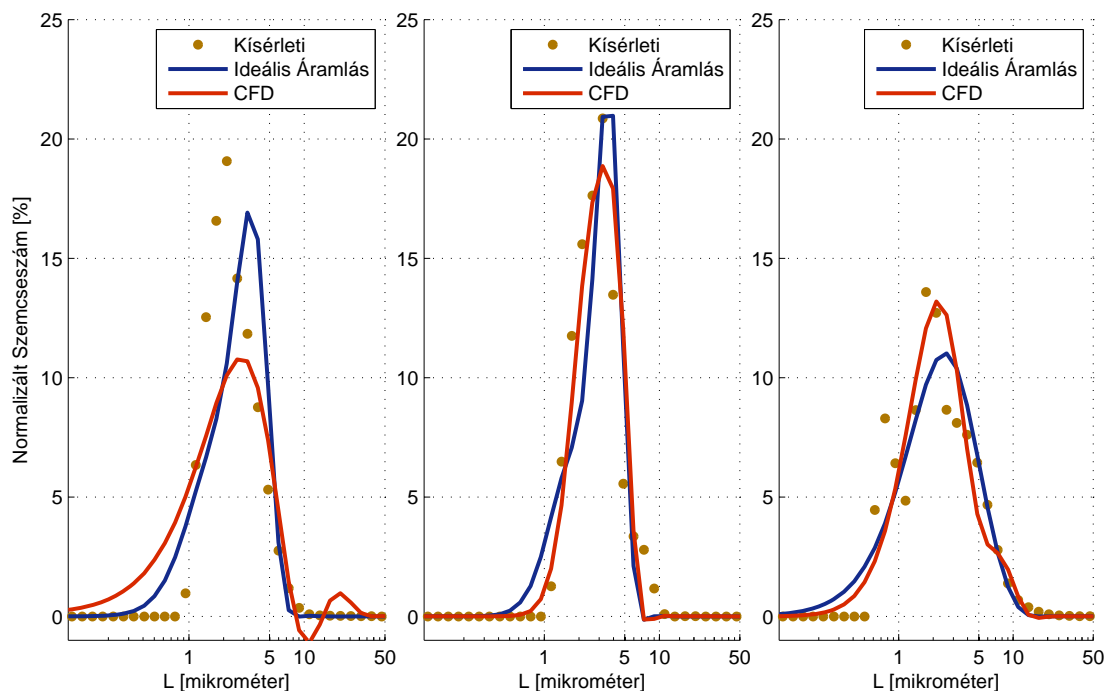
$$\tilde{n}(x, L) = \zeta \frac{z^{\omega-1} \exp(-z)}{(\omega-1)!} \left[\mu_0 + \sum_{n=3}^N k_n L_n^{(\omega)}(z) \right], \quad z > 0, \quad N \geq 3 \quad (7)$$

$$\zeta = \frac{\omega}{a}, \quad a = \frac{\mu_1}{\mu_0}, \quad \omega = \frac{a^2}{\mu_2/\mu_0 - a^2}, \quad z = \zeta L \quad (8)$$

$$k_n = \sum_{j=0}^n (-1)^j \frac{(\omega-1)! \zeta^{n-j}}{j!(n-j)!(n+\omega-1-j)!} \mu_{n-j} \quad (9)$$

$$L_n^{(\omega)}(z) = \sum_{j=0}^n (-1)^j \frac{n!(n+\omega-1)! \zeta^{n-j}}{j!(n-j)!(n+\omega-1-j)!} z^{n-j}, \quad n = 0, 1, 2, \dots \quad (10)$$

A sűrűségfüggvényt a Laguerre polinomokkal korrigáltuk (10. egyenlet). Az egyenletben szereplő összes paraméter kizárólag a momentumoktól függ (8. és 9. egyenletek). A módszer részletes leírása megtalálható Larson és Randolph munkájában [8]. A visszaállított SzME-ok a kísérleti adatokkal együtt a 5. ábrán láthatóak.



