

PANNON EGYETEM

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

HORVÁTH SZABOLCS

VESZPRÉM

2023

RETENCIÓS FOLYAMATOK VIZSGÁLATA LINEÁRIS ÉS NEMLINEÁRIS FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁBAN

DOI:10.18136/PE.2023.855

Doktori (PhD) értekezés

Készítette:

Horváth Szabolcs
okleveles vegyész

Témavezető:

Dr. Horváth Krisztián
egyetemi docens

Készült a Pannon Egyetem Vegyészmérnöki és Anyagtudományok
Doktori Iskolája keretében

Pannon egyetem

Mérnöki Kar

Veszprém

2023

RETENCIÓS FOLYAMATOK VIZSGÁLATA LINEÁRIS ÉS NEMLINEÁRIS
FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁBAN

Az értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében készült a Pannon Egyetem
Vegyésszmérnöki és Anyagtudományok Doktori Iskolája keretében

Anyagtudományok és technológiák tudományágban

Írta: Horváth Szabolcs

Témavezető: Dr. Horváth Krisztián

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....

Dr. Horváth Krisztián

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: igen /nem

.....

Bíráló aláírása

Bíráló neve: igen /nem

.....

Bíráló aláírása

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján%-ot ért el.

Veszprém,

.....

a Bíráló Bizottság elnöke

A doktori oklevél minősítése:

Veszprém,

.....

az EDHT elnöke

Kivonat

Retenció folyamatok vizsgálata lineáris és nemlineáris folyadékkromatográfiában

A munka célja az oszlopban lejátszódó fizikai és kémiai folyamatok ismeretanyagának bővítése lineáris és nemlineáris folyadékkromatográfiában.

Az "Irodalmi összefoglaló" a kromatográfiás alapfogalmak, illetve az elválasztások elméleti modelljeinek bemutatása mellett ismerteti a folyadékkromatográfiás töltetek fizikai és kémiai tulajdonságait. A kísérletekhez használt anyagok, eszközök, valamint a számításokhoz használt szoftverek és paraméterek bemutatását a "Kísérleti rész" fejezet foglalja össze.

A Szerző az általános sebességi modellt használja fel kétrétegű tömörmagvú, illetve kétrétegű teljesen porózus szemcsék hatékonyságának vizsgálatára. Az eredmények alapján megállapítja, hogy gondos tervezéssel és optimalizálással a kétrétegű struktúrák alkalmazása az oszlophatékonyság javulását eredményezi. Az általános sebességi modellből levezetett egyenletek felgyorsíthatják az új állófázisok tervezését és optimalizálását.

A szemcseméret gradiens nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás oszlopban való alkalmazhatóságát a Szerző elméleti megközelítésben vizsgálja. Megállapítja, hogy gradiens elúciós módban a negatív szemcseméret gradiens egy potenciális lehetőség a hatékonyabb elválasztás elérése érdekében.

A Szerző az inverz módszert úgy fejlesztette tovább, hogy az alkalmazható legyen izoterma meghatározására az izoterma előzetes becslése nélkül. A Martin-Synge algoritmust úgy módosította, hogy segítségével elúciós profilok izoterma pontokra illesztett spline-okból meghatározhatóak legyenek. A fejlesztett numerikus módszer pontosságát butil-benzoát izotermájának mérési adatokból történő meghatározásával, valamint a frontális analízis módszerével kapott eredmények összevetésével igazolta.

Az ioncsere-kapacitás gradiens folyadékkromatográfiás alkalmazását a Szerző különböző függvényekkel modellezi. Megállapítja, hogy különböző töltésű ionok elválasztása esetén a gradiens oszlop eluens koncentráció gradienssel kombinálva hatékonyabb elválasztást eredményez, mint az ugyanilyen analízis idejű konstans ioncsere kapacitású oszlop.

Abstract

Study of retention processes in linear and nonlinear liquid chromatography

The aim of the work is to widen the knowledge of the physical and chemical processes occurring in the column in linear and nonlinear liquid chromatography.

The "Literature review" introduces the basic chromatographic definitions and models of separations as well as the physical and chemical properties of liquid chromatographic packing materials. The materials and instruments used in the experiments, as well as the software and parameters used for the calculations, are summarised in the "Experimental" chapter.

The general rate model is used to study the efficiency of bi-layer solid-core and bi-layer fully porous particles. Based on the results, it is concluded that with careful design and optimization, the use of multi-layer structures can lead to an improvement in column efficiency. Equations derived from the general rate model can accelerate the design and optimization of new stationary phases.

The applicability of the particle size gradient in high performance liquid chromatographic columns is studied in a theoretical approach. It was found out that in gradient elution mode, a negative particle size gradient is a potential option to achieve more efficient separation.

The inverse method was improved so that it can be used to determine the isotherm without prior estimation of its parameters. The Martin-Synge algorithm has been modified to be able to determine elution profiles from splines fitted to isotherm points. The accuracy of the developed numerical method was verified by determining the isotherm of butyl benzoate from measured data and by comparing the results obtained by the frontal analysis method.

The application of the ion-exchange capacity gradient in liquid chromatography was modelled with different functions. It was found that for separations of ions with different charges, a gradient column combined with an eluent concentration gradient gives a more efficient separation than a column with a constant ion exchange capacity with the same analysis time.

Kurzfassung

Studie über Retentionsprozesse in der linearen und nichtlinearen Flüssigkeitschromatographie

Ziel der Arbeit ist es, das Wissen über die physikalischen und chemischen Prozesse in der Säule bei der linearen und nichtlinearen Flüssigkeitschromatographie zu erweitern.

In der "Literaturübersicht" werden die grundlegenden chromatographischen Definitionen und Trennungsmodelle sowie die physikalischen und chemischen Eigenschaften von flüssigchromatographischen Packungsmaterialien vorgestellt. Die in den Experimenten verwendeten Materialien und Instrumente sowie die für die Berechnungen verwendete Software und Parameter werden im Kapitel "Experimente" zusammengefasst.

Das allgemeine Ratenmodell wird verwendet, um die Effizienz von zweischichtigen Partikeln mit festem Kern und zweischichtigen vollporösen Partikeln zu untersuchen. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Verwendung von Mehrschichtstrukturen bei sorgfältiger Planung und Optimierung zu einer Verbesserung der Säuleneffizienz führen kann. Die aus dem allgemeinen Ratenmodell abgeleiteten Gleichungen können die Entwicklung und Optimierung neuer stationärer Phasen beschleunigen.

Die Anwendbarkeit des Partikelgrößengradienten in Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Säulen wird in einem theoretischen Ansatz untersucht. Es wurde herausgefunden, dass im Gradientenelutionsmodus ein negativer Partikelgrößengradient eine mögliche Option ist, um eine effizientere Trennung zu erreichen.

Die inverse Methode wurde so verbessert, dass sie zur Bestimmung der Isotherme ohne vorherige Schätzung ihrer Parameter verwendet werden kann. Der Martin-Synge-Algorithmus wurde so modifiziert, dass er in der Lage ist, Elutionsprofile aus Splines zu bestimmen, die an isotherme Punkte angepasst werden. Die Genauigkeit der entwickelten numerischen Methode wurde durch die Bestimmung der Isotherme von Butylbenzoat aus gemessenen Daten und durch den Vergleich mit den Ergebnissen der Frontalanalysemethode überprüft.

Die Anwendung des Gradienten der Ionenaustauschkapazität in der Flüssigkeitschromatographie wurde mit verschiedenen Funktionen modelliert. Es wurde festgestellt, dass bei der Trennung von Ionen mit unterschiedlichen Ladungen eine Gradientensäule in Kombination mit einem Eluentenkonzentrationsgradienten eine effizientere Trennung ermöglicht als eine Säule mit konstanter Ionenaustauschkapazität bei gleicher Analysezeit.

Tartalomjegyzék

Bevezetés és célkitűzés	1
1. Irodalmi összefoglaló	3
1.1. Folyadékkromatográfiás alapfogalmak	3
1.2. A folyadékkromatográfiás elválasztások elmélete	7
1.2.1. A tömegmérleg egyenlet	7
1.2.2. Az egyensúlyi-diszperzív modell	10
1.2.3. Az általános sebességi modell	11
1.2.4. A Martin-Synge tányérmodell	15
1.2.5. Izoterma modellek	17
1.2.6. Izotermák meghatározásának módszerei	18
1.2.7. Adszorpciós energiaeloszlás meghatározása	20
1.2.8. Lineáris és nemlineáris kromatográfia	21
1.3. Folyadékkromatográfiás töltetek	22
1.3.1. A folyadékkromatográfiás töltetek fizikai tulajdonságai	22
1.3.2. Tömörmagvú töltetek	24
1.3.3. A folyadékkromatográfiás töltetek kémiája	26
1.3.4. Különböző típusú állófázisok kombinálására alkalmazott technikák	27
1.3.5. Ioncsere-kapacitás gradiens megvalósításának módjai	29
2. Kísérleti rész	31
2.1. Numerikus számításokhoz használt szoftverek	31
2.2. Kétrétegű tömörmagvú állófázisok nagyméretű biomolekulák folyadék- kromatográfiás elválasztási hatékonyságának vizsgálata elméleti megfon- tolások alapján	31
2.3. Szemcseméret gradienssel rendelkező folyadékkromatográfiás oszlopok hatékonyságának elméleti vizsgálata	31
2.4. Adszorpciós izotermák folyadékkromatográfiás meghatározása modell men- tes inverz módszerrel	32
2.4.1. Eszközök és anyagok	32
2.4.2. Számítások	32
2.5. Statikus longitudinális ioncsere gradiens kromatográfia elmélete	33

3.	Eredmények	35
3.1.	Kétrétegű tömörmagvú állófázisok nagyméretű biomolekulák folyadék-kromatográfiás elválasztási hatékonyságának vizsgálata elméleti megfontolások alapján	35
3.1.1.	A kétrétegű tömörmagvú szemcsék szerkezete	35
3.1.2.	Az általános sebességi modell kiterjesztése kétrétegű tömörmagvú szemcsékre	36
3.1.3.	A kromatográfiás oszlop elméleti tányérmagassága	38
3.1.4.	Az általános sebességi modell megoldása kétrétegű tömörmagvú szemcsékre	39
3.1.5.	Kétrétegű teljesen porózus szemcsék elválasztási hatékonysága . .	40
3.1.6.	Kétrétegű tömörmagvú szemcsék elválasztási hatékonysága	43
3.2.	Szemcseméret gradienssel rendelkező folyadékkromatográfiás oszlopok hatékonyságának elméleti vizsgálata	46
3.2.1.	Nem-uniform oszlopok hatékonysága	46
3.2.2.	Ekvivalens szemcseátmérő	47
3.2.3.	Szemcseméret gradiensek	48
3.2.4.	Az ekvivalens szemcseátmérő meghatározása	49
3.2.5.	Izokratikus elúció	50
3.2.6.	Gradiens elúció	52
3.2.7.	Határoló szemcseméretek optimalizálása	53
3.3.	Adszorpciós izotermák folyadékkromatográfiás meghatározása modell mentes inverz módszerrel	56
3.3.1.	Elúciós profilok számítása	56
3.3.2.	Izotermák meghatározása inverz módszerrel	57
3.3.3.	Izoterma pontok eloszlása	58
3.3.4.	Butil-benzoát izotermájának meghatározása frontális analízissel és izoterma egyenlet mentes inverz módszerrel	59
3.4.	Statikus longitudinális ioncsere gradiens oszlopok hatékonyságának vizsgálata	64
3.4.1.	Elúciós profilok számítása	64
3.4.2.	Ioncsere kapacitás gradiensek	65
3.4.3.	Ioncsere kapacitás gradiens oszlopok felbontása	66
3.4.4.	Az ioncsere-kapacitás gradiens profiljának hatása a felbontásra . .	69
4.	Összefoglalás	71
	Irodalomjegyzék	71
	Tézispontok	I

Thesis	III
A szerző tudományos munkássága	V
I. Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó publikációk	V
II. Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó konferencia előadások és poszterek	V
III. Az értekezés tématerületét érintő publikációk	VI
IV. Az értekezés tématerületét érintő konferencia előadások és poszterek . . .	VI
Köszönetnyilvánítás	IX

Bevezetés és célkitűzés

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

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

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

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

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

1. Irodalmi összefoglaló

1.1. Folyadékkromatográfiás alapfogalmak

Egy adott komponens retenciós ideje, t_R , alatt a minta injektálásától a csúcs maximumának kromatogramon való megjelenéséig eltelt időtartamot értjük. A retenciós tényező, k , a komponens állófázisbeli, s , és mozgófázisbeli, i , anyagmennyiségének, n , arányaként fejezhető ki:

$$k = \frac{n_s}{n_i} \quad (1.1)$$

A retenciós idő definiálható, mint távolság és sebesség hányadosa, ahol a távolság az oszlophossz, L , és u_A , a komponens sávjának sebessége:

$$t_R = \frac{L}{u_A} \quad (1.2)$$

Hasonlóképpen az oldószer csúcsának retenciós ideje (holtidő):

$$t_0 = \frac{L}{u} \quad (1.3)$$

ahol u a mozgófázis átlagos sebessége. A retenciós paraméterek közötti összefüggés a következő egyenlettel adható meg:

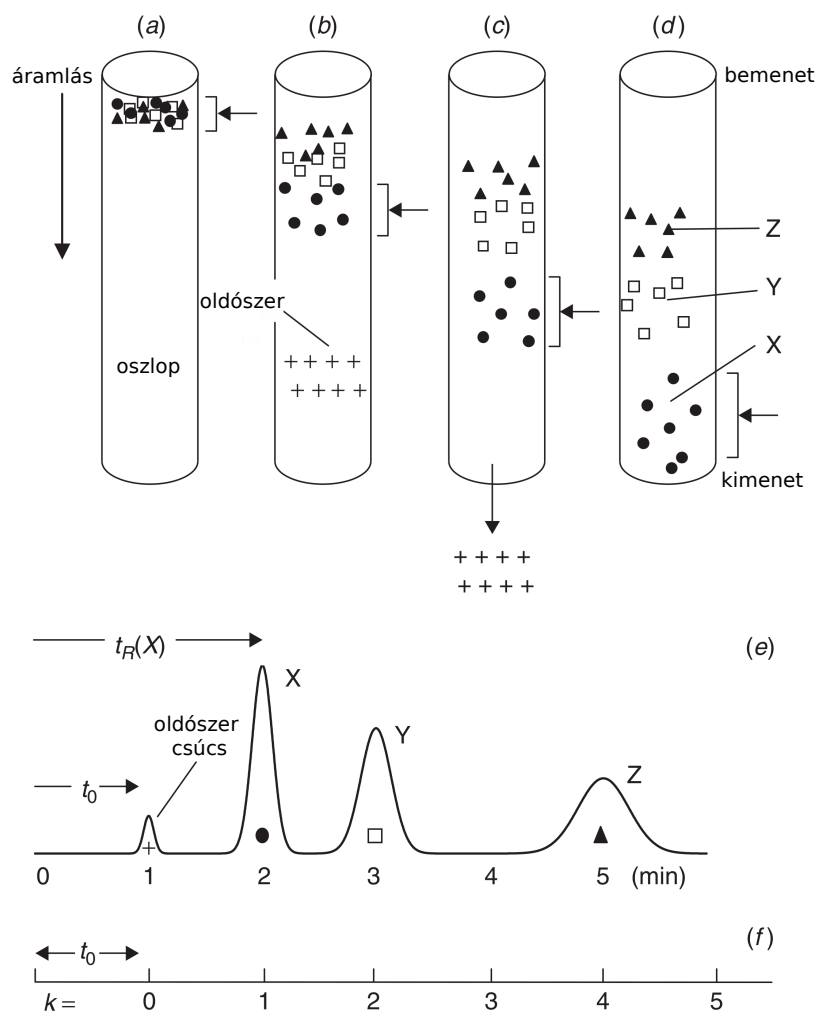
$$t_R = t_0(1 + k) \quad (1.4)$$

Az (1.4) egyenlet kifejezhető retenciós térfogattal is, $V_R = t_R F_v$, ahol F_v a mozgófázis térfogatárama:

$$V_R = V_0(1 + k) \quad (1.5)$$

ahol $V_0 = t_0 F_v$, a holtterfogat.

Amikor a komponens sávja elhagyja az oszlopot, a kromatogramon egy csúcs jelenik meg (1.1. ábra), amelynek szélessége többféleképpen definiálható. A csúcs mindkét oldalán az inflexiós pontokon keresztül húzott érintők alapvonallal való metszéspontjainak távolsága adja a bázisszélességet, W (1.2. ábra).



1.1. ábra A HPLC-s (nagy teljesítményű folyadékkromatográfia) elválasztási folyamat illusztrációja. (a-d) Szekvenciális elválasztás az oszlopban; (e) a végső kromatogram; (f) k becslése a kromatogramból. A ●, □ és ▲ szimbólumok az X, Y és Z mintamolekulákat, míg a + az oldószer molekulákat reprezentálja [1].

Egy oszlop relatív képessége keskeny csúcsok létrehozására hatékonyságként írható le, ami a tányérszámmal, N , definiálható:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (1.6)$$

Egy precízebb mérőszám a csúcsszélesség jellemzésére a félértékszélesség, $W_{1/2}$. Ebben az esetben a tányérszám:

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (1.7)$$

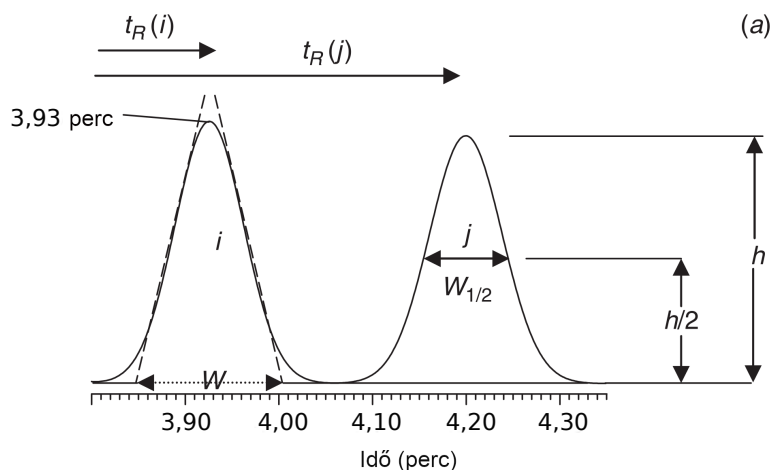
Mivel ideális esetben a kromatográfiás csúcs alakja egy Gauss-görbe, a csúcsszélességet

szokás a Gauss-görbe szórásával, σ , kifejezni:

$$W = 4 \sigma \quad (1.8)$$

ebből következően:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 \quad (1.9)$$



1.2. ábra A csúcsszélesség definiálása és mérése [1].