5. ábra
Szimulált és mért SzME-ok

Az 5. ábrán a kísérleti és a CFD modell segítségével kiszámított SzME-t egyaránt tüntettük, ami viszont megtévesztő lehet, ugyanis a CFD modellhez kapcsolt kristályosítási modellt nem kalibrált a kísérleti eredmények alapján, így direkt módon nincsenek összekapcsolva. A CFD modell eredményeit kanttiktatívan csak az IÁM modell eredményeivel lehet összehasonlítani, kalitativ hasonlóságok a mérési értékekkel megfigyelhetőek (SzME nagyobb szórása).

3. KÖVETKEZTETÉSEK

Jelen kutatásban az áramlás hatásait vizsgáltuk a csapadékosítási folyamatra, modellezés és szimuláció által. A vizsgált esettanulmány az amorf kalcium-foszfát csapadékosításának populáció mérleg modellezése volt, amelyhez egy ideális áramlási és egy részletes CFD modellt kapcsoltunk. A két modellel számított méreteloszlás momentumainak szórása $\sigma=0.010$. Az ideális áramlást használó szimuláció enyhén túlbecsüli az alsóbb momentumok ($k<3$) értékeit, és alulbecsüli a felsőbb momentumokét. A reális áramlással kapcsolt modell szélesebb SzME-t eredményezett, az átlagos szemcseátmérő nem mutatott jelentős eltérést. Végző következetésként kijelenthető, hogy a CFD modellezés növeli a szimuláció pontosságát, de amíg a kísérletekben a jó keverés biztosítva van, például mikrokeverő használatával, az ideális áramlású modell kielégítő pontossággal alkalmazható, amikor amorf anyag csapadékosításának a momentumait számoljuk. Az eredmények alapján a kinetikai becslésünk is érvényesnek mondható $\sigma=0.010$ megbízhatósággal.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatás nem jöhetett volna létre a Collegium Talentum, OTKA K77955 projekt és a Forerunner Federation anyagi támogatásai nélkül.

KÖNYVÉSZET

- [1] X. Zhou, R. Siman, R., L.P. Mohanty, 2012. Argon atmospheric plasma sprayed hydroxyl-apatite/Ti composite coating for biomedical applications, *Surf. Coat. Tech.* 207, 343-349
- [2] M.N. Salimi, A. Anuar, 2013, Characterizations of Biocompatible and Bioactive Hydroxyapatite Particles, *Procedia Engineering*, 53, 192-196
- [3] Y. Wu, 2013, Preparation of Ultrafine Powders by Reaction-Precipitation in Imprinting Streams: Nano Hydroxyapatite, *Imprinting Streams*, 317 – 327
- [4] M. Wang, R. Joseph, W. Bonfield, 1998, Hydroxyapatite-Polyethylene Composites for Bone Substitution: Effect of Ceramic Particle Size and Morphology, *Biomaterials*, 19-24, 2357-2366
- [5] C. Combes, C. Rey, 2010. Amorphous calcium phosphates: Synthesis, properties and uses in biomaterials. *Acta Biomaterialia* 6, 3362–3378
- [6] V.R. Dejeu, R. Barabas, A. Pop, E. Bogya, A. Imre-Lucaci, P.S. Agachi, 2008, Application of Mathematical Modeling in the Technology of Biomaterials. *Computer Aided Chemical Engineering*, 25, 978-0-444-53227-5, books.elsevier.com, 1-5
- [7] B. Szilágyi, N. Muntean, R. Barabás, O. Ponta, B.G. Lakatos, 2013. Reaction precipitation of amorphous calcium phosphate: population balance modelling and kinetics. *Chem. Eng. Res. Des.* (submitted)
- [8] A. Randolph, M. Larson, 1988, *Theory of Particulate Processes*, Academic Press, Salt Lake City.
- [9] R. McGraw, 1997, Description of Aerosol Dynamics by the Quadrature Method of Moments, *Aerosol Science and Technology*, 27-2, 255-265
- [10] Ansys INC, 2011, *Ansys Fluent Theory Guide*, on-line version.
- [11] D.L. Marchisio, R.D. Vigil, R.O. Fox, 2003, Implementation of Quadrature Method of Moments in CFD Codes for Aggregation-Breakage Problems, *Chemical Engineering Science*, 58, 3337-3351.

Algatechnológia és sűrítési műveletek

Algae Technology and Densification Methods

Tehnologia algelor și metode de densificare

HODAI Zoltán, RIPPELNÉ Dr. PETHŐ Dóra, Dr. HORVÁTH Géza,
Dr. HANÁK László, BOCSI Róbert

Pannon Egyetem, Mérnöki Kar, Vegyészmérnöki és Folyamatmérnöki Intézet
Vegyipari Műveleti Intézeti Tanszék
H-8200 Veszprém, Egyetem utca 10., Magyarország
tel.: +36-88-624-132, fax: +36-88-624-446, e-mail: hodaiz@almos.uni-pannon.hu

ABSTRACT

We have designed, built and operate special algae technology systems to produce biodiesel blending components, to absorb CO₂ from industrial flue gas and for the industrial wastewater treatment. The critical points of the technology are the concentration of the algae suspension and the extraction because of the high investment and operating costs and high operational time. Our research is primarily focused on processing the algae suspension so the produced cultures can be separated more economical and less operation time because the reason for existence of the algae technology in this direction is depend on this step. Our aim is to separate the algae mass faster and more economical from the starter solution. The optimization of the separating operations and technologies take notice of the environmental and economic aspects.

Key words: algae technology, carbon dioxide absorbtion, microalgae, separation, membrane

ÖSSZEFOGLALÁS

Biodízel keverőkomponens előállítására, ipari füstgázból történő CO₂ elnyelésére, valamint ipari szennyvíz tisztítására terveztünk, építettünk és működtetünk speciális algatechnológiai rendszereket. A technológia kritikus pontjai az algaszuszpenzió besűrítése és az extrakció, a magas beruházási és üzemeltetési költségek és a nagy műveleti idők miatt. Kutatásaink elsősorban az alga szuszpenzió feldolgozására összpontosítanak, hogy a megtermelt tenyészeteket minél gazdaságosabban és minél kisebb műveleti idővel lehetséges legyen szeparálni, hiszen az algatechnológia ezirányú felhasználásának létjogosultsága, életképessége múlik ezen a lépésen. Célunk az alगतömeg minél gyorsabb, gazdaságosabb szeparálása a tápoldattól. A szeparációra irányuló műveletek, technológiák optimalizálása, környezetvédelmi és gazdasági szempontok figyelembe vételével zajlik.

Kulcsszavak: algatechnológia, szén-dioxid abszorpció, mikroalga, szeparáció, membrán

1. BEVEZETÉS

Az energiatermelésre használt mikroalgák a szervezetük felépítéséhez szükséges anyagokat vizes oldatból veszik fel. Egyrészt a tápoldatban lévő szerves anyagokat, másrészt a reaktortérbe juttatott CO₂-ot (füstgáz) [1].

A kultúra számára elérhető fény a fotoszintetizáló szervezetek számára egy alapvetően korlátozó tényező, ezért a tenyésztési körülmények biztosításához speciális fotobioreaktorokat terveztünk, építettünk és működtetünk. Ezekkel a reaktorokkal szembeni követelmény többek között, hogy a napfény fotoszintézishez megfelelő spektrumát az algák számára hozzáférhetővé tegye, és műszakilag ellenálló legyen a természeti hatásokkal szemben [2, 3, 4].

A Pannon Egyetem Vegyipari Műveleti Intézeti Tanszékén „flat” típusú, zárt fotobioreaktor paneleket működtetünk semi batch üzemmódban.

A reaktorok tervezése során egyedi konstrukciós elemeket alkalmazva alakítottuk ki a rendszert, hogy biomassa termelékenysége a helyi mikroklímának megfelelően maximális legyen (1. ábra).