Az elméleti tányérszám elválasztási körülményektől való függése az elméleti tányérmagassággal fejezhető ki:

$$H = \frac{L}{N} \quad (1.10)$$

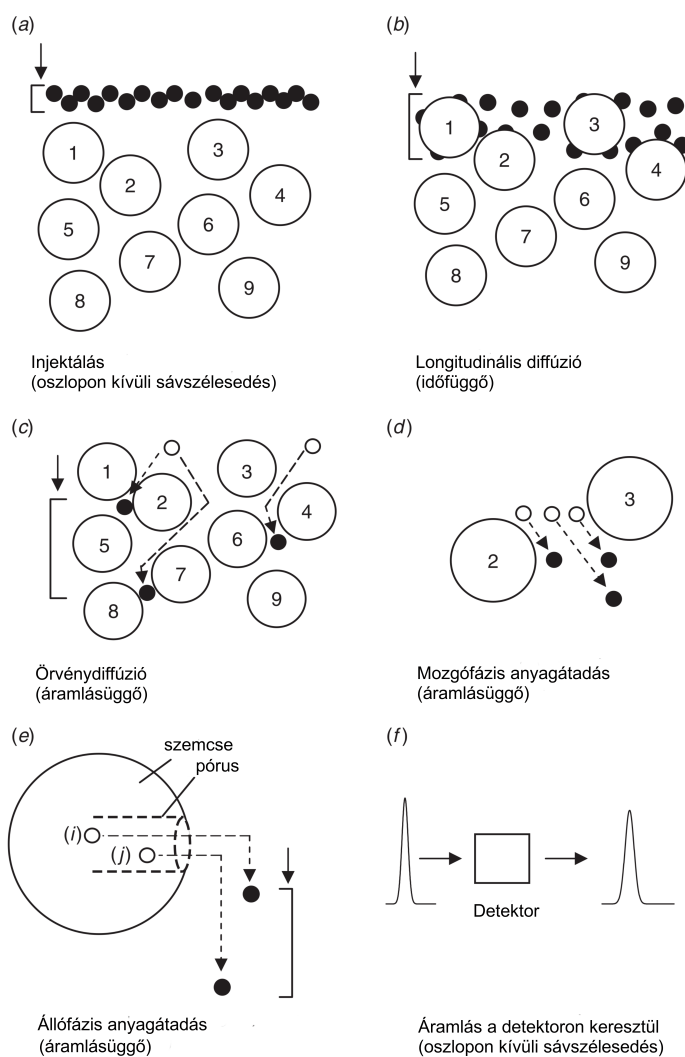
H az oszlop hosszúságegységre eső hatékonyságának mértéke. Mivel H a csak méreteiben különböző oszlopok esetén konstans, ebből következően az oszlophossz növelése egy megfelelő mód az N növelésére és az elválasztás javítására.

A csúcsszélesség (és ezen keresztül az N) végső értékét különféle oszlopon kívüli és oszlopon belüli folyamatok hozzájárulásai határozzák meg (1.3. ábra). Az oszlopon kívüli hozzájárulás W -hez a műszer technikai paramétereitől és az oszlop méretétől függ. Az oszlopon kívüli sávszélesedés elsősorban kisméretű szemcsékkel töltött kis térfogatú oszlopok esetén jelenthet problémát.

A *longitudinális diffúzió* során a molekulák a sáv közepétől a sáv két szélé felé mozognak el, miközben a mozgófázisban a detektor felé haladnak. Ez a folyamat a molekulák oszlopban töltött idejének növekedtével növeli a sávszélességet. Mivel a sáv oszlopon való áthaladásának ideje fordítottan arányos a mozgófázis áramlási sebességével, így ennek a hozzájárulásnak mértéke a W -hez gyorsabb áramlás esetén csökkenthető.

Az oszloptöltet szemcséi között, a különböző csatornában az azonos sebességgel

haladó molekulák különböző hosszúságú utat tesznek meg. A szűkebb csatornákon keresztül áramló molekulák előbb jutnak el a detektorba, mint a szélesebb csatornákban áramlóak. A sávszélesedésnek ezt a hozzájárulását *örvénydiffúciónak* nevezzük, amelyet az állófázis szemcséinek átmérője, alakja, méreteloszlása, valamint az oszlop tömörítettségének mértéke határoz meg, és független a mozgófázis áramlási sebességétől.



1.3. ábra A HPLC-s elválasztás során történő sávszélesedéshez való hozzájárulások illusztrációja [1].

Az *anyagátadási gátlás* mozgófázis járulékat az eredményezi, hogy az oszlopban áramló folyadék sebessége az oszlop falától a középpont felé haladva növekszik. Az állófázis járulékat a molekuláknak a szemcsék pórusaiban töltött különböző ideje adja. A sávszélesedés ezen hozzájárulása az áramlási sebességgel együtt növekszik. Végül a komponens sávja elhagyja az oszlopot és áthalad a detektoron, ami által újabb oszlopon kívüli sávszélesedés történik. A kromatográfiás sávok szélesedését okozó tényezők

együttes hatását az ún. van Deemter egyenlet írja le:

$$H = A + \frac{B}{u} + C u \quad (1.11)$$

ahol A , B és C oldószertől, oszloptól és mérési paraméterektől függően különböző értékű konstansok.

Két csúcs (i és j) elválasztását általában a felbontással, R_S , szokás jellemezni:

$$R_S = \frac{2 [t_{R(j)} - t_{R(i)}]}{W_i + W_j} \quad (1.12)$$

A kromatográfiás oszlop felbontása megadja, hogy milyen mértékben sikerül két egymás után eluálódó komponenst két különálló sáv formájában elválasztani. A pontos mennyiségi analízis az alapvonali elválasztáson alapszik, amikor a két csúcs közötti átlapolás mértéke nem nagyobb 0,1%-nál. Ilyenkor a felbontás értékének legalább 1,5-nek kell lennie. Módszerfejlesztés szempontjából célszerű bevezetni egy közelítő kifejezést a felbontásra:

$$R_S = \left(\frac{1}{4}\right) \left[\frac{k}{1+k}\right] (\alpha - 1) N^{0.5} \quad (1.13)$$

Ebben a kifejezésben a felbontás, mint az első csúcs retenciós tényezőjének, k , a szelektivitásnak, α , és az oszlop hatékonyságának vagy tányérszámnak, N , függvényeként szerepel. A szelektivitás a következőképpen definiálható:

$$\alpha = \frac{k_j}{k_i} \quad (1.14)$$

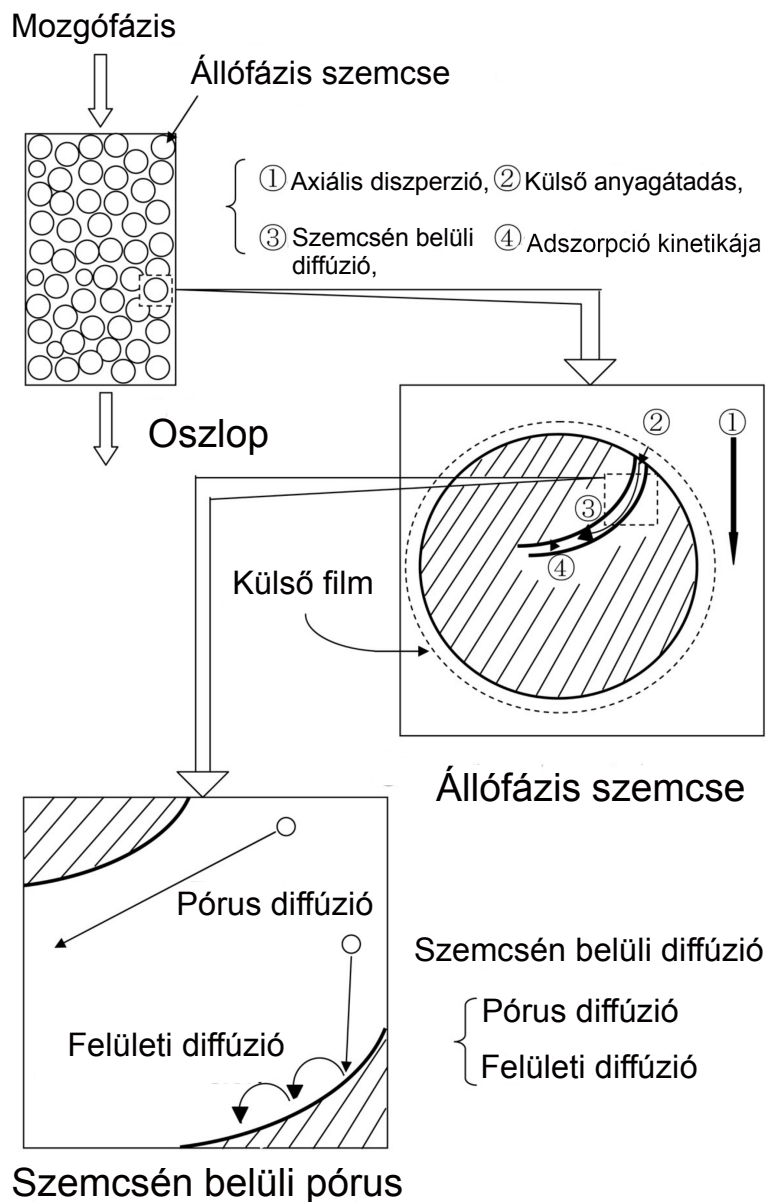
Az (1.13) egyenlet alapján a felbontás javítása három különböző módon lehetséges (k , α és N változtatásával), melyek közül a szelektivitás növelése a leghatékonyabb választás [1].

1.2. A folyadékkromatográfiás elválasztások elmélete

1.2.1. A tömegmérleg egyenlet

A kromatográfiás elválasztás folyamata hidrodinamikai, termodinamikai és kinetikai eredetű komplex jelenségek bonyolult kombinációjaként értelmezhető. A mozgófázis keresztuláramlik a porózus szemcsékből álló oszloptölteten, miközben magával szállítja a szétválasztandó elegy komponenseit, amelyek különböző mértékben kölcsönhatnak az állófázissal. A komponensek diffúzió révén jutnak be a szemcsék pórusaiba, ahol molekuláris kölcsönhatást vagy ideiglenes kémiai kötést alakíthatnak ki az állófázissal, majd a mozgófázissal együtt elhagyják az oszlopot (1.4. ábra). A kísérleti körülmé-

nyektől függően a fázisegyensúly termodinamikájának és az anyagátadás kinetikájának relatív jelentősége változhat. Az injektált elegy komponenseinek tömege azonban bármilyen kromatográfiás elválasztás folyamán mindvégig állandó.



1.4. ábra A folyadékkromatográfiás oszlopban történő anyagátadási folyamatok sematikus illusztrációja [2].

A tömegmérleg egyenletet elsőként Wicke [3] vezette le, majd később tőle függetlenül, különböző formákban Wilson [4] és DeVault [5] is.

Egy adott i komponensre vonatkozóan a tömegmérleg egyenlet így adható meg [6]:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = -F \frac{\partial c_{s,i}}{\partial t} - u \frac{\partial c_i}{\partial z} + D_{L,i} \frac{\partial^2 c_i}{\partial z^2} \quad (1.15)$$

Az egyenlet két független változója az idő, t , és a hosszirányú helykoordináta, z . Ennek a két változónak a függvényeként értelmezendő a komponens koncentrációja a mozgófázisban, c_i , illetve az állófázisban, $c_{s,i}$. $D_{L,i}$ a komponens axiális diszperziós koefficiense a mozgófázisban (molekuláris és örvénydiffúzió összege), u a mozgófázis lokális átlagos sebességét, F pedig a fázisarányt jelöli, ami az álló- illetve a mozgófázis térfogatainak aránya, V_S/V_M . F kifejezhető a töltet teljes porozitásával, ϵ , is:

$$F = (1 - \epsilon)/\epsilon \quad (1.16)$$

Az (1.15)-ös egyenlet egy másodrendű parciális differenciálegyenlet. A mérleg-egyenlet bal oldalán lévő tag a felhalmozódást jelöli a mozgófázisban. Az egyenlet jobb oldalának első tagja a felhalmozódás az állófázisban, a második tag a konvekciós tag, a harmadik tag pedig a diffúziós tag.

A kromatográfiás sáv profiljának számításához a rendszer minden egyes komponensére felírandó egy tömegmérleg egyenlet, beleértve a mozgófázis komponenseit is. A legegyszerűbb esetben tehát egykomponensű minta tiszta eluens által eluált profiljának számításához két tömegmérleg egyenlet szükséges. A folyadékkromatográfiás gyakorlatban az alábbi feltételezésekkel élve a probléma nagymértékben egyszerűsíthető [4, 5, 7]:

- az oszlop radiálisan homogén
- a mozgófázis összenyomhatósága elhanyagolható
- az axiális diszperziós koefficiens konstansnak tekintett
- a minta komponensek parciális moláris térfogatai a két fázisban megegyeznek
- az oldószer (egykomponensű eluens) vagy a gyengébb oldószer (többkomponensű eluens) nem adszorbeálódik
- nincsenek termikus effektusok, az adszorpció hőjének sávprofilra gyakorolt hatása elhanyagolható
- az oszlop konstans körülmények (állandó hőmérséklet, nyomás, eluens áramlási sebesség) között üzemel

Mivel az (1.15) egyenlet két függvényt tartalmaz, a sikeres megoldásához szükséges egy összefüggés megadása c_i és $c_{s,i}$ között. Ha az anyagátadás kinetikája végtelenül gyors és a két fázis egymással egyensúlyban van, akkor ez az összefüggés az egyensúlyi izotermával írható le:

$$c_{s,i} = q_i = f_i(c_1, c_2, \dots, c_1, \dots, c_n) \quad (1.17)$$

ahol $c_{s,i}$ az i komponens pillanatnyi koncentrációja az állófázisban, q_i pedig a c_j [$j \in (1, n)$] mozgófázisbeli koncentrációkkal egyensúlyt tartó állófázisbeli koncentrációja. A különböző adszorpciós izotermák leírására használatos függvényi összefüggéseket, f_i , fejezi ki.

Az (1.15) differenciálegyenlet megoldásához szükséges még a kezdeti és a peremfeltételek definiálása. A kezdeti feltételek az oszlop állapotát írják le az analízis kezdetén, $t = 0$ időpillanatban. Konvencionális elúció (az oszlopban csak gyenge oldószer van jelen) esetén:

$$c_i(z, t = 0) = 0 \quad 0 \leq z \leq L \quad (1.18)$$

ahol L az oszlophossz.

Ha a mozgófázis tartalmaz valamilyen adalékot, vagy ha az erős oldószer kezdeti koncentrációja nem nulla, akkor a kezdeti feltétel:

$$c_a(z, t = 0) = c_a^0 \quad 0 \leq z \leq L \quad (1.19)$$

ahol c_a^0 a mozgófázisban lévő adalékanyag koncentrációja.

Az elúcióra felírható legáltalánosabb peremfeltétel:

$$c_i(0, t) = c_i^0 \phi_s(t) \quad (1.20)$$

ahol c_i^0 az i komponens betáplált koncentrációja és $\phi_s(t)$ az injektálási profil. Ez természetesen azt feltételezi, hogy a komponens mozgófázisbeli oldhatósága nagyobb, mint c_a^0 .

1.2.2. Az egyensúlyi-diszperzív modell

Ha az anyagátadás kinetikája gyors, de nem végtelenül gyors vagy az adott komponens diszperziós koefficiense pontosan kiszámolható, akkor differenciális tömegmérleg egyenlet így írható fel [8, 9, 10]:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -F \frac{\partial q}{\partial t} - u \frac{\partial c}{\partial z} + D_a \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \quad (1.21)$$

ahol q és c a komponens koncentrációja az álló-, illetve a mozgófázisban, amelyek viszonya az izoterma egyenlettel írható le, $q = f(c)$. Az (1.21) egy lokális egyenlet, amely az oszlop minden pontjára érvényes. Lineáris izotermát feltételezve, $q = a c$ és $k_0 = F a$, az (1.21) egyenlet a következő formában írható:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\frac{u}{1 + k_0} \frac{\partial c}{\partial z} + \frac{D_a}{1 + k_0} \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \quad (1.22)$$

ahol a a lineáris izoterma meredeksége és k_0 a komponens retenciós tényezője végtelenül híg oldatban.

A látszólagos diszperziós koefficiens, D_a , így adható meg:

$$D_a = \frac{HL}{2t_0} = \frac{Hu}{2} \quad (1.23)$$

ahol H az oszlop elméleti tányérmagassága (HETP) az adott komponensre vonatkozóan és t_0 az oszlop holtideje (L/u). Ennek a közelítésnek köszönhetően az egyensúlyi-diszperzív modell megfelelő módon veszi figyelembe az oszlop hatékonyságának az elúciós sávok profiljára gyakorolt hatását.

Lineáris körülmények között, egy Gauss-görbével jellemezhető kromatográfiás csúcs varianciája, σ_l^2 , Dirac-impulzus jellegű injektálási profil esetén, hosszúság egységben megadva:

$$\sigma_l^2 = HL = 2 D_a t_0 \quad (1.24)$$

Az egyensúlyi-diszperzív modell alapján minden nem-egyensúlyi folyamatokból származó hozzájárulás összevonható a látszólagos axiális diszperziós tagba. A modell másik fontos állítása, hogy a komponensek látszólagos axiális diszperziós koefficiense koncentrációtól függetlenül állandó.

1.2.3. Az általános sebességi modell

Bizonyos poláris komponensek és nagyméretű molekulák preparatív elválasztása esetén számolni kell a lassú és bonyolult anyagátadási mechanizmusokkal, amelyek erősen befolyásolják a sávprofilok kialakulását. Az általános sebességi modell célja figyelembe venni minden anyagátadási gátlásból származó sávprofilok alakulásához való hozzájárulást [11, 12, 13], így az axiális diszperziót, a külső film anyagátadási gátlást, a szemcséken belüli diffúziót és az adszorpció-deszorpció sebességét.

Mivel a modell külön tárgyalja az állófázis szemcséken belül és kívül lejátszódó folyamatokat, ezért egy adott komponens esetén két tömegmérleg egyenlet felírása szükséges, egy a szemcsék között áramló mozgófázisra és egy a szemcséken belüli stagnáló mozgófázisra vonatkozóan.

Az áramló mozgófázisra vonatkozó tömegmérleg [11, 14, 15]:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -F \frac{\partial \bar{q}}{\partial t} - u \frac{\partial c}{\partial z} + D_L \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \quad (1.25)$$

ahol $\bar{q}$ az egész szemcsére átlagolt állófázisbeli koncentráció, gömb alakú szemcse esetén:

$$\bar{q} = \frac{3}{r_p^3} \int_0^{r_p} r^2 q \, dr \quad (1.26)$$

ahol r_p a szemcse sugarát, r pedig a radiális helyvektort jelöli. A $\partial \bar{q} / \partial t$ tag az (1.25)

egyenletben az adszorpció-deszorpció átlagos sebességét fejezi ki. Gömb alakú szemcsére megadva $\partial \bar{q} / \partial t = 3 / (r_p M_F)$, ahol M_F a komponens tömegfluxusa az oldatból a szemcse külső felszínére.

A szemcse külső felszínére vonatkozó peremfeltétel:

$$M_F = D_p \frac{\partial c_p}{\partial r} \Big|_{r=r_p} = k_f (c - c_p \Big|_{r=r_p}) \quad (1.27)$$

ahol D_p a komponens pórusdiffúziós koefficiense, k_f a külső film anyagátadási koefficiens és c_p a komponens koncentrációja a szemcse pórusaiban, ami r függvényeként értelmezendő.