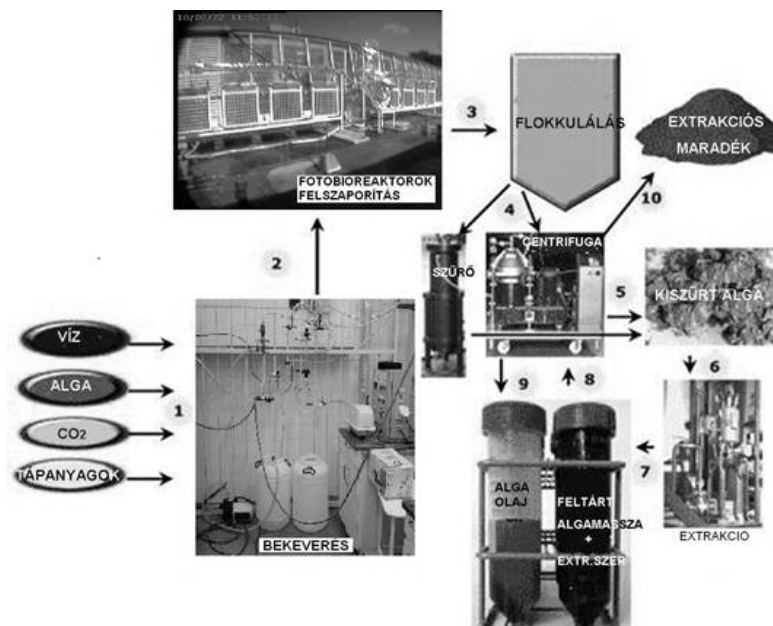


1. ábra

Szabadban telepített, nagylaboratóriumi fotobioreaktor egység (természetes megvilágítással).

2. SZEPARÁCIÓ

A technológia kritikus pontját a magas beruházási és üzemeltetési költségek jelentik, amelyek első sorban a feldolgozás során merülnek fel. A műveleti lánc (2. ábra) központi részét képező biomassa szuszpenzió besűrítési energiaszükséglete döntő szereppel bír az algatechnológia életképességét illetően.



2. ábra

Technológia folyamata

2.1. Flokkulációs kísérletek

A szakirodalmakban fellelhető számos flokkulációs módszert megvizsgáltunk [5-9], míg az optimálisan alkalmazható flokkulációs keverék komponenseit definiáltuk (NaOH + Poly-DADMAC + $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$), a keverék vegyszerszükségletét minimalizáltuk (10,5-es pH-ig NaOH + 39 – 65 ml Poly-DADMAC + 1,2 – 2,4 ml $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ / 1 dm³ algaeegy) [10].

A fenálló vegyszerigény magas költségeket jelent és az eljárás következtében jelentkező környezetterhelés miatt további költségvonzata van. A technológia költség- és energiaigényét szem előtt tartva további szeparációs kísérletek elvégzése vált szükségessé.

2.2. Membránszűrési kísérletek

A sűrítési, tisztítási kísérletek elvégzéséhez a Pannon Egyetem Vegyipari Műveleti Intézeti Tanszékének ZW-10 modulral szerelt, PLC vezérléssel ellátott készülékét használtuk fel.

A készülék a permeátumáram iránya szerint outside-in típusú műveletet hajt végre. A méréseket a Zenon cég által forgalmazott ZW-10 immerziós modul felhasználásával végeztük el. A membrán a specifikáció szerint alkalmas a 0,1 µm alatti szemcseméretű részecskék visszatartására is, így alkalmas az általunk felzaporított mikroalga sejtek betöményítésére.

A modul egy PLC vezérléssel ellátott készülék részegységeként működik.

Annak érdekében, hogy a rendelkezésre álló mintamennyiség feldolgozásával a lehető legnagyobb mennyiségű adatot gyűjtsük, a membránszűrési mérést több szakaszra bontottuk. Az algaszuszpenziókat 40 dm³-es adagokban vettük a fotobioreaktorokból a szűrési kísérlethez.

Miután a 40 dm³-es térfogatot 20 dm³-be sűrítettük, desztilláltvízes átmosást alkalmaztunk. Az átmosást addig végeztük, míg a szuszpenzióban lévő maradványsókat valamint az egyéb szerves anyagokat, anyagcsestermékeket el nem távolítottuk.

A tisztítás mértékét a permeátumon végzett szárazanyag tartalom meghatározás és vezetőképesség mérésekkel ellenőriztük. A ráadott szuszpenzió összes szárazanyag tartalmát mértük ki (maradvány sókkal együtt). Ezt a fajta vizsgálatot mind a sűrítmény, mind pedig a permeátum analíziséhez használtuk.

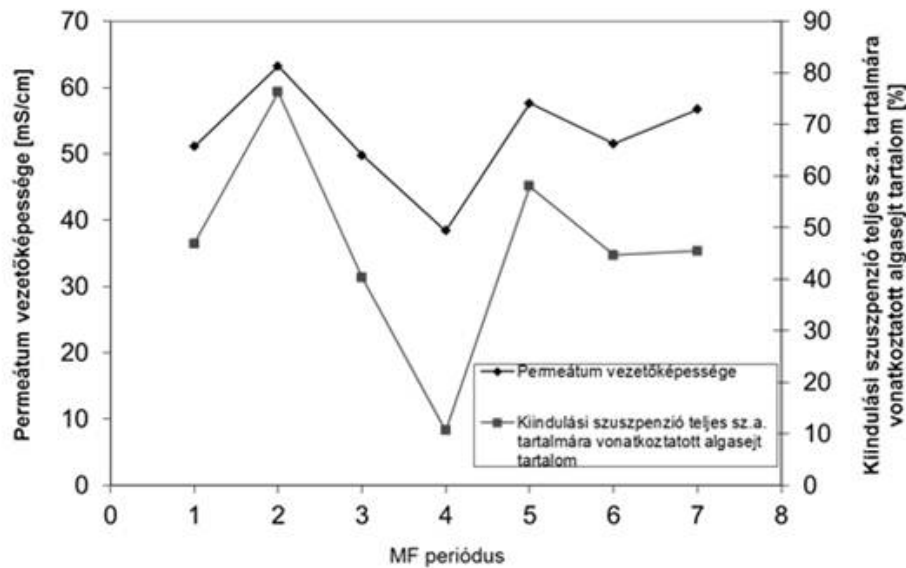
A következő 40 dm³ algaszuszpenziót az előzőekben leírt módon sűrítettük be, amit az MF2 kóddal jeöltünk. A fentiekben leírt vizsgálatokat a kísérleteink során 7 alkalommal végeztük el (MF1 – MF7).

A szűrés komplex vizsgálata érdekében az adott lépésben nyert sűrítményhez hozzá adagoltuk az előző besűrítésből származó töményített, átmosott koncentrátumot (sűrített algaszuszpenzió). Az átmosás révén lehetőség nyílik arra, hogy száraz anyagként csupán a mikroalgasejteket nagy koncentrációban tartalmazó desztvízes szuszpenziót vizsgáljuk, kezeljük tovább. Az átmosás következtében újabb kedvező tulajdonságok is megmutakoztak az előállt retentátumnál, mint például könnyebb tárolhatóság (később indulnak meg a bomlási folyamatok), gyorsabb bepárolhatóság.

A sűrítési kísérletsorozat az algatermelési kapacitásunk legnagyobb értékéig folytattuk. A tisztítást (sűrítmény desztvízes átmosása) az elérhető legkisebb vezetőképességi értékig folytattuk.

A permeátum szárazanyag-tartalom változása és a hozzá tartozó vezetőképesség változás trendje az esetek többségében azonos volt.

A 3. ábra az egyes szűrési kísérletek esetében mutatja meg a kiindulási szuszpenzió összes szárazanyag tartalmára vonatkoztatott algasejt tartalom és permeátum vezetőképesség összefüggéseit.



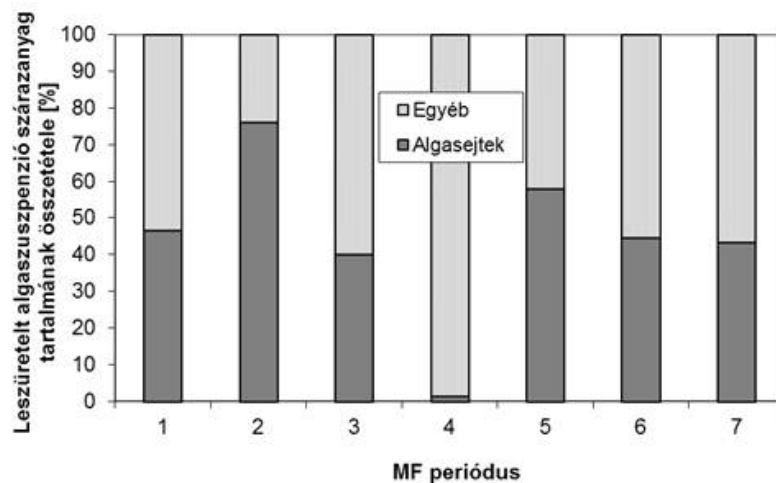
3. ábra

Az egyes szűrési kísérletek esetében mért kiindulási szuszpenzió összes szárazanyag tartalmára vonatkoztatott algasejt tartalom és permeátum vezetőképesség összefüggései