A komponens differenciális tömegmérlege az adszorbens szemcse pórusaiban egy másik parciális differenciálegyenlettel adható meg [11, 13, 16]:

$$\frac{\partial c_p}{\partial t} = -\frac{1 - \epsilon_p}{\epsilon_p} \frac{\partial c_s}{\partial t} + \frac{D_p}{\epsilon_p} \left(\frac{\partial^2 c_p}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_p}{\partial r} \right) \quad (1.28)$$

ahol ϵ_p a szemcse belső porozitása. A szimmetriafeltétel miatt:

$$\frac{\partial c_p}{\partial r} \Big|_{r=0} = 0 \quad (1.29)$$

A komponens állófázison adszorbeált koncentrációja, c_s , és pórusbeli koncentrációja közötti összefüggés az adszorpció izoterma egyenlettel írható le: $c_s = K_a c_p$ (lineáris esetben). Ha az adszorpció-deszorpció kinetikája túlságosan lassú, ez az összefüggés az adszorpció-deszorpció kinetikus egyenletével írható le. Lassú elsőrendű adszorpció-deszorpció kinetikát feltételezve:

$$\frac{\partial c_s}{\partial t} = k_{ads} (c_p - c_p^*) = k_{ads} \left(c_p - \frac{c_s}{K_a} \right) \quad (1.30)$$

ahol k_{ads} és K_a az adszorpció sebességi, illetve egyensúlyi állandója.

Impulzus típusú injektálás esetén a kezdeti és peremfeltételek:

$$c(z, 0) = 0 \quad (1.31a)$$

$$c_p(r, z, 0) = 0 \quad (1.31b)$$

$$c(0, t) = c_0 \quad 0 \leq t \leq t_p \quad (1.31c)$$

$$c(0, t) = 0 \quad t \geq t_p \quad (1.31d)$$

ahol t_p az injektálást leíró négyszögfüggvény szélessége.

A [(1.25)-(1.31)] egyenletekből álló parciális differenciálegyenlet-rendszer idő tartományban való megoldása, annak bonyolultsága miatt nem lehetséges. A Laplace tar-

tományban történő megoldást elsőként Kučera [17] és Kubin [18] közölték lineáris izoterma esetére. Az így kapott megoldásokat nem lehet idő tartományba visszatranszformálni, de kifejezhetőek belőlük a statisztikai momentumok.

Egy eloszlás momentumainak definíciója alapján a sávprofil n -edik momentuma a kromatográfiás oszlop végén ($z = L$):

$$M_n = \int_0^\infty c(t, z = L) t^n dt \quad (1.32)$$

Az n -edik abszolút vagy normalizált momentum:

$$\mu_n = \frac{M_n}{M_0} = \frac{\int_0^\infty c(t, L) t^n dt}{\int_0^\infty c(t, L) dt} \quad (1.33)$$

és az n -edik centrális momentum:

$$\mu'_n = \frac{M_n}{M_0} = \frac{\int_0^\infty c(t, L) (t - \mu_1)^n dt}{\int_0^\infty c(t, L) dt} \quad (1.34)$$

Van der Laan elmélete [19] alapján a kromatográfiás oszlop válaszfüggvényének momentumai impulzus injektálás esetén kiszámolhatók a Laplace tartományban történő analitikus megoldásból:

$$M_n = (-1)^{n-1} \lim_{s \rightarrow 0} \frac{\partial^n C(s, L)}{\partial s^n} \quad (1.35)$$

ahol $C(s, L)$ az elúciós profil Laplace transzformáltja és s a Laplace változó.

Az általános sebességi modell megoldása [(1.25)-(1.31)] alapján az elúciós csúcs első normalizált momentuma:

$$\mu_1 = \frac{L}{u} \delta_0 \quad (1.36)$$

ahol δ_0 a következő képlettel adható meg:

$$\delta_0 = \epsilon + (1 - \epsilon)(\epsilon_p + \rho_p K_a) \quad (1.37)$$

ahol ρ_p a töltetanyag sűrűsége. Ha az elúciós csúcs szimmetrikus, az első momentum a retenciós idővel, t_R , egyezik meg:

$$t_R = t_0 (1 + k) \quad (1.38)$$

ahol k az adott komponens retenciós tényezője, ami a komponens álló- és mozgófázisbeli anyagmennyiségeinek arányaként (n_s/n_m) definiálható.

Az elúciós csúcs második centrális momentuma a varianciát, σ^2 adja meg:

$$\mu_2' = \sigma^2 = \frac{2L}{u} (\delta_{ax} + \delta_f + \delta_d) \quad (1.39)$$

ahol

$$\delta_{ax} = \frac{D_L}{u^2} \delta_0^2 \quad (1.40)$$

$$\delta_f = (1 - \epsilon) \frac{r_p}{3 k_f} (\epsilon_p + \rho_p K_a)^2 \quad (1.41)$$

és

$$\delta_d = (1 - \epsilon) \frac{r_p^2}{15 D_e} (\epsilon_p + \rho_p K_a)^2 \quad (1.42)$$

D_e a szemcsén belüli diffúziós állandót jelöli. A δ_{ax} , δ_d és δ_f tagok az axiális diszperzió, a film anyagátadási és a szemcsén belüli diffúziós hozzájárulások μ_2' -höz.

Az első két momentum segítségével kiszámolható az oszlop tányérszáma:

$$N = \frac{\mu_1'^2}{\mu_2'} = \frac{t_R^2}{\sigma^2} \quad (1.43)$$

és elméleti tányérmagassága:

$$H = \frac{\mu_2'}{\mu_1'^2} L = \frac{L}{N} = \frac{\sigma^2}{t_R^2} L \quad (1.44)$$

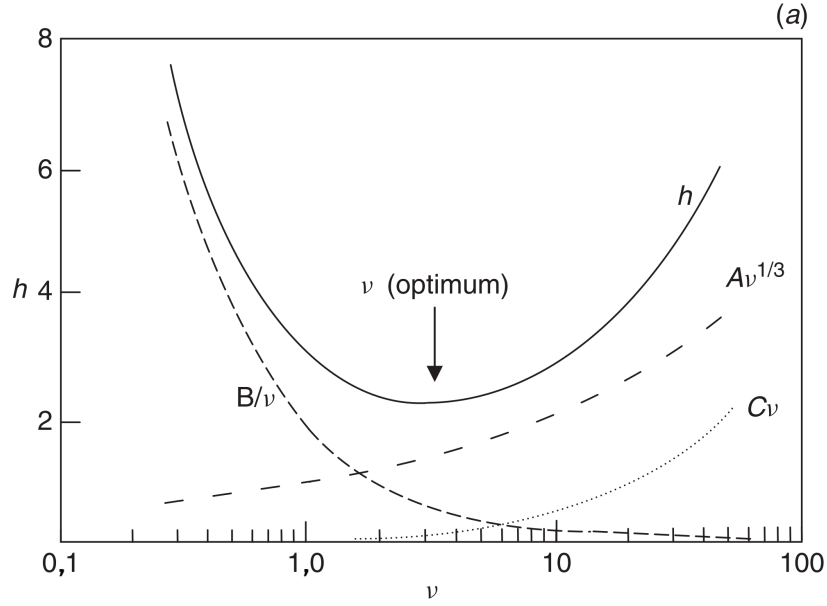
A tányérmagasságra vonatkozó valamennyi egyenlet levezethető az általános sebességi modellből, ami a kromatográfia leginkább kifinomult és átfogó modelljének tekinthető. Az oszlop elméleti tányérmagasságának kísérleti paraméterektől való függésére vonatkozó kifejezések különbözősége az axiális diszperzió, D_L , és a film anyagátadási koefficiens, k_f eltérő definiálásából ered. Ilyen kifejezések a van Deemter-egyenlet [9]:

$$h = A + \frac{B}{\nu} + C \nu \quad (1.45)$$

és a Knox-egyenlet [20] (1.5. ábra):

$$h = A \nu^{\frac{1}{3}} + \frac{B}{\nu} + C \nu \quad (1.46)$$

ahol $h = H/d_p$ a redukált tányérmagasság, $\nu = u d_p/D_m$ a redukált sebesség, d_p a szemcseátmérő, D_m a molekuláris diffúziós állandó, A , B és C pedig az örvénydiffúziót, longitudinális diffúziót és az anyagátadási gátlást kifejező paraméterek.



1.5. ábra A Knox egyenlet. A redukált tányérmagasság, h , ábrázolása a redukált sebesség, ν , függvényében $A=1$, $B=2$, és $C=0,05$ paraméter érték esetén. Az eredő tányérmagasságot, h , folytonos vonal, a (1.46) egyenlet három tagját szaggatott vonalak jelölik [1].

1.2.4. A Martin-Synge tányérmodell

A Martin és Synge által kidolgozott tányérmodell [21] az oszlopot folytonosan kevert egységek sorozataként kezeli. A mozgófázis egyik tányérról a másikra áramlik, miközben a legelső tányérra új mozgófázis kerül. Így a mozgófázis áramlása folytonos és a mozgó- és állófázisok térfogata, v_m és v_s , minden egységben állandó. A modell azt is feltételezi, hogy az analízis kezdetén az első tányér ($l=1$) csak a mintát tartalmazza és a többi egységben nincsenek minta komponensek.

A tömegmérleg az l -edik számú kevert egységre vonatkozóan, amikor dv térfogatú mozgófázis áramlik tányérok sorozatán keresztül, így adható meg:

l – edik egységbe belépő anyagmennyiség = l – edik egységből kilépő anyagmennyiség
+ felhalmozódás a koncentrációváltozás következtében

vagy

$$C_{m,l-1}dv = C_{m,l}dv + v_m dC_{m,l} + v_s dC_{s,l} \quad (1.47)$$

Mivel azt feltételezzük, hogy teljes (lineáris) egyensúly valósul meg minden tányéron, ezért

$$dC_{s,l} = a dC_{m,l} \quad (1.48)$$

ahol a az adszorpciós izoterma meredeksége. A (1.47) és (1.48) egyenlet kombináció-

jával egy könnyen megoldható lineáris, elsőrendű differenciálegyenletet nyerünk. Ha a modell alapján azt feltételezzük, hogy a kísérlet kezdetén csak az első tányér tartalmaz minta komponenset, amelynek koncentrációja $C_{m,0}$ a mozgófázisban és $C_{s,0}$ az állófázisban, akkor

$$\frac{C_l}{C_{m,0}} = \frac{e^{-x} x^l}{l!} \quad (1.49)$$

A (1.49) egyenlet egy Poisson eloszlás függvény, melynek változója a tányér sorszáma, l , x pedig egy konstans:

$$x = \frac{V}{v_m + a v_s} = \frac{F_v t}{v_m + a v_s} = \frac{t}{\tau} \quad (1.50)$$

ahol $\tau = (v_m + a v_s)/F_v$ az oszlop $v_m + a v_s$ nagyságú térfogatán való keresztülhaladáshoz szükséges idő, vagy tányérra vonatkoztatott retenciós idő, V az l -edik tányéron átfolyó mozgófázis teljes térfogata a kísérlet kezdetétől számítva, $v_m + a v_s$ az összes tányérra vonatkozó ekvivalens térfogat, és F_v a mozgófázis térfogatárama. Nagy x értékek esetén a Poisson eloszlás jól közelíthető Gauss eloszlással:

$$f(l) = \frac{1}{\sigma_s \sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{(l - \mu_s^2)}{2\sigma_s^2} \right] \quad (1.51)$$

ahol σ_s a szórás, és μ_s az átlag. A statisztika szabályai alapján az (1.49) egyenlet eloszlásának átlaga $\mu_s = x$, varianciája pedig $\sigma_s^2 = x$ -ként adható meg.

A komponens koncentrációjának maximuma az utolsó egység elhagyásakor eluálódik az oszlopból (N -edik egység, $l = N - 1$). A sávmaximum elúciójához szükséges műveletek száma:

$$\mu_s = x = N \quad (1.52)$$

ezért

$$\frac{\mu_s^2}{\sigma_s^2} = x = N \quad (1.53)$$

Fontos megjegyezni, hogy az (1.49) egyenlet nem a csúcs elúciós profilja, hanem a komponens térbeli eloszlás profilja az oszlop mentén. Az elúciós profil a komponens mennyiségének eloszlása, amely elhagyja az utolsó egységet. Ez az eloszlás $C_{m,N-1}/(\tau C_{m,0})$ -ként adható meg. Ekkor, az (1.49) egyenlet esetével ellentétben, l konstans és $(N - 1)$ -el egyenlő, x pedig a változó. A folytonos tányérmodell alapján az elúciós profil:

$$f(t) = \frac{1}{\tau} e^{\frac{1}{\tau}} \left[\frac{t}{\tau} \right]^{(N-1)} \frac{1}{(N-1)!} \quad (1.54)$$

Ebben az egyenletben N rögzített értékű és t a változó, ezért az (1.49) egyenlettel ellentétben nem Poisson eloszlás, hanem gamma sűrűségfüggvény, amelynek első momen-

tuma:

$$\mu = \tau N \quad (1.55)$$

varianciája pedig:

$$\sigma^2 = \tau^2 N \quad (1.56)$$

Mivel az eloszlás első momentuma a retenciós idővel egyenlő, az (1.55) egyenletből levezethető, hogy

$$\tau = \frac{t_R}{N} \quad (1.57)$$

Az (1.54) és (1.57) egyenletek kombinációjából következően

$$f(t) = \frac{1}{t_R} e^{-\frac{Nt}{t_R}} \left[\frac{Nt}{t_R} \right]^{(N-1)} \frac{1}{(N-1)!} \quad (1.58)$$

Nagy tányérszám értékek esetén a gamma sűrűségfüggvény a Gauss függvényt közelíti (1.51 egyenlet).

1.2.5. Izoterma modellek

Brunauer, Emmett és Teller kidolgoztak egy széleskörben használatos modellt homogén felületekre történő nem-ideális adszorpció leírására [22]. Az egyenlet folyadék-szilárd egyensúly esetére kiterjesztve a következőképpen írható [23, 24]:

$$q = \frac{q_s b_s c}{(1 - b_l c)(1 - b_l c + b_s c)} \quad (1.59)$$

ahol q_s az állófázis telítési kapacitása, q és c az oldott anyag koncentrációi az állófázison és a mozgófázisban, b_s és b_l az állófázis felületére történő adszorpció illetve az adszorbeált rétegre történő adszorpció egyensúlyi állandói. A BET izoterma modell feltételezése alapján az oldott molekulák adszorpciója történhet egyrészt az oldatból az adszorbens felületére vagy a már adszorbeált molekulák rétegére.

Ha nincs kölcsönhatás az adszorbeált molekularétegek között, azaz b_l értéke nulla, akkor a (1.59) egyenlet Langmuir izotermává egyszerűsödik:

$$q = \frac{q_s b_s c}{1 + b_s c} \quad (1.60)$$

Sok esetben a kromatográfiás elválasztások során alkalmazott adszorbens felülete nem tekinthető homogénnek. A legegyszerűbb modellnek nemhomogén felületek leírására két különböző kémiai csoporttal borított homogén felület keveréke tekinthető. Ilyen felületekre történő adszorpció leírására szolgál a bi-Langmuir izoterma modell:

$$q = \frac{q_s^1 b_s^1 c}{1 + b_s^1 c} + \frac{q_s^2 b_s^2 c}{1 + b_s^2 c} \quad (1.61)$$

ahol q_s^1 és q_s^2 a telítési kapacitások, b_s^1 és b_s^2 pedig az adszorpciós egyensúlyi állandók a két különböző adszorpciós centrumra vonatkozóan.

1.2.6. Izotermák meghatározásának módszerei

Gyors és hatékony elválasztások kivitelezéséhez szükséges az elválasztást befolyásoló termodinamikai folyamatok ismerete [6]. Preparatív folyadékkromatográfiában az optimális elválasztási körülmények és az oszlop terhelhetősége elsősorban az adszorpciós izoterma típusától függ [25, 26]. Az adszorpciós izotermák becslése hozzájárul az elválasztási folyamatok és a molekuláris kölcsönhatások mélyebb megértéséhez is [27, 28, 29].

Adszorpciós izotermák meghatározására öt közvetlen kromatográfias módszer különböztethető meg: frontális analízis [30, 31], frontális analízis karakterisztikus pontokkal [32], elúció karakterisztikus pontokkal [33], impulzus módszerek [34] és a retenciós idő módszere [35]. A közvetlen módszerek elve az oszlop válaszfüggvényének kiszámítása adott bemeneti koncentráció esetén az egyensúlyi izoterma és a sebességi állandók (vagy a diszperziós koefficiens) ismeretében. Az oszlop válaszfüggvénye lehet a koncentrációprofil az oszlop kimeneténél vagy az oszlopban egy adott időpillanatban.

Frontális analízis során a minta komponens oszlopba injektálása történhet növekvő koncentrációjú oldatsorozatból vagy számítógép vezérelt gradiens szállító rendszer segítségével, amely képes ismert koncentrációk lépcsőzetes gradiensének előállítására. Minden egyes koncentrációhoz egy áttörési görbe határozható meg. Az egyensúlyi helyzetben adszorbeált komponens tömege az áttörési görbe integráljából számolható. A detektorjel integrálása a holtidő és azon időpont között történik, amikor a jel elérte az injektálási koncentrációnak megfelelő értéket.

Ha az oszlop hatékonysága nagy, a következő közelítés tehető:

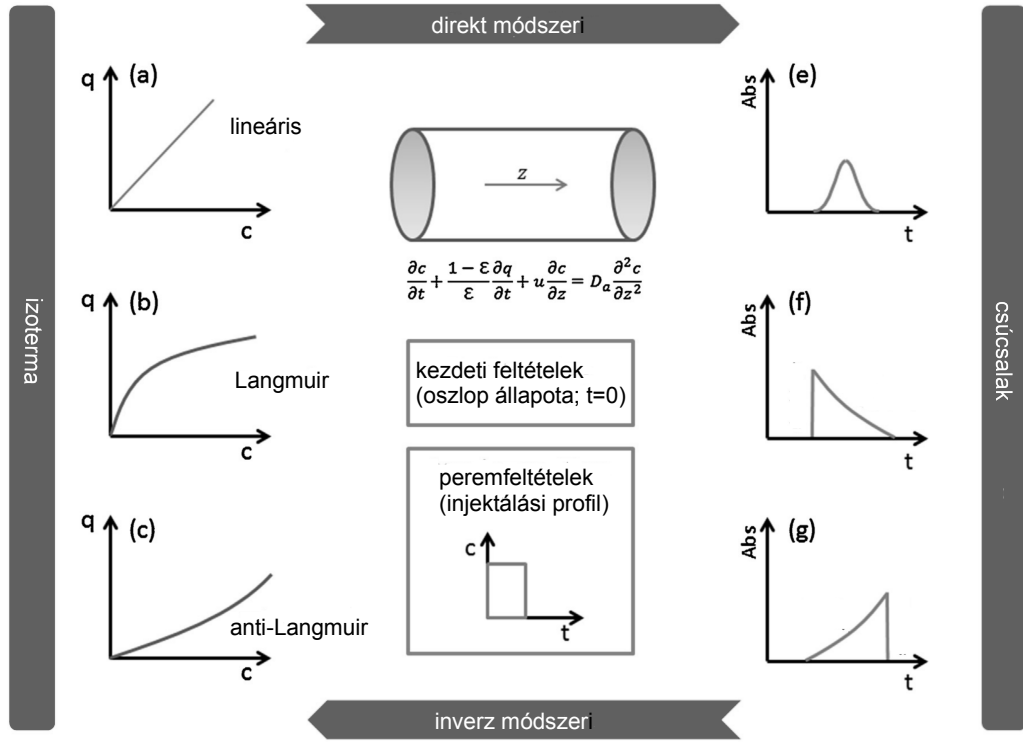
$$q_{i+1} = q_i + \frac{(c_{i+1} - c_i)(V_{F,i+1} - V_0)}{V_a} \quad (1.62)$$

ahol q_{i+1} és q_i az állófázis által adszorbeált komponens mennyiségei az i -edik és az $(i + 1)$ -edik lépés után, egyensúlyt tartva a c_i és a c_{i+1} koncentrációkkal, $V_{F,i+1}$ az $(i + 1)$ -edik áttörési görbe inflexiós pontjához tartozó retenciós térfogat, V_0 az oszlop holttérfogata, V_a pedig az adszorbens térfogata.

A frontális analízis hagyományosan a legpontosabbnak tekintett és leggyakrabban használt módszer adszorpciós izotermák meghatározására. A módszer alkalmazást nyert többek között peptidek [36] és proteinek [16, 37, 38] izotermájának meghatározásánál.

Egy újabb megközelítés adszorpciós izotermák meghatározására az úgynevezett inverz módszer. A módszer sikeres alkalmazásához szükséges egy előzetes becslés a paraméterekről, amely kinyerhető például a retenciós idő módszerét alkalmazva. Egy megfelelő izoterma egyenlet és egy robusztus minimalizáló algoritmus (amely

megkeresi a lehető legkisebb eltérést a mért csúcsalak és az izoterma egyenletből számított csúcsalak között) segítségével meghatározható az izoterma paramétereinek készlete [39, 40, 41, 42]. Ezt a megközelítést alkalmazva tehát *a priori* szükséges egy adszorpciós izoterma modell, a direkt technikákkal ellentétben, ahol az egységnyi állófázis térfogat által adszorbeált komponens mennyisége közvetlenül a mérési adatokból származik és a modell illesztése ezután történik (1.6. ábra).



1.6. ábra A kromatográfiás izoterma meghatározás direkt és inverz módszerének illusztrációja [42].

Röviden az inverz módszer a következő lépéseket tartalmazza:

- az izoterma modell kiválasztása és paraméter értékeinek kezdeti becslése,
- a tútelített profil kiszámítása a tömegmérleg egyenlet integrálásával, felhasználva az izoterma paraméterek becsült értékeit,
- a mért és számolt sávprofilok eltérés négyzetösszegének kiszámítása:

$$\min \sum_i r_i^2 = \min \sum_i (c_i^{\text{calc}} - c_i^{\text{meas}})^2 \quad (1.63)$$

ahol c_i^{calc} és c_i^{meas} a számolt és mért koncentrációk az i pontban, és r_i a különbségük,

- az izoterma paraméter értékeinek változtatása a mért és számolt profilok eltérés négyzetösszegének minimalizálásához [43].

1.2.7. Adszorpciós energiaszétosztás meghatározása

Gáz-szilárd egyensúly esetén a kísérleti vagy látszólagos vagy globális izoterma és az adszorpciós energia eloszlásának kapcsolata a következő egyenlettel írható le:

$$q(P) = \int_a^b f(\epsilon) \Theta(\epsilon, P) d\epsilon \quad (1.64)$$

ahol $q(P)$ az egyensúlyban adszorbeálódott komponens mennyisége, P a parciális nyomása, $f(\epsilon)$ az adszorpciós energiaszétosztás, és $\Theta(\epsilon, P)$ az adszorpció lokális modellje (az adszorpciós izoterma a felület egy homogén részén, ahol az adszorpciós energia ϵ). Az a és b integrálási határok az adszorpciós energia lehetséges minimum és maximum értékeinek felelnek meg.

Az (1.64) egyenlet kibővíthető folyadék-szilárd rendszerekre. Az adszorpciós energia, ϵ , és az adszorpciós egyensúlyi konstans, b_s kapcsolata az alábbi egyenlettel fejezhető ki:

$$b_s(\epsilon) = b_{s,0} \exp\left(\frac{\epsilon}{RT}\right) \quad (1.65)$$

ahol $b_{s,0}$ egy pre-exponenciális tényező, melynek értéke azonosnak feltételezett bármely típusú adszorpciós hely esetére.

Lokális BET izoterma esetén Θ az (1.59) egyenlettel helyettesíthető, melynek alapján az (1.64) egyenlet így írható:

$$q(c) = \int_a^b f(\epsilon) \frac{b_s(\epsilon) c}{(1 - b_l c)(1 - b_l c + b_s(\epsilon) c)} d\epsilon \quad (1.66)$$

Egy lokális izotermát feltételezve, az adszorpciós energiaszétosztás, $f(\epsilon)$, meghatározható egy mért izotermából a várható érték-maximalizálás algoritmus segítségével. Az egyensúlyi mozgófázis koncentráció esetén adszorbeált komponens koncentrációjának, q , iteratív becslése, amennyiben az adszorpciós energia intervallumot N pontra osztjuk fel:

$$q_{c,j}^k = \Delta\epsilon \sum_{i=1}^N f^k(\epsilon_i) \Theta(\epsilon_i, c_j) \quad (1.67)$$

és

$$\Delta\epsilon = \frac{\epsilon_{max} - \epsilon_{min}}{N - 1} \quad (1.68)$$

ahol ϵ_{min} és ϵ_{max} az adszorpciós energia minimum és maximum értéke, q_c^k a komponens k -adik iterációs lépés után számolt állófázisbeli koncentrációja, $f^k(\epsilon)$ az adszorpciós energia eloszlása k számú iteráció után, és $j \in [1, M]$, ahol M a mért izoterma pontok száma.

Adszorpciós energiaszétosztás meghatározása során $f(\epsilon)$ minden iterációs lépésben

az alábbiak szerint íródik felül:

$$f^{k+1}(\epsilon_i) = f^k(\epsilon_i) \sum_{j=1}^M \frac{q_{m,j}}{q_{c,j}} \bar{\Theta}(\epsilon_j, c_j) \quad (1.69)$$

ahol $q_{m,j}$ a j -edik mért izoterma pont, és $\bar{\Theta}$ a koncentráció tengelyre normalizált lokális izoterma modell mátrixa:

$$\bar{\Theta}(\epsilon_i, c_j) = \frac{\Theta(\epsilon_i, c_j)}{\sum_{\xi=1}^M \Theta(\epsilon_i, c_\xi)} \quad (1.70)$$

1.2.8. Lineáris és nemlineáris kromatográfia

Lineáris kromatográfiában egy adott komponens egyensúlyi koncentrációi az álló-, illetve mozgófázisban arányosak egymással. Más szavakkal, az egyensúlyi izotermák az origóból kiinduló egyenesek. Ilyenkor a sávok alakja és retenciós ideje független a minta összetételétől és mennyiségétől. A csúcs magassága arányos a komponens mennyiségével az injektált mintában. A lineáris kromatográfia tárgykörébe tartozik a kromatográfia analitikai alkalmazásainál megfigyelt jelenségek nagy része mindaddig, míg a minta komponensek injektált mennyisége megfelelően kicsi. Mivel bármely izoterma kibővíthető másodfokú polinommá, $q(C) = aC + bC^2$, a kromatográfiás kísérlet körülményei lineárisnak tekinthetők, ha $bC \ll a$. A lineáris kromatográfia felfogható a nemlineáris kromatográfia egy speciális határeseteként. A lineáris kromatográfiában a termodinamika csak a sávok pozícióját befolyásolja, a sávok alakját a kinetika kontrollálja.

Nemlineáris kromatográfiában a fázisegyensúlyi izotermák nem lineárisak. Ekkor egy adott komponens állófázisbeli koncentrációja egyensúlyban már nem arányos a mozgófázisbeli koncentrációjával. Bármely komponens egyensúlyi izotermája függ az oldatban lévő összes többi komponens koncentrációjától. Így, az oszlopba betáplált valamennyi komponens tulajdonsága (sávprofil- és magasság, retenciós idő a túltelített elúcióban) a kromatográfiás egység kimeneténél függ a bemeneti tulajdonságoktól (minta összetétele és mennyisége a túltelített elúcióban). Ez gyakorlatilag az összes preparatív alkalmazás esetén fennálló helyzet. Egy ritka kivételt képez néhány cukor ioncserélő gyantákra való adszorpciójának esete, amikor a komponensek izotermája közel lineáris a teljes koncentrációtartományban. A nemlineáris kromatográfia problémáinak összetettsége az egyedi sávprofilok egymástól való kölcsönös függéséből fakad [6].

1.3. Folyadékkromatográfiás töltetek

1.3.1. A folyadékkromatográfiás töltetek fizikai tulajdonságai

A HPLC tölteteknek két alapvető szempontja (1) a töltet felületi kémiája, és (2) a töltet fizikai tulajdonságai. Fizikai tulajdonságok alatt értjük a szemcsék méretét, alakját, szilárdságát, a pórusok méretét és a porozitást. Ezek a paraméterek, más tényezőkkel együtt, meghatározzák az oszlop hatékonyságát, retenciós képességét és HPLC-s elválasztásokra való alkalmasságát [44, 45].

A töltet szemcseméretének különös jelentősége van, hiszen ez határozza meg az oszlop permeabilitását, valamint a hatékonyságát. A legtöbb HPLC töltetnek szemcse-méret szerinti eloszlása van, ami gyártási folyamatok velejárója. A szemcse-méret eloszlás többféleképpen definiálható. A legegyszerűbb módszer, ha ábrázoljuk egy adott átmérőtartományba eső szemcsék számát az átlagos szemcseátmérő függvényében. Ez a populáció eloszlás, amelyből a szám-átlagolt szemcse-méret, $d_{p,n}$ számítható:

$$d_{p,n} = \frac{\sum d_{p,i} n_i}{\sum n_i} \quad (1.71)$$

A másik módszer az adott átmérő tartományba eső szemcsék tömegének vagy térfogatának ábrázolása a szemcse-méret függvényében. Ebből az eloszlásból a térfogat – vagy tömeg-átlagolt szemcse-méret, $d_{p,v}$ számítható ki:

$$d_{p,v} = \frac{\sum d_{p,i}^3 n_i}{\sum d_{p,i}^3} \quad (1.72)$$

A szemcseátmérő harmadik hatványának és a szemcsék számának szorzata arányos az oszlopban lévő szemcsék térfogatával és tömegével, feltételezve hogy a sűrűségük állandó. A térfogat-átlagolt szemcse-méret mindig nagyobb a szám-átlagolt szemcse-méretnél, kivéve ha a szemcsék monodiszperzek (azonos átmérővel rendelkeznek). Az átlagos szemcse-méret határozza meg az oszlop nyomáscsökkenését és hatékonyságát. Széles szemcse-méret eloszlás esetén a nyomáscsökkenés a szám-átlagolt szemcse-mérettől, míg a hatékonyság – a van Deemter egyenlet C tagja – a térfogat-átlagolt szemcse-mérettől függ. A kereskedelembe kapható HPLC töltetek általában keskeny szemcse-méret eloszlásúak. A korai HPLC tanulmányok arról tanúskodnak, hogy amíg a szemcse-méret eloszlás nem tér el 40%-nál nagyobb mértékben az átlagtól, addig elfogadható oszlop hatékonyság és nyomáscsökkenés érhető el [46]. Természetesen jobb eredmények érhetők el keskenyebb szemcse-méret eloszlás esetén [47].

A legtöbb, HPLC-ben használatos szemcse porózus. Méret-kizárásos kromatográfiában a pórusok okozzák az elválasztást. Retenciós kromatográfiában a pórusok fala biztosítja a nagy felületet, ami a retencióhoz szükséges. Egy 5 μm -es szemcse kül-

ső felülete csak $0,02 \text{ m}^2$ 1 ml töltetre vonatkoztatva. Egy teljes térfogatában porózus HPLC szemcse azonban 150 m^2 -es felületet biztosít ml-enként. A töltet külső felülete fordítottan arányos a szemcsemérettel, egy szemcse belső felülete a pórusméret csökkentésével növekszik. Egy töltet felülete tipikusan $100 \text{ m}^2/\text{g}$, ha a pórusméret 30 nm, és $500 \text{ m}^2/\text{g}$, ha a pórusméret 6 nm. Egy molekula diffúziója a töltet pórusaiban lényegesen lelassul, ha a pórusméret kisebb, mint a molekulaméret 10-szerese [48]. Ennek eredményeként a hatékonyság élesen csökken. Következésképpen a legjobb választás egy általános felhasználású HPLC töltet esetén a 10 nm-es pórusméret. A nagy molekulák, mint például proteinek kromatográfiájához legalább 30-100 nm pórusméret szükséges [49, 50, 51, 52].

Minden töltetnek van bizonyos pórusméret eloszlása, de nincs megegyezés arról, hogy mit jelent az átlagos pórusméret. Ennélfogva csak névleges értékek adhatók meg a pórus méretére vonatkozóan. Két módszert alkalmaznak leggyakrabban a pórusméret eloszlás mérésére: a higany porozimetriát és a nitrogén adszorpciót. A higany porozimetria mérési tartománya a szemcsék közötti tértől egészen a 3 nm-es pórusokig terjed, a nitrogén adszorpció technikával akár 0,2 nm-es pórusok is mérhetők.

Méret-kizárásos kromatográfiában a specifikus pórustérfogat különösen fontos, mivel itt történik meg az elválasztás. Ha minden más paraméter megegyezik, a nagyobb pórustérfogat jobb elválasztást eredményez. A specifikus pórustérfogatot a gyártók általában ml/g értékben adják meg. Ez az érték önmagában nem reprezentálja a töltet hatékonyságát, és nem alkalmas különböző anyagi minőségű töltetek összehasonlítására. A pórustérfogat jobban kifejezhető a szemcse porozitással, ϵ_p . Ez a szemcse térfogatának azon része, amit a pórusok foglalnak el:

$$\epsilon_p = \frac{V_{pp}}{V_p} = \frac{V_{pp}}{V_{pp} + V_{sk}} = \frac{V_{sp}}{V_{sp} + \frac{1}{\rho_{sk}}} \quad (1.73)$$

ahol V_{pp} a pórus térfogata, V_p a szemcse térfogata, V_{sk} a szemcse vázának térfogata, V_{sp} a specifikus pórustérfogat és ρ_{sk} a szemcse vázának a sűrűsége.

Retenció kromatográfiában a pórusok biztosítják a retencióhoz szükséges felületet. A szemcsék pórusaiban lévő felület okozza a retenciót, és ennek a felületnek és az oszlop térfogatának aránya a retenció képesség egy mértéke. A töltet felülete, A_{sp} , a mozgófázis térfogatához viszonyítva a fázisarány:

$$\varphi = (1 - \epsilon_i) \frac{A_{sp}}{V_{sp} + \frac{1}{\rho_{sk}}} \quad (1.74)$$

A töltet szemcséinek megfelelő szilárdsággal kell rendelkezniük, hogy a HPLC-ben alkalmazott nyomásnak töredezés vagy deformáció nélkül ellenálljanak. Egy hossz-irány mentén egyenletesen töltött oszlopban a nyomás lineárisan csökken. Ez azt jelenti, hogy az oszlop bármely pontján a szemcsékre azonos erők hatnak. Ennélfogva

a hosszúság egységre vonatkoztatott nyomásesés felhasználható a töltetet alkotó szemcsék szilárdságának mérésére. A polimer töltetek már alacsony – 0,2-0,5 MPa/cm – nyomáson deformációt szenvednek. A szemcséket ezután megvizsgálva nem tapasztalható sérülés. A szilikagél állófázisok nem károsodnak, amíg a nyomás túl nem lépi a 10 MPa/cm értéket. A polimer szemcsékkel ellentétben a szervetlen szemcséknél töredezés figyelhető meg, ha a töltet a nagy nyomás hatására összeomlik. A szemcsék töredezése miatt bekövetkező töltet-összeomlást Groh [53] vizsgálta részletesen. Groh azt találta, hogy adott szemcseméret esetén a kritikus pont, C_{crit} , a mozgófázis lineáris áramlási sebességének, u_i és viszkozitásának, η , szorzatával vagy az oszlop hosszának, L , két vége között mérhető nyomáseséssel, Δp , írható le:

$$C_{crit} = \frac{u_i \eta}{d_p} = \frac{\Delta p}{L/d_p} \quad (1.75)$$

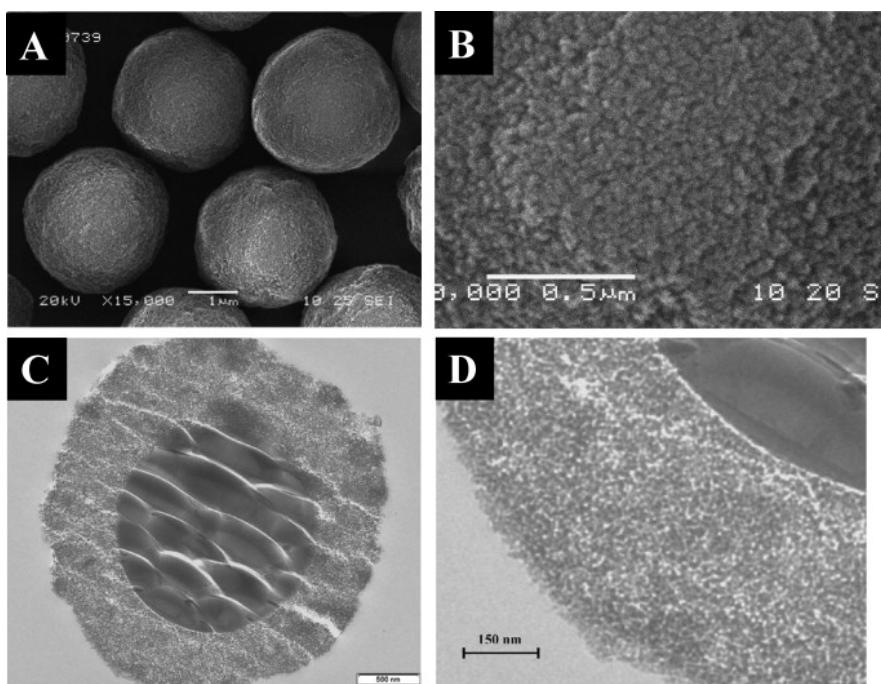
1.3.2. Tömörmagvú töltetek

Az ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfia (UHPLC) 2004-es megjelenése után a következő jelentős előrelépést a folyadékkromatográfia területén a tömörmagvú (maghéj típusú) töltetek újbóli bevezetése jelentette [54, 55]. A nagy felbontás és a gyors elválasztás alapvető paraméterei a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiának. Az analitikai kihívások leküzdése érdekében sok esetben szükséges az oszlophossz csökkentése, illetve a mozgófázis áramlási sebességének növelése, azonban ez utóbbi a teljesen porózus szilikagél szemcsékkel töltött oszlop ellennyomásának növekedésével jár együtt. Ennek a problémának egyik lehetséges megoldása a héjszerkezetű töltetek alkalmazása, amelyek a teljesen porózus szilikagél tölteteknél kisebb ellennyomást okoznak, ugyanis ilyenkor ugyanazon kromatográfiás teljesítmény eléréséhez nagyobb átmérőjű szemcsék is elegendőek.