Az adatokat a szűrés megkezdésekor gyűjtöttük be, mind a kiindulási szuszpenzióból, mind pedig a kezdetben kilépő permeátumból. Az ábra határozott tendenciát és kapcsolatot mutat meg, a membrán két oldalán mért mennyiségek között. Eddigi méréseink alapján egyértelmű kapcsolat van a besűríteni kívánt algaszuszpenzió összes szárazanyag tartalmának algasejt tartalma és a permeátumban mérhető vezetőképesség között. Nagyobb algakoncentráció nagyobb kiindulási vezetőképességet eredményez.

A permeátum fluxus értékei minden mérésünk esetén hasonló értékűnek adódtak. Ebből következik, hogy különböző koncentrációjú, összetételű szuszpenziókat azonos teljesítménnyel tud szűrni a készülékünk a vizsgált tartományokban.

A 4. ábra a teljes szárazanyag százalékos összetételét mutatja meg különböző sarzsok esetében. A második MF periódusában egy természetes körülmények között működő fotobioreaktor egységből származó szuszpenziót dolgoztunk fel, amely jól láthatóan magas algatartalommal rendelkezett az összes szárazanyagra vonatkoztatva, szemben a 3-as, 4-es periódusokban feldolgozott, mesterséges megvilágítású szuszpenziókkal.

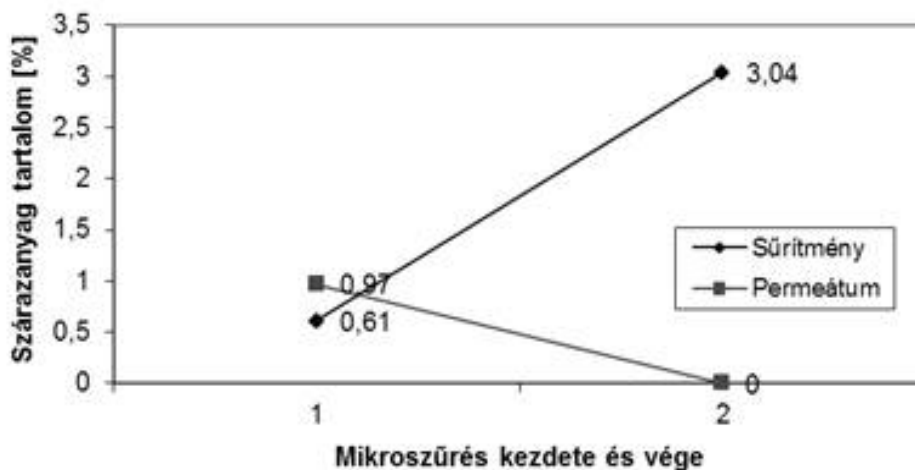


4. ábra

Leszűretelt szuszpenziók szárazanyag-tartalmának összetétele algasejtekre vonatkoztatva

További összefüggések deríthetők ki, ha különböző reaktoregységből, más-más szaporodási fázisból származó mintát is megvizsgálunk. A további vizsgálatok lehetővé tennék, hogy messzemenő következtetéseket vonjunk le a természetést illetően. Ezeket a tapasztalatokat a későbbiekben a természetéstechnológiába beépítjük, ezzel is növelve a biomasza kapacitást.

A kezdeti, leszedett algaszuszpenziót (40 dm^3) 13 g/dm^3 -es összes szárazanyag tartalomról (algasejtek, az őket kísérő anyagcseretermékekkel, maradványsókkal) $6,1 \text{ g/dm}^3$ -es szárazanyag tartalomra (20 dm^3) (algasejtek) sűrítettük. A végső algasűrítmény $30,4 \text{ g/dm}^3$ koncentrációval rendelkezik mikroalgára nézve, 20 dm^3 -es térfogatban (5. ábra).



5. ábra

A sűrítmény és permeátum anyag tartalma a kísérlet kezdetén és végén

3. ÖSSZEFOGLALÁS

Az optimálisan alkalmazható flokkulálószer keverék komponenseit definiáltuk. A vegyszermaradványok a további feldolgozásnál nehézségeket okoznak.