A héjszerkezetű szemcsék egy tömör magból és egy porózus héjból állnak. A mag átmérője, valamint a héj vastagsága és porozitása kulcsfontosságú paraméterek a kromatográfiás alkalmazhatóság szempontjából. A hasonló méretű teljesen porózus szemcsékkel összehasonlítva a diffúziós úthossz jóval rövidebb, mivel a tömör mag nem hozzáférhető az elválasztandó komponensek számára, ezáltal a tömörmagvú töltetek rövidebb analízis időt biztosítanak.

A pellikuláris töltetek koncepcióját elsőként Horváth Csaba vezette be a 60'-as évek végén [56, 57]. Ezek a töltetek 50 μm átmérőjű szemcsékből álltak, amelyek felületére ioncserélő gyantát vittek fel, megalkotva ezzel az első héjszerkezetű állófázist. Kirkland munkásságának köszönhetően a tömörmagvú töltetek fejlesztése és a szemcseméret csökkentése a folyadékkromatográfia egyik fő irányvonala lett [58, 59]. A szemcseméret csökkenése drasztikus növekedést eredményezett az oszlop hatékonyság és a nyomás tekintetében. A Kirkland és munkatársai által fejlesztett töltetet sikeresen

alkalmazták peptidek és proteinek gyors elválasztására [60]. Manapság a héjszerkezetű állófázisok különböző szemcseméretű ($5\text{ }\mu\text{m}$, $2,7\text{ }\mu\text{m}$, $2,6\text{ }\mu\text{m}$, $1,7\text{ }\mu\text{m}$, $1,3\text{ }\mu\text{m}$, stb.) változatai a kereskedelemben hozzáférhetők. A legújabb héjszerkezetű szemcséket egy ír vállalat (Glantreo Ltd.) gyártja EiroshellTM márkanév alatt, amelyeknek három különböző szerkezete van kereskedelmi forgalomban: $1,7\text{ }\mu\text{m}$ átmérőjű szemcse ($1,0\text{ }\mu\text{m}$ tömör mag, $0,35\text{ }\mu\text{m}$ héjvastagság) (a), $1,2\text{ }\mu\text{m}$ tömör mag, $0,25\text{ }\mu\text{m}$ héjvastagság (b), és $1,4\text{ }\mu\text{m}$ tömör mag, $0,15\text{ }\mu\text{m}$ héjvastagság (c) [61].



1.7. ábra A Halo $2,7\text{ }\mu\text{m}$ -es szemcsék morfológiája és pórus szerkezete. A SEM (pászta-zó elektronmikroszkóp) felvételek (A és B) a héjszerkezetű szemcséket és felszínük pórusos szerkezetét mutatják. A (C) ábrán látható TEM (transzmissziós elektronmikroszkóp) felvételen a tömör mag és a porózus héj szerkezet látható, míg a (D) ábra nagyfelbontású TEM felvétele a héj pórus szerkezetét szemlélteti [54].

A héjszerkezetű töltetek számos előnnyel rendelkeznek. A tömörmagvú szemcsék méreteloszlása jóval keskenyebb a monolit szemcsékéhez képest, ezáltal a szemcsék közötti tér az oszlopban csökken, ami a hatékonyság növekedését eredményezi az örvénydiffúziós paraméter értékének csökkenése által (a van Deemter egyenlet *A* tagja). A keskeny szemcseméret eloszlás miatt a töltetanyag homogénebb lesz [62, 63]. A héjszerkezetű töltetek másik előnye a kisebb holtterfogat. A porózus szemcsék az oszlop térfogatának egyharmadát foglalják el, míg a tömörmagvú szemcsék térkitöltése 20 %-al nagyobb [62, 64, 65]. Ez a kisebb hozzáférhető térfogat az elválasztandó komponensek számára a van Deemter egyenlet *B* tagjának (molekuláris diffúzió) HETP-hez való hozzájárulását csökkenti. A van Deemter egyenlet *C* tagja az anyagátadási gátlás hozzájárulását írja le. A szemcsén belüli diffúzitás a belső mag átmérő és a teljes szemcse átmérő arányának függvényében írható le. Ahogy ez az arány növekszik, úgy

válík egyre gyorsabbá az anyagátadási kinetika az aktív héjban. Ez az előnyös tulajdonság nagy lineáris áramlási sebességeknél jelentkezik elsősorban nagyméretű molekulák esetén [66, 67, 68].

Nagyméretű molekulák, mint például proteinek elválasztása szempontjából döntő fontosságú az állófázis szemcsék szerkezeti felépítése [69]. Ennek tanulmányozása céljából a Phenomenex (Torrance, CA, USA) gyártott egy prototípus Kinetex-C₁₈ oszlopot, amely 2,7 μm átmérőjű két porózus réteggel bevont tömörmagvú szemcséket tartalmazott, melynek paraméterei a következők: a tömör mag átmérője 1,9 μm , a belső héj vastagsága 0,35 μm , 100 Å átlagos pórusmérettel, a külső héj vastagsága pedig 0,05 μm , 300 Å átlagos pórusmérettel. A mérések alapján a proteinek anyagátadási kinetikája akkor a leggyorsabb, ha a külső héj nagyméretű mezopórusokkal (200-300 Å) és nagy porozitással ($\approx 0,5-0,7$) rendelkezik, ezáltal gyorsítva a molekulák bejutását a belső rétegbe. A tömör mag jelentősége a diffúziós úthossz lecsökkentésében nyilvánul meg és mérete befolyásolja az oszlop terhelhetőségét.

1.3.3. A folyadékkromatográfiás töltetek kémiaja

A klasszikus HPLC töltetek szilikagél alapúak [44, 45]. Ezek az állófázisok mechanikailag nagyon ellenállóak, könnyedén leküzdik a HPLC-ben használatos nagy nyomást számottevő töredezés vagy összenyomódás nélkül. Szintén ellenállóak különböző oldószerekkel szemben. A szilikagél ezen kedvező tulajdonságai nagyban hozzájárultak a HPLC kifejlesztéséhez. A másik fontos tényező a felületmódosító technikák alkalmazhatósága, amelyek segítségével jelentősen különböző adszorpciós tulajdonságokkal rendelkező, kémiaiilag stabil felületek állíthatók elő. Az ezeken a felületeken kölcsönható rétegek vastagsága a monomolekuláris tartományba esik, ez a mintamolekulák adszorpciós rétegben való mozgásához gyors anyagátadást nyújt, ami keskeny csúcsokat eredményez. A szilikagél legnagyobb hátránya, hogy lúgos pH-n feloldódik. Ennek gyorsasága függ az állófázis természetétől, a pH-tól, a puffer típusától, a mozgófázisban lévő szerves komponens mennyiségétől és minőségétől, valamint a hőmérséklettől. A töltet hidrolitikus stabilitását nagyban befolyásolja még a kötött fázis típusa és felületi borítása. Annak ellenére, hogy a gyártók nem ajánlják a kötött fázisú oszlopok használatát 8-as pH fölött, ezek az oszlopok biztonságosan használhatók 9-es pH-n is szobahőmérsékleten, nagy százalékban szerves komponenst tartalmazó mozgófázist alkalmazva.

A polimer töltetek, mint például a vinil-monomereken alapulóak, szélesebb pH tartományban stabilak. A sztirol-divinil-benzol polimerek a teljes pH tartományban alkalmazhatóak. Ezt a fajta polimert először méretkizárásos kromatográfiában használták, és ugyanolyan szemcseméreteken gyártják, mint a szilikagél tölteteket. A polimer szemcsék felületmódosítása szintén lehetséges, azonban számos hátrányuk van a szervesetlen

töltetekkel szemben. A polimer töltetek mechanikailag kevésbé ellenállóak. Kis molekulák elválasztása esetén retenciós kromatográfiában jelentősen kisebb a hatékonyságuk, mint a szilikagél tölteteknek. Ez az állófázisba való anyagátadás gátoltságának következménye, ami a polimer töltetek legnagyobb hátránya. A polimer töltetek magukba szívják az oldószert, ezért megdagadnak vagy összezsugorodnak a mozgófázis minőségétől függően. A gyakorlatban ez a probléma kiküszöbölhető, a mozgófázis gondos megválasztásával és a térfogatáram szabályozásával. A polimer töltetek hátrányai – alacsony nyomástűrés és gátolt anyagátadás kis molekuláknál – korlátozzák azok alkalmazási területeit, ennek ellenére a polimer alapú töltetek dominálják az olyan területeket, mint a biopolimerek elválasztása, a méretkizárásos kromatográfia, ionkromatográfia és az ionkizárásos kromatográfia.

1.3.4. Különböző típusú állófázisok kombinálására alkalmazott technikák

Komplex minták esetében az egyoszlopos folyadékkromatográfia gyakran nem biztosít megfelelő felbontást és analízis időt [70]. Számos megközelítés létezik a különböző állófázisok kombinálására a kromatográfiás teljesítmény javítása érdekében. A legegyszerűbb megközelítés a parallel oszlopok alkalmazása: ilyenkor az analízis két futásban történik. A második futás célja felbontani az első futás átlapoló komponenseit. Gyakran meglehetősen kifinomult szoftverre van szükség ahhoz, hogy valódi komplementer szituációkat találjunk, amelyek megfelelő felbontást biztosítanak az összes komponensre [71, 72].

A vegyes módú oszlopok köztes szelektivitású állófázisai különböző elválasztási mechanizmusok, mint például fordított fázisú és méretkizárásos, vagy kation- és anioncserélő kombinálásával állíthatók elő. Vegyes módú oszlopok esetén megnyilvánul valamennyi alkotó állófázis tulajdonsága, melyek arányának változtatásával a szelektivitás hangolható [73, 74, 75]. A vegyes módú oszlop megközelítés azonban nehézségekbe ütközhet. Először is dedikált oszlopokra van szükség. Másodszor, a különböző típusú állófázisok kölcsönhatása egymással összetett, amely nem lineáris retenciós viselkedést eredményezhet [76].

A tandem oszlopok többdimenziós konfigurációja alternatívája lehet a vegyes módú oszlopoknak. Ebben a megközelítésben a minta elúciója két vagy több tandem (egymást követő) oszlopon történik, melyek mindegyike egy adott állófázissal rendelkezik. A második dimenzió elválasztása magában foglalhatja az első dimenzióban gyűjtött valamennyi frakciót [77, 78, 79], vagy csak kiválasztott frakciókat [80, 81, 82, 83]. A különböző retenciós mechanizmusok kombinált felhasználásának előnye mellett a két-dimenziós LC lehetőséget kínál a kísérleti körülmények (eluens összetétel, gradiens program, áramlási sebesség és hőmérséklet) független manipulálására az egyes oszlopokhoz. A fő hátrány a minta lehetséges számottevő hígulása és a hosszabb analízis

idő. Ezenkívül a kétdimenziós LC optimalizálása nem egyszerű számos egymástól függő tényező miatt [70].

Egy technikailag egyszerűbb kialakítás a tandem oszlopok soros elrendezésben. Ilyenkor két vagy több közvetlenül összekapcsolt oszlopon áramoltatjuk ugyanazt a mozgófázist (vagy gradienst). Egy adott, sorban összekapcsolt oszlopkombinációval egy kvázi-új oszlopot kapunk, amely bizonyos esetekben sokkal jobb teljesítményt nyújt, mint az egyes oszlopok külön-külön [72].

Az összekapcsolt oszlopok ötlete már a kromatográfia történetének hajnalán felmerült komplex minták analízisének [84, 85, 86, 87]. Oszlopkapcsolás esetén egyrészt növelhető a kinetikus teljesítmény az oszlop hosszának növelésével, másrészt a szelektivitás a különböző kémiai állófázisok kombinálásával beállítható [88]. Egyes közlemények [87, 89] kiemelték a hatóanyagok megnövekedett számát, melyek összekapcsolt oszlopokkal meghatározhatók. Az analitikai eljárások kidolgozása mellett kísérlet történt sorban összekapcsolt oszlopok preparatív kromatográfiás alkalmazására többkomponensű elegyek elválasztásánál [90]. A szerzők megnövekedett hozamról számoltak be két összekapcsolt oszlop esetén. Végül érdemes megjegyezni, hogy a királis és akirális komponensek elegyét tartalmazó minták analízise, királis és akirális állófázisok kapcsolásával egy másik aktív terület [91, 92, 93, 94, 95].

Egy tetszőleges lineáris közegben (időben változó és/vagy nem-uniform) történő elválasztás kinetikus elméletének alapjait Giddings [8, 96] és Blumberg [97, 98] írták le részletesen. Ezekben a munkákban részletes modell található az elméleti tányérmagasság kiszámítására nem-uniform közegben. Ezek az elméletek kiterjednek a kapcsolt oszlopokra és a gázkromatográfiára is, figyelembe véve a gázkompressziós hatásokat is.

A Fekete és munkatársai [88] által kidolgozott elmélet segítségével a csúcsszélesség becsülhető kapcsolt oszlopos rendszerekben, izokratikus és gradiens elúciós módban egyaránt. Ez alapján izokratikus módban a tányérszámok nem additívak, ha az oszlopok különböző tányérszámmal rendelkeznek, és a kinetikus teljesítménynek határértéke van, melynek értéke az egyes oszlopok hatékonyságától és hosszától függ. Gradiens elúciós módban az oszlopok sorrendje már nem indifferens. Ilyenkor a megfigyelt látszólagos hatékonyság jelentősen függ az oszlopok sorrendjétől. Összekapcsolt oszlopok esetén, ha a végső oszlop nagyobb hatékonysággal rendelkezik, a csúcsszélesség csökkenése várható. Ezért az oszlopokat a hatékonyság szerint növekvő sorrendben célszerű összekapcsolni.

Az oszlopokban hosszirányban csökkenő szemcseméret (kapcsolt rendszerekben) extra csúskompressziót okozhat a gradiens elúció okozta sávkompresszió mellett [88, 99]. Egy közelmúltbeli munkában Codesido és munkatársai [100] tanulmányozták a csökkenő méretű szemcsékkel töltött (szemcseméret-gradiens) oszlopok potenciálját. Arról számoltak be, hogy izokratikus elúció esetén a szemcseméret gradiens nem jelent

előnyt. Gradiens elúciós módban azonban meredek mozgófázis gradiens esetén a szemcseméret gradiens potenciális előnye fontossá válhat. A legjobb esetben a hatékonyság körülbelül 15-20 % -os várható növekedéséről számoltak be egy adott retenciós időnél, szemcseméret gradienst alkalmazva, összehasonlítva a konstans szemcseméretű oszlop-pal.

1.3.5. Ioncsere-kapacitás gradiens megvalósításának módjai

Ionos vegyületek elválasztását ciklikus poliéter-módosított keresztkötött polimereken elsőként Blasius és munkatársai írták le [101] a '70-es évek közepén. Az ilyen fázisok képesek komplexet képezni szervesen sókkal [102, 103]. Mivel az oszlop ioncsere kapacitását az eluens kationja határozza meg, így lehetőség nyílik kapacitás gradiens létrehozására, a kation típusának megváltoztatásával a kromatográfiás analízis közben. Ez az eluens kromatográfiás futás közbeni cseréjével (például kálium-hidroxidot lítium-hidroxidra) valósítható meg, ami a csökkenő kapacitás miatt jelentős analízis idő csökkenést eredményez [104, 105]. Ez a fajta gradiens hatékonynak bizonyult számos anion elválasztásakor koronaéter fázisokon [106, 107, 108]. A koronaéterek szintén alkalmasak kation elválasztások szelektivitásának beállítására kromatográfiás és elektroforetikus technikáknál egyaránt [109, 110, 111].

Egy másik lehetőség kapacitás gradiens előállítására, a kriptand fázisok alkalmazása [112, 113]. A különböző típusú kriptandok kovalensen köthetők szilárd hordozókhoz és képesek fém kationok megkötésére háromdimenziós kavitásuknak köszönhetően [114]. Hasonlóan a koronaéter fázisokhoz, a kapacitás gradiens a hidroxid eluens kation komponensének kromatográfiás futás közbeni megváltoztatásával történik [115, 116]. A kriptand oszlopok kapacitás gradiensének fő előnye, hogy lehetőség nyílik polarizálható és nem-polarizálható anionok egy futásban történő szimultán elválasztására, ami különösen nehéz feladat latex-agglomerált anioncserélőkön és aminált ojtott polimereken egyaránt [104]. A kriptand fázisok további előnye, hogy kétfunkciós töltésként üzemeltethetők, kationok és anionok elválasztására is alkalmasak [117].

Yamamoto és munkatársai [118] a borát vegyületek és diolok anionos komplexképződésén alapuló kapacitás gradiens elúcióra alkalmas oszlop jellemzőit vizsgálták. Az ionos vegyületek gradiens elválasztása az oszlop ioncsere kapacitásának elválasztás közbeni csökkentésével valósult meg. Az anionos komplexképződés az eluens borát reagense és a gyanta felszínén található diol típusú hidroxilcsoportok között történik. Ilyen oszlopot alkalmazva lehetőség nyílik különböző töltésű anionok szimultán meghatározására bináris gradienssel, nátrium-borát és mannitol eluenst használva. A technika rossz reprodukálhatóságát az ioncsere kapacitás beállításának nehézsége okozza.

Szabályozható szelektivitású állófázisok előállítása lehetséges még komonomerek különböző arányainak manipulációjával hidrofil interakciós/ioncserés vegyes üzemmó-

dú kromatográfiában [119]. A szabályozható szelektivitású vegyes fázisú kromatográfiás állófázisok fejlesztése előnyös komplex minták elemzése szempontjából. Az állófázis töltése és polaritása, valamint az elválasztás szelektivitása kényelmesen manipulálható a nátrium-4-sztirolszulfonát és dimetilaminoetil-metakrilát monomerek arányának változtatásával. A fejlesztett oszlopot számos különféle vegyület elválasztásánál sikerrel alkalmazták.

Az eddig felsorolt példák mindegyike dinamikus kapacitás gradiensként tekinthető. Számos új tanulmány foglalkozik a statikus állófázis gradiensekben rejlő potenciállal. Több példa létezik gradiens funkcionalitásokkal rendelkező állófázisok előállítására, beleértve a fotoinicializált technikákat monolit kapilláris oszlopoknál [120] vagy a destruktív és direkt kötő módszereket [121, 122] szilikagél oszlopok esetén. Ezek a gradiens fázisok mozgófázis gradienssel kombinálva megnövekedett felbontóképességet mutatnak, hasonlóan a szemcseméret gradiens esetében tapasztaltakhoz [100, 123]. Egy nemrégiben készült, longitudinális állófázis gradienssel rendelkező ioncserélő oszlopokkal végzett kísérletekről tudósító cikk [124] szintén jelentős kromatográfiás hatékonyság növekedésről számolt be.

2. Kísérleti rész

2.1. Numerikus számításokhoz használt szoftverek

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

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

A kétrétegű szemcsék elválasztási hatékonyságát egy tipikus nagyméretű peptid (pl. inzulin: molekulatömeg, M , ~ 6 kDa, molekuláris diffúziós koefficiens, D_m , $\sim 6 \times 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{min}}$) esetére vizsgáltam a [(3.6)–(3.19)] egyenletekből Mathematica 10.0 (Wolfram Research Inc.) szoftver segítségével levezetett [(3.20)–(3.31)] egyenletekkel. A numerikus számításokhoz szükséges paraméterek értékeit, mint az oszlop paraméterei, a szemcseméret, stb., a 2.1. táblázat foglalja össze.

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

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

2.3. Szemcseméret gradienssel rendelkező folyadékkromatográfiás oszlopok hatékonyságának elméleti vizsgálata

A numerikus számításokhoz szükséges paraméterek értékeit, mint az oszlop paraméterei vagy a molekuláris paraméterek, a 2.2. táblázat foglalja össze. Fontos megjegyezni, hogy a retenciós érzékenységi paraméter, S (a komponens retenciójának eluens összetétel megváltozására való érzékenysége mértéke), értéke meglehetősen nagy. Ezt a

nagy értéket szándékosan választottam nagyméretű polimerek és fehérjék reprezentálása érdekében. Mivel az S hatással van a sáv szélesség általános alakulására, a komponens mérete kisebb hatással lehet a szemcseméret gradiensekkel rendelkező oszlopok hatékonyságára.

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

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

2.4. Adszorpciós izotermák folyadékkromatográfiás meghatározása modellesz mentes inverz módszerrel

2.4.1. Eszközök és anyagok

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

2.4.2. Számítások

A kidolgozott, izoterma egyenlet mentes módszerben az izoterma deriváltját az egyes izoterma pontokra illesztett spline (szakaszosan parametrikus polinomokkal leírt görbe) deriváltja helyettesíti. A illesztéshez köbös spline-t használtam, amely esetén az egymást követő pontok harmadfokú polinomokkal vannak összekötve. A mért és számolt sávprofilok eltérés négyzetösszegének minimalizálása az egyes izoterma pontok pozíciójának optimalizálásával történt Nelder-Mead szimplex módszerrel [125]. Az izoterma

pontok kezdeti értékének meghatározása a klasszikus inverz módszeren alapult, Langmuir izotermát feltételezve. Az izoterma pontok száma és eloszlása a mért sávprofil alakjától függ (Lásd 3.3.3).

2.5. Statikus longitudinális ioncsere gradiens kromatográfia elmélete

A numerikus számításokhoz szükséges paraméterek értékeit, mint az oszlop paraméterei vagy a mozgófázis paraméterek, a 2.3. táblázat foglalja össze.

2.3. táblázat Az ioncsere-kapacitás gradienssel rendelkező folyadékkromatográfiás oszlopok hatékonyságvizsgálata során alkalmazott numerikus paraméterek értékei

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

A számításokhoz használt modell ionokat és ioncsere szelektivitási koefficienseiket [126] a 2.4 táblázat foglalja össze.

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

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

3. Eredmények

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

A folyadékkromatográfia általános sebességi modelljét kibővítettem két különböző szerkezetű, illetve felületi kémiájú porózus réteggel rendelkező tömörmagvú állófázisok esetére. Az általános sebességi modell Laplace tartományban történő megoldása lehetővé teszi az elúciós sávok momentumainak kiszámítását, amelyek felhasználhatók a kétrétegű szemcsék hatékonyságának meghatározására.

3.1.1. A kétrétegű tömörmagvú szemcsék szerkezete

A kétrétegű tömörmagvú szemcsék három különböző részből állnak (lásd 3.1 ábra).

1. Egy tömör mag r_c sugárral.

$$r_c = \rho r_p \quad (3.1)$$

ahol r_p a szemcse sugara (3.1 ábra), és ρ az arányossági tényező a tömör mag sugara és a szemcse sugara között. Ez a réteg impermeábilis az analizálandó komponensek és az eluens számára is. Ha ρ értéke 0-val egyenlő, akkor a szemcse nem rendelkezik tömör maggal, ha pedig $\rho = 1$, akkor a teljes szemcse nem porózus, mint a Kovasil fázisok [127]. Ezért, a tömörmagvú szemcséknél $0 \leq \rho \leq 1$.

2. Egy belső porózus réteg δ_i vastagsággal.

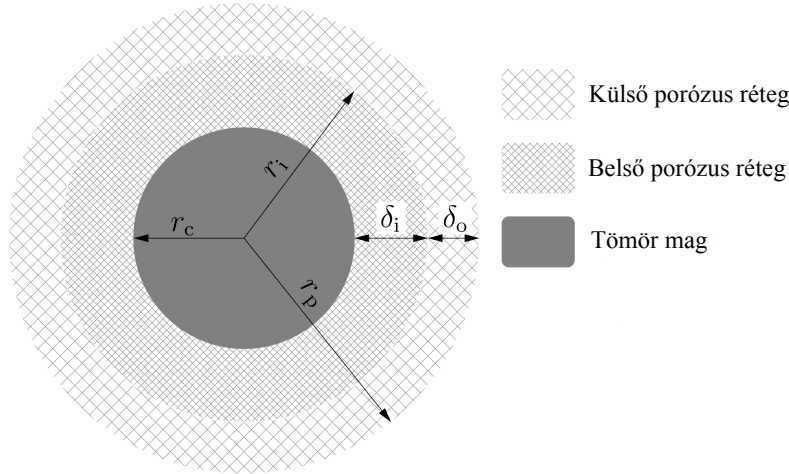
$$\delta_i = r_i - r_c = (\beta - \rho) r_p \quad (3.2)$$

ahol r_i a belső porózus réteg külső felszínének sugara (3.1. ábra), β pedig az arányossági tényező r_i és r_p között. Ez a réteg adott porozitással (ε_i) és felületi kémiával rendelkezik. Ha $\beta \rho$ -val vagy 1-el egyenlő, a szemcse csak egy porózus réteggel rendelkezik. Ha $\rho \leq \beta \leq 1$, a szemcsének két porózus rétege van.

3. Egy külső porózus réteg δ_o vastagsággal.

$$\delta_o = r_p - r_i = (1 - \beta)r_p \quad (3.3)$$

A gyártótól függően ennek a rétegnek lehet a belső porózus réteggel azonos vagy különböző porozitása (ε_o) és felületi kémiája.



3.1. ábra A kétrétegű tömörmagvú szemcse szerkezete.

A héjak porozitása (ε_p) a különböző rétegek vastagságától, illetve a tömör mag méretétől függ.

$$\varepsilon_p = \varepsilon_o(1 - \beta^3) + \varepsilon_i(\beta^3 - \rho^3) \quad (3.4)$$

A kétrétegű tömörmagvú szemcsékkel töltött oszlop teljes porozitása így számolható ki:

$$\varepsilon_T = \varepsilon_e + (1 - \varepsilon_e) [\varepsilon_o (1 - \beta^3) + \varepsilon_i (\beta^3 - \rho^3)] = \varepsilon_e + (1 - \varepsilon_e) \varepsilon_p \quad (3.5)$$

ahol ε_e az oszlop intersticiális porozitását jelöli, amely a szemcsék körüli, mozgófázissal kitöltött térfogatból adódik.

3.1.2. Az általános sebességi modell kiterjesztése kétrétegű tömörmagvú szemcsékre

A mintamolekulák oszlopon belüli vándorlása során fellépő számos sávszélesítő folyamat közül egyiket sem lehet sebességmeghatározóként említeni. A kromatográfia általános sebességi modellje az axiális diszperziót az axiális és örvénydiffúzió, a külső

film anyagátadási gátlás, a szemcsén belüli diffúzió (beleértve a pórus és felületi diffúziót), és az adszorpció-deszorpció sebességének összegeként veszi figyelembe. Mivel az általános sebességi modell külön tárgyalja a szemcsén belüli, illetve a szemcsén kívüli folyamatokat, két tömegmérleg egyenlet felírása szükséges a minta komponensre, egy a szemcsék között áramló (intersticiális) mozgófázisra, egy pedig a szemcséken belüli stagnáló mozgófázisra.

Az intersticiális folyadék fázisban lejátszódó folyamatokra a következő tömegmérleg egyenlet írható fel:

$$\frac{\partial c_e[z, t]}{\partial t} = -F \frac{\partial \bar{q}[z, t]}{\partial t} - u_e \frac{\partial c_e[z, t]}{\partial z} + D_L \frac{\partial^2 c_e[z, t]}{\partial z^2} \quad (3.6)$$

ahol c_e a minta komponens koncentrációja az intersticiális térfogatban, u_e az eluens intersticiális sebessége, D_L az axiális diszperziós koefficiens a külső mozgófázisra definiálva, ami a molekuláris és örvénydiffúziós koefficiensek összegét jelenti, F a fázisarány, ami $\frac{1 - \varepsilon_e}{\varepsilon_e}$ -ként definiálható, és $\bar{q}$ az állófázisbeli mintakoncentráció, q , átlagolva a teljes szemcsére. Gömb alakú szemcse esetén:

$$\bar{q} = \frac{3}{r_p^3} \int_{r_c}^{r_p} r^2 q \, dr \quad (3.7)$$

ahol r a radiális távolság.

A 3.6 egyenlet jobb oldalának első tagjában szereplő derivált az adszorpció sebességét jelenti a teljes szemcsére átlagolva. Számítása így történik:

$$\frac{\partial \bar{q}[z, t]}{\partial t} = \frac{3}{r_p} k_f (c_e[z, t] - c_o[r_p, t]) \quad (3.8)$$

ahol k_f a külső anyagátadási koefficiens és $c_o[r_p, t]$ a mintakoncentráció a pórusokban, a szemcse felszínén.

A kétrétegű tömörmagvú szemcsék pórusaiban lejátszódó folyamatokra két differenciálegyenlet felírása szükséges. Egy a külső, illetve egy a belső porózus rétegre.

$$A_o \frac{\partial c_o[r, t]}{\partial t} = D_o \left(\frac{\partial^2 c_o[r, t]}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_o[r, t]}{\partial r} \right) \quad (3.9)$$

$$A_i \frac{\partial c_i[r, t]}{\partial t} = D_i \left(\frac{\partial^2 c_i[r, t]}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_i[r, t]}{\partial r} \right) \quad (3.10)$$

ahol az alsó indexben szereplő i és o a belső, illetve a külső porózus rétegre vonatkozó paramétereket jelölik, c_i és c_o a mintamolekula koncentrációi a két réteg pórusaiban lévő stagnáló mozgófázisban, D_i és D_o a mintakomponens diffúziós koefficiensei a szemcse pórusaiban, és

$$A_o = \varepsilon_o + (1 - \varepsilon_o) K_o \quad (3.11)$$

$$A_i = \varepsilon_i + (1 - \varepsilon_i) K_i \quad (3.12)$$

ahol K_i és K_o a mintamolekula Henryoefficiensei a két rétegben.

A fenti egyenletek végtelenül gyors adszorpciós-deszorpciós kinetika esetére érvényesek ($q[r] = Kc[r]$). Fontos megjegyezni, hogy ebben az esetben a komponensek retenciójának jellemzése egyszerű egyensúlyi paraméterekkel történik, azonban a komponensek adszorpciójának kinetikája sokkal bonyolultabb is lehet, amelynek leírására ez az egyszerű megközelítés már nem alkalmas [128, 129]. A számítások során modell vegyületként használt peptidhez hasonló méretű molekula adszorpcióját több ezer különböző kinetikai folyamat befolyásolhatja [129].

A szemcse külső felszínére vonatkozó peremfeltétel így írható fel:

$$D_o \left. \frac{\partial c_o[r, t]}{\partial r} \right|_{r=r_p} = k_f (c_e[z, t] - c_o[r_p, t]) \quad (3.13)$$

A két porózus réteg közötti peremfeltétel, végtelenül gyors anyagátadást feltételezve:

$$c_i[r_i, t] = c_o[r_i, t] \quad (3.14)$$

és

$$D_i \left. \frac{\partial c_i[r, t]}{\partial r} \right|_{r=r_i} = D_o \left. \frac{\partial c_o[r, t]}{\partial r} \right|_{r=r_i} \quad (3.15)$$

A tömör magon keresztül nincs tömegáram, ezért a tömör mag felszínére vonatkozó peremfeltétel:

$$\left. \frac{\partial c_i[r, t]}{\partial r} \right|_{r=r_c} = 0 \quad (3.16)$$

Az egyszerűség kedvéért, egy Dirac delta injektálást adtam meg kezdeti feltételként.

$$c_e[0, t] = \delta(t) \quad (3.17)$$

3.1.3. A kromatográfiás oszlop elméleti tányérmagassága

A különböző kromatográfiás oszlopok teljesítményének összehasonlítása az elméleti tányérmagasságuk, HETP, alapján történik, ami az eluált csúcs statisztikai momentumaiból számítható.

$$\text{HETP} = \frac{\mu_2'}{\mu_1^2} L \quad (3.18)$$

ahol μ_1 első abszolút, és μ_2' a második centralizált momentuma a csúcsnak és L az oszlophossz.

Az előző szakaszban definiált parciális differenciálegyenlet rendszer [(3.6) – (3.17)]

egyenleteinek zárt formájú analitikus megoldása idő tartományban nem lehetséges. A megoldás Laplace tartományban levezethető, azonban nem transzformálható vissza idő tartományba. A csúcsok momentumai viszont könnyedén kiszámolhatók a megoldás Laplace transzformáltjából [6, 67, 130].

$$\mu_c = (-1)^n \frac{\partial^n \log \mathcal{C}(s, L)}{\partial s^n} \quad (3.19)$$

ahol $\mathcal{C}(s, L)$ az elúciós profil Laplace transzformáltjának felel meg az oszlop kimeneténél (L), s a Laplace változó és $n > 0$.

3.1.4. Az általános sebességi modell megoldása kétrétegű tömörmagvú szemcsékre

Az általános sebességi modell [(3.6) – (3.17)] egyenletek első momentuma, vagy más szavakkal a retenciós idő így adható meg:

$$\mu_1 = \frac{L}{u_e} (1 + k_1) \quad (3.20)$$

ahol

$$k_1 = k_o + k_i \quad (3.21)$$

és

$$k_o = F(1 - \beta^3)A_o \quad (3.22)$$

$$k_i = F(\beta^3 - \rho^3)A_i \quad (3.23)$$

A második momentum:

$$\mu_2 = \frac{2L}{u_e} (\delta_{ax} + \delta_f + \delta_d) \quad (3.24)$$

ahol δ_{ax} , δ_f , és δ_d az axiális diszperzió, a külső film anyagátadási gátlás, és a szemcsén belüli diffúzió hozzájárulása az eluált csúcs varianciájához.

$$\delta_{ax} = \frac{D_L}{u_e^2} (1 + k_1)^2 \quad (3.25)$$

$$\delta_f = \frac{r_p}{3k_f F} k_1^2 \quad (3.26)$$

$$\delta_d = \frac{r_p^2}{15F} \left[\frac{k_i^2}{D_i \beta} \frac{\beta^6 - 5\beta^3 \rho^3 + 9\beta \rho^5 - 5\rho^6}{(\beta^3 - \rho^3)^2} + \frac{1 - \beta}{D_o \beta} \right. \\ \left. \left(\frac{k_o^2 \beta (5\beta^3 + 6\beta^2 + 3\beta + 1) + 5k_i k_o \beta (2\beta^3 + 3\beta^2 + 3\beta + 1) + 5k_i^2 (\beta^2 + \beta + 1)}{(\beta^2 + \beta + 1)^2} \right) \right] \quad (3.27)$$

A (3.18) egyenletből következően a kétrétegű tömörmagvú szemcsékkel töltött oszlop HETP-je így adható meg:

$$\text{HETP} = \frac{2u}{(1+k_1)^2} (\delta_{ax} + \delta_f + \delta_d) = h_{ax} + h_f + h_d \quad (3.28)$$

ahol h_{ax} , h_f , and h_d az axiális diszperzió, a külső film anyagátadási gátlás, és a szemcsén belüli diffúzió HETP-hez való hozzájárulását jelölik.

A komponens látszólagos retenciós tényezője, k , a (3.20) egyenletből számolható, figyelembe véve, hogy az oszlop holtideje, t_M , megegyezik a visszatartást nem szenvedő komponens első statisztikai momentumával. Így,

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = F \frac{K_o(1 - \beta^3) + K_i(\beta^3 - \rho^3)}{1 + F \varepsilon_p} \quad (3.29)$$

A [(3.20) – (3.28)] egyenletek alapul szolgálhatnak momentumok, illetve különböző szerkezetű szemcsékkel töltött oszlopok HETP-jének kiszámolásához. Például, ha $\beta = 1$, vagy $\beta = \rho$ a szemcse egyrétegű tömörmagvú szemcséként viselkedik. k_1 és δ_d pedig

$$k_1 = F(1 - \rho^3)A_o \quad (3.30)$$

$$\delta_d = \frac{r_p^2}{15 D_o} \frac{k_1^2}{F} \frac{1 + 2\rho + 3\rho^2 - \rho^3 - 5\rho^4}{(\rho^2 + \rho + 1)^2} \quad (3.31)$$

amelyek megegyeznek a héjszerkezetű szemcsékre kapott korábbi eredményekkel.

3.1.5. Kétrétegű teljesen porózus szemcsék elválasztási hatékonysága

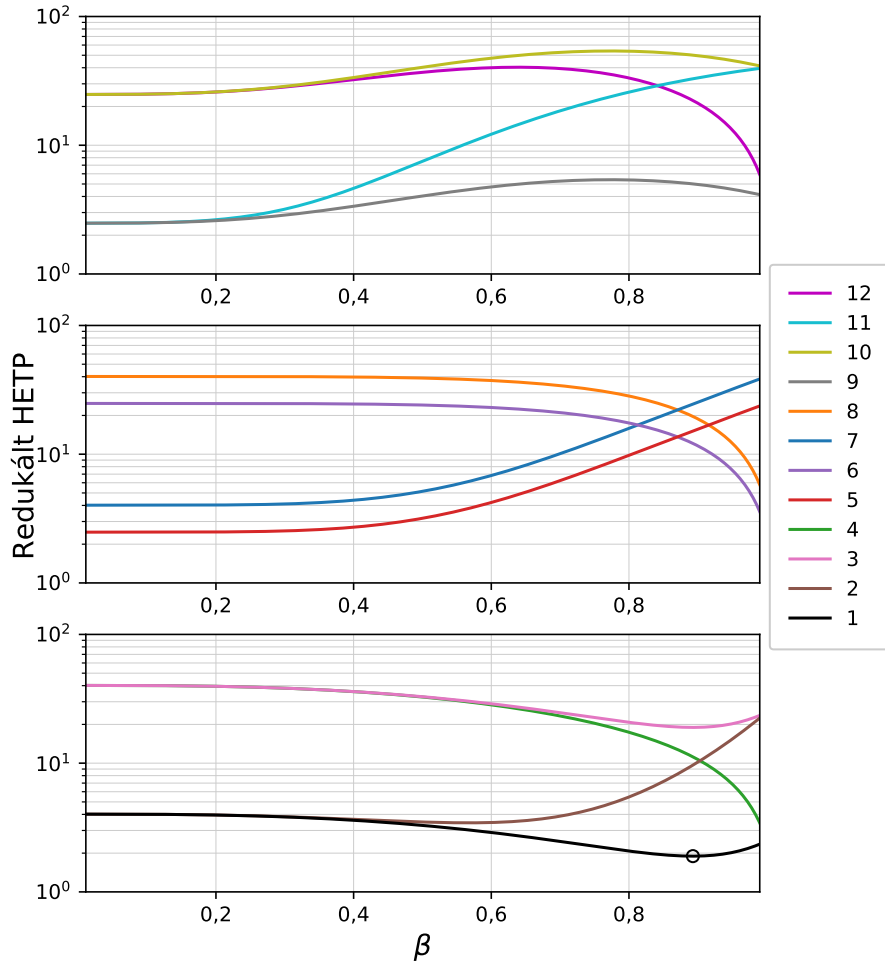
A teljesen porózus kétrétegű szemcsék hatékonyságának szemléltetéséhez a HETP-t a β együttható függvényében ábrázoltam. A számításokhoz modellként egy tipikus nagyméretű peptid (pl. inzulin) paramétereit használtam fel. A két porózus réteg felületi borítottságát és a molekula pórusbeli diffúziós állandóját tekintve 12 HETP görbe ábrázolható. Az ábrához használt paramétereket a 3.1. táblázatban foglaltam össze.