A membránszűrési kísérleteink eddigi eredményeit kiértékelve megállapítható, hogy a permeátum fluxus értékei alapján a különböző koncentrációjú, összetételű szuszpenziókat azonos teljesítménnyel szűrhetjük a készülékünkön a vizsgált tartományokban.

Az ultraszűrés végeztével lehetőség nyílik az algasejteket kísérő egyéb anyagok eltávolítására, amely stabilabbá, kezelhetőbbé teszi a kinyert sűrítményt. Kutatási és fejlesztési szempontból kimondottan kedvező, hisz a későbbi feldolgozásnál, illetve analitikai vizsgálatoknál nem adódnak zavaró tényezők, illetve a zavarások mértéke definiálható ez által. Amennyiben cél a tápközeg rendszerbe való visszaforgatása (maradványsók hasznosítása), legnagyobb prioritása jelenlegi kutatásaink szerint a membránszeparációs műveletnek van.

A membránszeparációs eredményeket figyelembe véve, a permeátum vizsgálatok alapján különböző metabolitok jelenlétét feltételezhetjük, amelyek különböző koncentrációkban fordulnak elő. Ezek az anyagok mind elválaszthatóak a számunkra értékes mikroalga sejtektől.

1. táblázat: Flokkulálás és membrán-mikroszűrés összehasonlítása.

Paraméter	Flokkulálás	Mikroszűrés
Energiagény	kicsi	nagy
Műveleti idő	rövid	hosszú
Vegyszerigény	van	nincs
Környezetterhelés	van	nincs
Folyamatirányítás	nem adott	adott
Standardizáció	nem lehetséges	lehetséges
Folyamatos üzem	nem lehetséges	lehetséges
Tápközeg visszaforgathatósága	nem lehetséges	lehetséges
Sűrítmény stabilitása	nem/kismértékben stabilis	elfogadható stabilitás
További feldolgozás	körülményes (esetenként)	zavarásmentes
Szeparáció rugalmassága	minden sarzsot külön kell vizsgálni	szuszpenzió minőségétől függetlenül alkalmazható

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

IRODALOM

- [1] M. OLAIZOLA, S. M. MASUTANI, T. NAKAMURA: Recovery and Sequestration of CO₂ from Stationary Combustion Systems by Photosynthesis of Microalgae, Final report, U.S. Department of Energy, Office of Fossil Energy National Energy Technology Laboratory, 2005, 21-197. oldal.
- [2] G. C. DISMUKES: Algal Photosynthesis, Princeton Univ. Press, Princeton, 2008, 12. oldal.
- [3] J. BENEMANN, J. SHEEHAN, P. ROESSLER, T. DUNAHAY: A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae, NREL Report NREL/TP-580-24190, 1998, 3. oldal.
- [4] I. H. JUNG, S. H. CHOE: Growth Inhibition of Freshwater Algae by Ester Compounds Released from Rotted Plants, Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2002, 297-304. oldal.
- [5] L. JIMIN, C. DAE-HYUN, R. RISHIRAM, K. BYUNG-HYUK, O. HEE-MOCK, K. HEE-SIK, Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris*, Bioresource Technology, Volume 131, March 2013, 195-201, ISSN 0960-8524
- [6] algae.wur.nl 2013
- [7] C. OLIVEIRA, J. RUBIO, A short overview of the formation of aerated flocs and their applications in solid/liquid separation by flotation, Minerals Engineering, Volume 39, December 2012, 124-132, ISSN 0892-6875
- [8] D. VANDAMME, I. FOUBERT, I. FRAEYE, B. MESSCHAERT, K. MUYLAERT, Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: Role of magnesium and calcium and practical implications, Bioresource Technology, Volume 105, February 2012, 114-119, ISSN 0960-8524
- [9] M. CASTRILLO, L.M. LUCAS-SALAS, C. RODRÍGUEZ-GIL, D. MARTÍNEZ, High pH-induced flocculation-sedimentation and effect of supernatant reuse on growth rate and lipid productivity of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*, Bioresource Technology, Volume 128, January 2013, 324-329, ISSN 0960-8524
- [10] Z. HODAI, G. HORVÁTH, L. HANÁK, R. BOCSI: Problems occurring during the processing of microalgae propagated for oil production, Proceedings Issue a Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Seria Chemia, 2010., pp. 63-73.