3.1. táblázat A kétrétegű porózus szemcsék elválasztási hatékonyságának számításához felhasznált retenciós (A_i és A_o , lásd (3.11) és (3.12) egyenletek) és pórus diffúziós paraméterek (D_i és D_o) a külső, illetve a belső rétegben.

No.	A_i	A_o	D_i $\frac{\text{cm}^2}{\text{min}}$	D_o $\frac{\text{cm}^2}{\text{min}}$
1	1,2	3	10^{-5}	10^{-5}
2	1,2	3	10^{-6}	10^{-5}
3	1,2	3	10^{-6}	10^{-6}
4	1,2	3	10^{-5}	10^{-6}
5	1,2	1,2	10^{-6}	10^{-5}
6	1,2	1,2	10^{-5}	10^{-6}
7	3	3	10^{-6}	10^{-5}
8	3	3	10^{-5}	10^{-6}
9	3	1,2	10^{-5}	10^{-5}
10	3	1,2	10^{-6}	10^{-6}
11	3	1,2	10^{-6}	10^{-5}
12	3	1,2	10^{-5}	10^{-6}

A belső és külső rétegben történő retenció az A_i és A_o értékeitől függ, amelyek a (3.11) és (3.12) egyenletekből számolhatók. Értékük a réteg porozitásától (ε) és felületi borítottságától (Henry koefficiens, K) függ. Az utóbbi az adott réteg felületén kötött C_{18} -as csoportok számával arányos. A számítások során használt A_i és A_o értékek, 1,2 és 3, megegyeznek 0,75 és 2,45 retenciós tényező értékekkel, hagyományos teljesen porózus szemcse esetén. A pórusdiffúziós paraméterek értékei D_o és D_i , a komponens molekuláris diffúziós együtthatója mellett elsősorban a szemcseátmérő és a névleges pórusátmérő arányától függenek. Ennek megfelelően, a 10^{-5} és $10^{-6} \frac{\text{cm}^2}{\text{min}}$ pórusdiffúziós együtthatók 300 és 100 Å pórusméreteknek felelnek meg egy tipikus nagyméretű peptid esetén.

A 3.2. ábra a teljesen porózus ($\rho = 0$) kétrétegű szemcsékre számított HETP görbét mutatja a belső porózus réteg külső felületének sugara, r_i , és a szemcse sugara, r_p , közötti arányossági tényező ($\beta = r_i/r_p$, lásd 3.1. ábra) függvényében. A belső és külső rétegek vastagsága a (3.2)–(3.3) egyenletek segítségével számítható, ekkor $\rho = 0$. Ahhoz, hogy kizárólag a kétrétegű szerkezet kromatográfiás hatékonyságra gyakorolt hatását érzékeltessem, az axiális és film anyagátadási folyamatok hozzájárulásait (δ_{ax} és δ_f) elhanyagoltam. Ennek megfelelően, csak δ_d -t vettem figyelembe a számítások során (lásd (3.25)–(3.28) egyenletek). Fontos megjegyezni azonban, hogy nagy peptidek esetében a pórus diffúzió jelenti az anyagátadási folyamatok legjelentősebb hozzájárulását a teljes HETP-hez [131]. A számított eredmények jól korrelálnak a hagyományos és nagy pórusátmérőjű („wide-pore”) héjszerkezetű fázisok esetén mért redukált HETP-kkel [132, 133]. A 3.2. ábra alapján a kétrétegű szerkezet jelentősen befolyásolja az állófázis hatékonyságát. Egyrétegű teljesen porózus fázis esetén a leg-



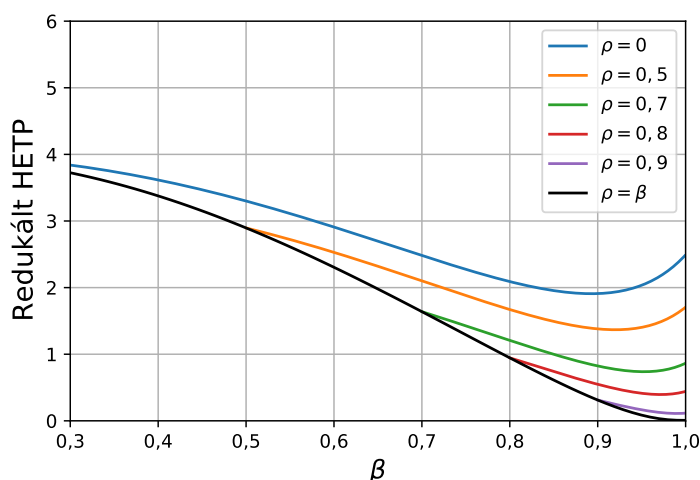
3.2. ábra A teljesen porózus kétrétegű szemcsék redukált HETP értékei a β függvényében, a 3.1. táblázatban bemutatott forgatókönyvek esetén. β az arányossági tényező a belső réteg külső felszínének sugara és a szemcse sugara között (lásd. 3.1. ábra, valamint (3.2) és (3.3) egyenletek).

jobb hatékonyság $A = 3$ és $D_p = 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{min}}$ -nél adódik, ahogy az várható. Ebben az esetben a redukált HETP $\sim 2,3$. A belső és külső rétegek felületi retenciójától és pórus diffúziójától függően a hatékonyság növekedhet vagy csökkenhet, ahogy a porózus rétegek aránya változik. Általánosságban megállapítható, hogy a hatékonyság nő, ahogy a nagyobb pórusméretű réteg aránya növekszik, ahogy az várható volt. A hatékonyság az 5., 7. és 11. forgatókönyv esetében monoton csökken, míg a 4., 6. és 8. forgatókönyv esetében monoton növekszik, a belső réteg arányának növekedésével. Az 1., 2., 3., 9., 10. és 12. forgatókönyvhöz tartozó HETP görbék lokális minimumokkal (1, 2, 3) vagy maximumokkal (9, 10, 12) rendelkeznek. Az előbbi esetek azt sugallják, hogy nagyobb hatékonyság elérése lehetséges két különböző porózus réteg kombinálásával, mint a két réteggel önmagukban. Az 1., 2. és 3. forgatókönyv közös pontjai: (1) a belső réteg kisebb felületi borítottsággal rendelkezik ($A_i = 1, 2$ vs. $A_o = 3$), és (2) a külső réteg pórusmérete és pórusdiffúziója egyenlő vagy nagyobb, mint a belső rétegé.

A legnagyobb hatékonyságot az 1. forgatókönyv esetén lehet elérni (fekete görbe, a minimum pont körrel jelölve), ahol mindkét réteg esetén gyorsabb a pórusdiffúzió, a belső réteg pedig kisebb retenciával rendelkezik, mint a külső.

3.1.6. Kétrétegű tömörmagvú szemcsék elválasztási hatékonysága

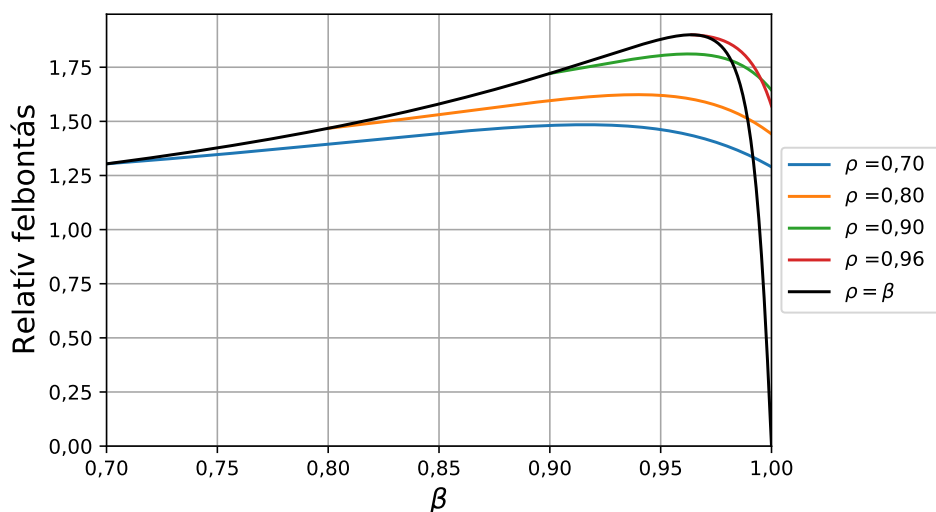
A 3.3. ábrán a kétrétegű tömörmagvú fázisok redukált HETP értékei láthatók a β függvényében, különböző méretű magok esetén. A fekete burkológörbe ($\beta = \rho$, lásd 3.1. ábra és (3.2) és (3.3) egyenletek) az egyrétegű tömörmagvú szemcsék HETP görbéjének felel meg. Az előző szakasz legjobb paraméterkombinációját (1. forgatókönyv) alkalmaztam a kétrétegű tömörmagvú fázisok elválasztási hatékonyságának tanulmányozására. A 3.3. ábra alapos vizsgálata rávilágít arra, hogy bármely adott magméretnél a hatékonyság tovább növelhető a kétrétegű szerkezet alkalmazásával. Ugyanakkor mindig található olyan egyrétegű mag-héj szerkezet, amellyel nagyobb hatékonyság érhető el, mint bármely kétrétegű tömörmagvú szemcse esetén. Megjegyzendő azonban, hogy a csökkenő héjvastagság az állófázis felületének csökkenését okozza, ami a retenció és végül a vegyületek közötti tényleges felbontás csökkenését eredményezi, abban az esetben, amikor a porózus réteg már túl vékony lesz.



3.3. ábra A redukált HETP a β függvényében ábrázolva különböző ρ értékek esetén.

A kromatográfiás gyakorlatban a felbontás fontosabb paraméter, mint a HETP. A fázis felbontóképességének vizsgálatához egy új komponens definiálása szükséges. Az új komponens A_o és A_i paramétereit úgy kaptam, hogy az eredeti komponens azonos paramétereit megszoroztam 1,2-vel. Más szavakkal, a két vegyület szelektivitása 1,2 volt. A 3.4. ábrán a számított felbontások láthatók a β függvényében, különböző ρ értékek esetén. Kijelenthető, hogy a 3.3. ábrán látható HETP görbék esetén levont konklúzióhoz hasonlóan, a kétrétegű tömörmagvú szemcsék alkalmazásával nő a felbontás, de egy bizonyos magméretig mindig található olyan egyrétegű mag-héj szemcseszerkezet

nagyobb magmérettel, amely jobb felbontást biztosít. A magméret további növelése azonban, egy bizonyos optimális érték fölött már csökkenti a kromatográfiás felbontást a retenció jelentős csökkenése miatt. Az optimális magméretnél a felbontás nem javítható tovább kétrétegű szerkezet alkalmazásával, mivel a kisebb retencivitású belső réteg csökkenti a két komponens retenciók időbeli különbségét. Ennek megfelelően a legjobb elválasztási teljesítmény az egyrétegű mag-héj szemcse magméretének optimalizálásával érhető el. Fontos azonban megjegyezni, hogy az optimális magátmérő jelentősen függ az elválasztandó komponensek típusától [68]. Gazdasági megfontolások alapján a túlzott mennyiségű specifikus állófázis tervezése és optimalizálása problémákat vet fel. A nagy makromolekulák analízisére optimalizált mag-héj fázisok magmérete általában a szemcseátmérő 90–95 % -a (a 3.4. ábra is ezt a magméretet javasolja). Az eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy a kétrétegű struktúra alkalmazásának nincs előnye az erre a célra alkalmazott fázis esetén. Kisebb magméretek esetén azonban a kétrétegű szerkezet előnye jelentősebb. A mag mérete a legszélesebb körben előállított általános célú mag-héj szemcséknél a szemcse átmérőjének $\sim 70\%$ -a ($\rho = 0,7$). Ahogy a 3.4. ábra sugallja, 15-20 %-os felbontásnövekedés érhető el jól megtervezett és optimalizált kétrétegű tömörmagvú fázisok használatával.



3.4. ábra Relatív felbontás a β függvényében, különböző ρ értékek esetén.

Amint a [68] közleményből is kiderül, az általános sebességi modell rendkívül eredményes eszköz nagyhatékonyságú állófázis szemcsék tervezésére és optimalizálására, mivel figyelembe veszi az összes folyamatot, amely az áramló intersticiális mozgófázisban és a szemcséken belüli stagnáló folyadékfázisban zajlik. Ebben a fejezetben az általános sebességi modellt használtam fel a kétrétegű tömörmagvú, illetve teljesen porózus állófázisok hatékonyságának vizsgálatára. Ezt, a modellt Laplace tartományban történő megoldása tette lehetővé. Az eredmények azt sugallják, hogy gondos terve-

zéssel és optimalizálással a kétrétegű struktúrák nagyobb elválasztási hatékonyságot nyújthatnak, mint az egyrétegű fázisok, ha a külső réteg nagyobb retencivitással és pórus diffúzióval rendelkezik, mint a belső réteg. Az eredmények azt is kimutatták, hogy a felbontás nem javítható tovább kétrétegű szerkezettel, ha a nem porózus mag mérete az adott elválasztásra van optimalizálva. Ha azonban a cél egy általános felhasználású állófázis fejlesztése, akkor kétrétegű szerkezet használatával az oszlophatékonyság 15–20 %-os növekedése érhető el.

A levezetett egyenletek egzotikusabb állófázisok tervezésére is használhatók, mint például az üreges szemcsék, amelyek lyukakat (eluens) tartalmaznak a szemcsék közepén, lehetővé téve a gyors diffúziót és a gyors anyagátadást. Habár ezeknek az egzotikus állófázisoknak a gyártása jelenleg technikailag nem megvalósítható, érdeklődésre tarthat számot az ilyen fázisok alkalmazhatóságának elméleti vizsgálata. Fontos azonban megjegyezni, hogy az ebben a munkában bemutatott megközelítés nem tudja megjósolni a szemcsék mechanikai stabilitását, sem az oszloptöltés során jelentkező fal effektust, amely jelentősen befolyásolja az oszlop alkalmazhatóságát és hatékonyságát. E korlátok ellenére az általános sebességi modell alkalmazása felgyorsíthatja az új állófázisok tervezését és optimalizálását.

3.2. Szemcseméret gradienssel rendelkező folyadékkromatográfiás oszlopok hatékonyságának elméleti vizsgálata

A folyadékkromatográfia modern analitikai alkalmazásai egyre hatékonyabb oszlopokat igényelnek. A szemcseméret gradiens felhasználásának lehetőségét a kromatográfiás oszlopban elméleti megközelítéssel vizsgáltam. Referenciapontként a konstans szemcseméretű oszlopot használtam, melynek nyomásesése a szemcseméret gradiens oszlopéval.

3.2.1. Nem-uniform oszlopok hatékonysága

Egy szemcseméret gradienssel rendelkező kromatográfiás oszlop esetére a differenciális tömegmérleg egyenlet a következőképpen írható fel:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\frac{u_0}{1+k} \frac{\partial c}{\partial z} + \frac{1}{1+k} \frac{\partial}{\partial z} \left(D \frac{\partial c}{\partial z} \right) \quad (3.32)$$

Mivel a szemcseátmérő az oszlop hossza mentén változik, D , a longitudinális diszperziós koefficiens függ a hosszirányú helykoordinátától, z . A gradiens szemcseméretű kromatográfiás oszlop hatékonysága meghatározható a retenció idő és csúcs variancia (3.32) egyenlet megoldásából történő kiszámításával.

Feltételezve, hogy a komponensek sávjai annyira keskenyek, hogy a szemcseméret a sávon belül közel konstansnak tekinthető, a sávok varianciája az oszlopon belül, σ_z^2 , meghatározható az alábbi közönséges differenciálegyenlet megoldásával is [134]:

$$\frac{d\sigma_z^2 \left(\frac{k_z+1}{k_z} \right)^2}{dz} = H_z \left(\frac{k_z+1}{k_z} \right)^2 \quad (3.33)$$

ahol H_z és k_z a lokális elméleti tányérmagasság, HETP, és a lokális retenció tényező. H_z kiszámolható a Knox egyenlet segítségével, a lokális szemcseméret, $d_p(z)$, ismeretében:

$$H_z = \left(A \nu_z^{1/3} + \frac{B}{\nu_z} + C \nu_z \right) d_p(z) \quad (3.34)$$

ahol ν_z a redukált lineáris mozgófázis sebesség:

$$\nu_z = \frac{u_0 d_p(z)}{D_m} \quad (3.35)$$

D_m a mintamolekulák diffúziós koefficiense. Ezt a megközelítést használva, ugyanazon u_0 optimális lehet egy adott szemcseátmérőre, de nem optimális bármely más szemcseméretekre.

A fizikai sáv szélesség, $4\sigma_z$, a komponens koncentráció profiljának kromatográfiás oszlopon belüli hosszirányú szélességét jelenti.

Fordított fázisú gradiens elúcióknál egy komponens lokális retenciós tényezője így adható meg:

$$k_z = \frac{k_{\varphi_0}}{1 + k_{\varphi_0} S \Delta\varphi / t_G(z/u_0)} \quad (3.36)$$

ahol k_{φ_0} a komponens retenciós tényezője az analízis kezdetén ($\varphi = \varphi_0$):

$$k_{\varphi_0} = k_0 \exp(-S \varphi) \quad (3.37)$$

φ az erősebb eluens térfogattörtje, S a komponens retenciójának eluens összetétel megváltozására való érzékenysége mértéke ($-S$ az $\ln k[\varphi]$ vs. φ egyenes meredeksége), $\Delta\varphi$ az erősebb eluens térfogattörtjének megváltozása t_G gradiens idő alatt és k_0 a komponens retenciós tényezője $\varphi = 0$ -ra.

3.2.2. Ekvivalens szemcseátmérő

Egy oszlop nyomásesése, amelynek szemcseátmérője hosszirányban változik, Darcy törvénye alapján számolható ki:

$$\frac{dP}{dz} = -\frac{\phi u_0 \eta}{d_p^2(z)} \quad (3.38)$$

ahol $d_p(z)$ a szemcseátmérő, ami z függvénye, η az eluens dinamikus viszkozitása, és ϕ az oszlop ellenállási tényezője, amely az 500–1000 közötti tartományba esik (ebben a tanulmányban 1000). Elhanyagolva a sűrűlási hő hatását u_0 -ra és η -ra, a (3.38) egyenlet a következőképpen oldható meg:

$$\Delta P = \phi u_0 \eta \int_0^L \frac{1}{d_p^2(z)} dz \quad (3.39)$$

ahol L az oszlop hossza. Ha a szemcseátmérő végig konstans az oszlopban, a (3.39) egyenlet a Kozeny-Carman egyenletté egyszerűsödik, ami egy a folyadékok dinamikájában használatos jól ismert összefüggés szilárd töltetű áramlásokon keresztül áramló folyadékok nyomásesésének kiszámítására, lamináris áramlások esetén [135, 136].

Az ekvivalens szemcseátmérő, $d_{p,e}$, definiálható, mint azoknak a szemcséknek az átmérője, amelyekkel a nem-gradiens, uniform oszlop van töltve, amelynek ugyanakkora a nyomásesése, ΔP , mint a szemcseméret gradiens oszlopé.

$$d_{p,e} = \left(\frac{1}{L} \int_0^L \frac{1}{d_p^2(z)} dz \right)^{-\frac{1}{2}} = \sqrt{\frac{\phi u_0 \eta L}{\Delta P}} \quad (3.40)$$

Az ekvivalens átmérőjű szemcsékkel töltött oszlop referenciaként szolgál, amelynek hatékonysága összehasonlítható a különböző szemcseméret gradiens oszlopok hatékonyságával.

3.2.3. Szemcseméret gradiensek

Munkám során a töltet szemcseméret-gradiensek három különböző esetét vizsgáltam. Mindegyik esetre a negatív és pozitív gradienst is vizsgáltam, és a kiszámolt hatékonyságát (fizikai sávszélesség az oszlop végén) ezen nem-uniform oszlopoknak összehasonlítottam az uniform oszlopéval (az az oszlop, amely az ekvivalens átmérőjű szemcsékkel van töltve, és amelynek nyomásesése megegyezik a nem-uniform oszlopéval). Ezek az esetek a következők voltak:

1. Lineáris gradiens

(a) pozitív gradiens

$$d_p(z) = \frac{d_{p,L} - d_{p,0}}{L} z + d_{p,0} \quad (3.41)$$

(b) negatív gradiens

$$d_p(z) = \frac{d_{p,0} - d_{p,L}}{L} z + d_{p,L} \quad (3.42)$$

2. Konvex gradiens

(a) pozitív gradiens

$$d_p(z) = d_{p,0} \left(\frac{d_{p,L}}{d_{p,0}} \right)^{\left(\frac{z}{L} \right)^i} \quad (3.43)$$

(b) negatív gradiens

$$d_p(z) = d_{p,L} \left(\frac{d_{p,0}}{d_{p,L}} \right)^{\left(\frac{L-z}{L} \right)^i} \quad (3.44)$$

3. Konkáv gradiens

(a) pozitív gradiens

$$d_p(z) = d_{p,L} + d_{p,0} \left[1 - \left(\frac{d_{p,L}}{d_{p,0}} \right)^{\left(\frac{L-z}{L} \right)^i} \right] \quad (3.45)$$

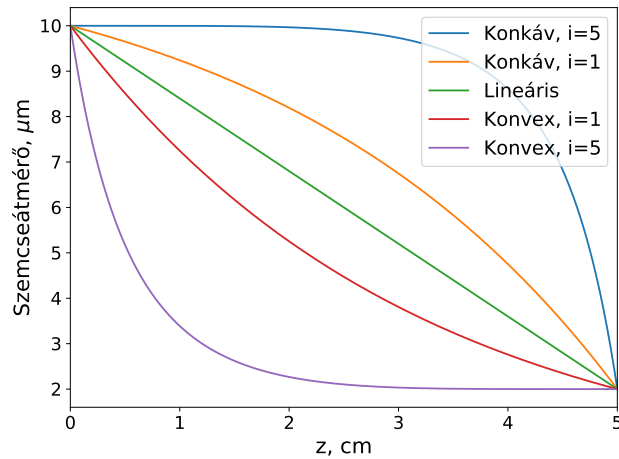
(b) negatív gradiens

$$d_p(z) = d_{p,0} + d_{p,L} \left[1 - \left(\frac{d_{p,0}}{d_{p,L}} \right)^{\left(\frac{z}{L} \right)^i} \right] \quad (3.46)$$

ahol i egy pozitív egész szám (ebben a munkában $i = 1$ vagy 5).

ahol $d_{p,0}$ és $d_{p,L}$ a szemcseátmérő az oszlop elején, illetve a végén.

A különböző szemcseméret gradiensek alakját a 3.5 ábra illusztrálja negatív gradiensek esetén.



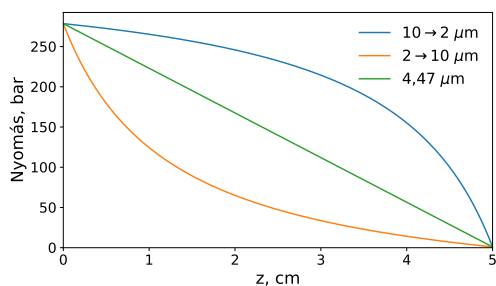
3.5. ábra A szemcseátmérő változása az oszlop hossza mentén negatív gradiensek esetén.

3.2.4. Az ekvivalens szemcseátmérő meghatározása

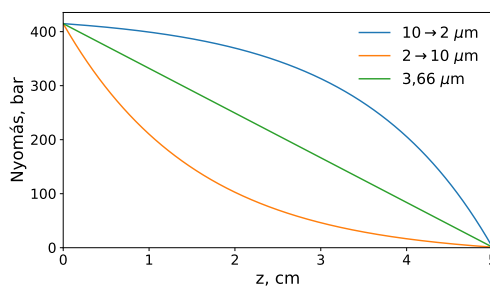
A különböző szemcseméret gradiens oszlopok uniform oszlopokkal való hatékonyságbeli összehasonlíthatóságához az oszlop nyomását használtam referencia paraméterként. A nem-uniform oszlopok nyomásesésének kiszámítása a különböző $d_p(z)$ forgatókönyvek ([(3.41)–(3.46)] egyenletek) (3.38) egyenletbe való behelyettesítésével történt. A nem-uniform oszlopok nyomásesésének ismeretében az ekvivalens szemcseátmérő meghatározható a kiszámolt ΔP értékek (3.40) egyenletbe való beillesztésével bármely forgatókönyv esetén. Egy adott szemcseméret gradiens forgatókönyvre meghatározott $d_{p,e}$ segítségével egy elméleti referencia oszlop nyerhető, amely alapján eldönthető, hogy a nem-uniform oszloppal jobb vagy rosszabb elválasztás érhető el ehhez a referencia oszlophoz képest.

A 3.6. ábra a nem-uniform és a referencia oszlop nyomásprofilját mutatja lineáris és konvex szemcseméret gradiens esetén. Látható, hogy a pozitív gradienshez tartozó nyomásesés görbe konkáv függvény, míg a negatív gradienshez konvex nyomásprofil tartozik. Ez a két függvény egymással pontszimmetrikus és a szimmetria középpontjának az oszlop közepe tekinthető. Nyilvánvalóan a nyomásváltozás az oszlopnak azon részén jelentősebb, ahol a kisebb szemcsék találhatók. Ezért, negatív szemcseméret gradiens esetén a nyomás intenzívebben változik az oszlop vége felé, míg pozitív szemcseméret gradiens esetén a nyomásváltozás az oszlop elején jelentősebb.

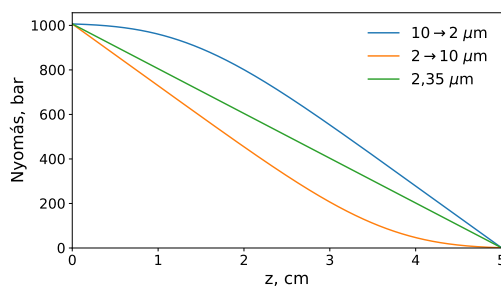
A kiszámolt ΔP és $d_{p,e}$ értékeket a 3.2. táblázat foglalja össze. A táblázatban az ekvivalens szemcseátmérők két tizedes pontossággal vannak megadva. A szemcsék ilyen pontossággal való gyártása nyilvánvalóan nem lehetséges, azonban ez a pontosság szükséges a nyomásesés szemcsemérettel való változásának érzékenysége miatt. A 3.2 táblázatban bemutatott adatok alapján a konvex forgatókönyvek nyomásesése nagyobb,



(a) Lineáris



(b) Exponenciális



(c) Kvintelt exponenciális

3.6. ábra A nem-uniform oszlop nyomásesés görbéi pozitív (kék) és negatív (narancs) szemcseméret gradiens esetén, valamint a referencia oszlop nyomásesés görbéi (zöld) különböző szemcseméret gradiens profilok esetén.

mint lineáris vagy konkáv szemcseméret gradiens esetén. A szemcseátmérő minden esetben 2,0 és 10,0 μm között változott.

3.2. táblázat A különböző forgatókönyvekhez tartozó nyomásesés és ekvivalens szemcseátmérő értékek

Forgatókönyv	ΔP (bar)	$d_{p,e}$ (μm)
Lineáris	277,5	4,47
Konvex	413,8	3,66
Konvex kvintelt ¹	1005,5	2,35
Konkáv	192,0	5,38
Konkáv kvintelt	88,6	7,91

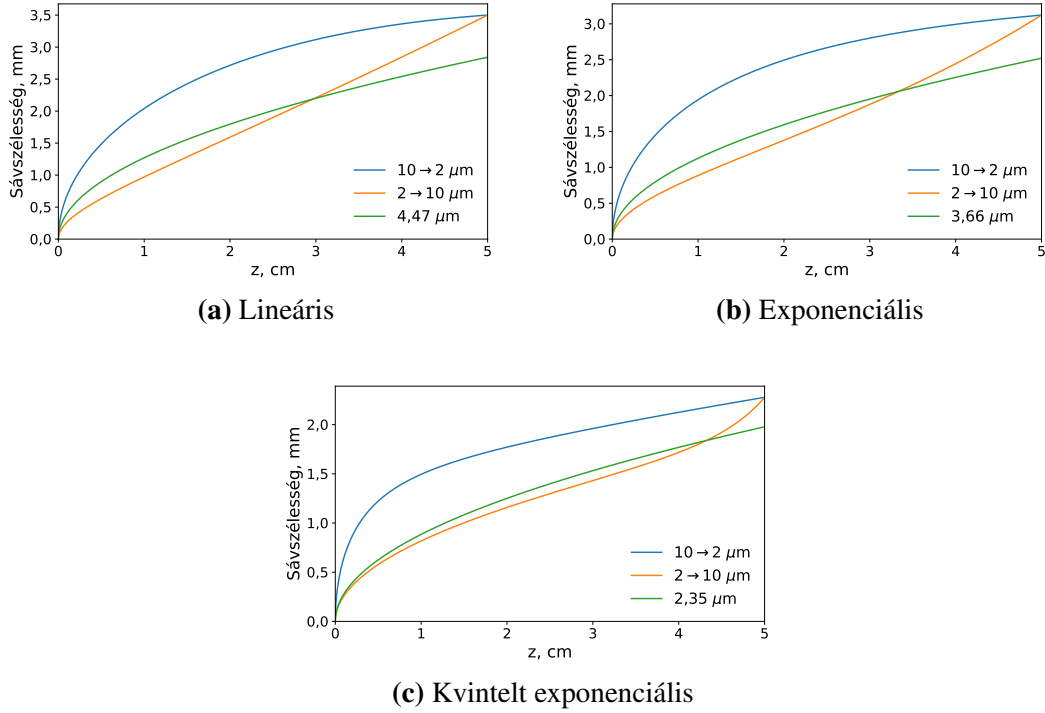
¹kvintelt jelentése: „az ötödik hatványra emelt”

3.2.5. Izokratikus elúció

Az ekvivalens szemcseátmérő alapján a nem-uniform oszlop hatékonysága összehasonlítható az uniform referencia oszlop hatékonyságával izokratikus és gradiens elúció esetén is. Ha a fizikai sávszélesség a nem-uniform oszlop végén kisebb, mint az uniform oszlop végére számolt sávszélesség, akkor a nem-uniform oszlop jobb elválasztást kínál. A fizikai sávszélesség kiszámítása a (3.33) egyenlet segítségével történt. Mivel izokratikus elúció esetén a retenciós tényező, k , nem változik a helykoordináta, z , sze-

rint, ezért a (3.33) egyenlet egyszerűsíthető:

$$\frac{d\sigma_z^2}{dz} = H_z \quad (3.47)$$



3.7. ábra A fizikai sávszélesség változása a nem-uniform oszlopban, pozitív (kék) és negatív (narancs) szemcseméret gradiens esetén, valamint a referencia oszlopban (zöld), lineáris (a), exponenciális (b) és kvintelt-exponenciális (c) szemcseméret-gradiens esetén.

A 3.7 ábra a komponens sávszélességének ($4\sigma_z$) oszlopbeli alakulását illusztrálja nem-uniform, valamint a hozzájuk tartozó referencia oszlopokra, izokratikus elúció esetén. A negatív szemcseméret gradiens oszlopok és az uniform oszlopok sávszélesség görbéi konkáv függvények. A pozitív szemcseméret gradiens oszlopokhoz tartozó sávszélesség görbéknek inflexió pontja van. Ez konvex kvintelt ($i=5$) forgatókönyv esetén a legszembetűnőbb. Pozitív szemcseméret gradiens esetén a komponens sávja az oszlopban való vándorlása során mindvégig szélesebb, mint uniform oszlop esetén. Negatív szemcseméret gradiens esetén azonban, a sávszélesség keskenyebb az uniform oszlophoz viszonyítva, mivel az oszlop kezdeti szakaszán kisebbek a szemcsék az uniform oszlopban lévőkénél. Ahogy a szemcseméret növekszik, a komponens sávja gyors szélesedést mutat. A sávszélesség az oszlop végén ugyanakkora pozitív és negatív szemcseméret gradiensre egyaránt. Ezek alapján izokratikus elúció esetén, a nem-uniform oszlopok hatékonyságuk szempontjából azonosak. A szemcseméret gradiens iránya tehát nem befolyásolja a végső elválasztási teljesítményt.

3.3. táblázat A különböző forgatókönyvekre számolt sáv szélesség értékek (mm) az oszlop végén izokratikus esetben

Forgatókönyv	Fizikai sáv szélesség (mm)		
	pozitív gradiens	negatív gradiens	uniform oszlop
Lineáris	3,50	3,50	2,84
Konvex	3,12	3,12	2,52
Konvex kvintelt	2,78	2,78	1,98
Konkáv	3,86	3,86	3,19
Konkáv kvintelt	4,56	4,56	2,50

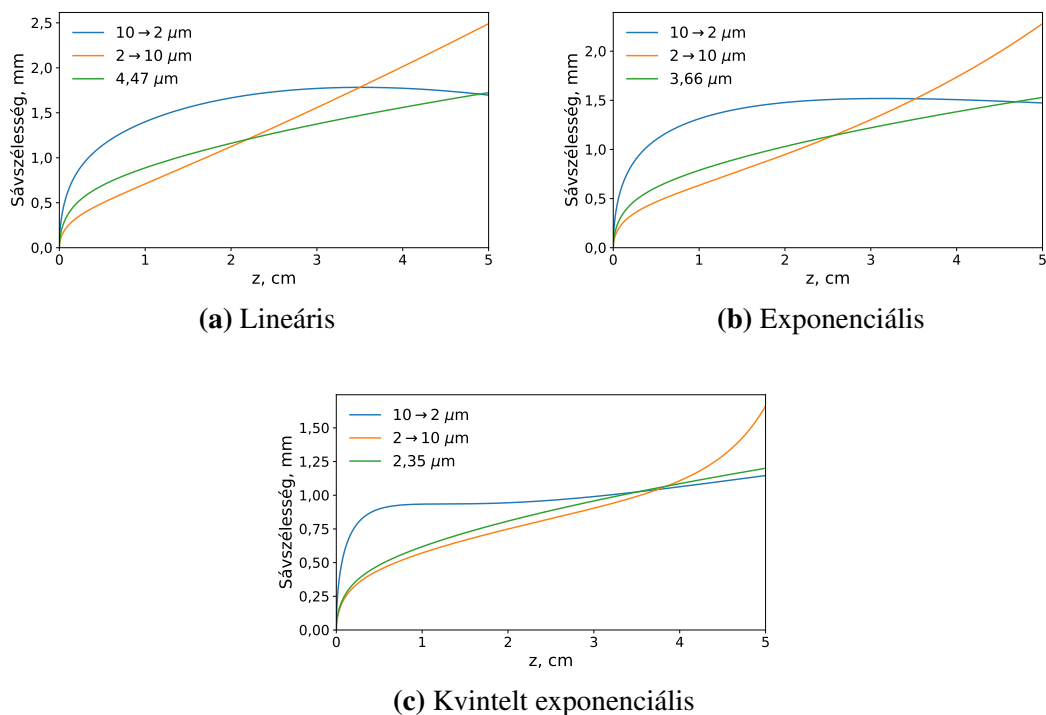
A különböző forgatókönyvekre kiszámított fizikai sáv szélesség értékeket a 3.3 táblázat foglalja össze. A 3.7 ábra és a 3.3 táblázat fő tanulsága, hogy izokratikus elúció esetén az uniform oszlop mindig nagyobb hatékonyságot nyújt a nem-uniform oszlophoz képest. Ugyanezen következtetés vonható le sorba kötött oszlopok izokratikus módban való tanulmányozásakor is [99].

3.2.6. Gradiens elúció

Az előző szakaszban bemutatott ábrák előállításához gradiens elúció esetére, a sáv szélesség függvények számításokhoz a (3.33) egyenlet teljes alakja szükséges, mivel ilyen körülmények között a retenciós tényező a hosszirányú helykoordináta, z függvényében változik. A 3.8. ábrán bemutatott diagramok nagyon hasonlóak az izokratikus esetben látottakhoz (3.7. ábra), de van néhány fontos különbség. A pozitív és negatív szemcseméret gradiens oszlopok nem tekinthetők azonosnak hatékonyságuk szempontjából. A negatív szemcseméret gradiens jelentősen jobb elválasztást ad a pozitív szemcseméret gradienshez képest. Az utóbbi esetben egyik forgatókönyv sem kínál jobb hatékonyságot az uniform oszloppal összehasonlítva. Negatív szemcseméret gradiens esetében azonban sávkeskenyedés figyelhető meg. Lineáris és konvex forgatókönyvre az oszlop utolsó szakaszán még a sáv szélesség keskenyedése is látható. Konvex kvintelt forgatókönyvnél a sáv szélesség az oszlop hosszának 80%-áig konstans. A sávkeskenyedés eredményeként, negatív szemcseméret gradiens oszlopra számolt végső fizikai sáv szélesség kisebb lehet, mint az uniform oszlopé. Lineáris szemcseméret gradiens esetén a nem-uniform oszlop előnye $\sim 1\%$, konvex és konvex kvintelt forgatókönyvnél a sáv szélesség $\sim 4\%$ -kal keskenyebb, mint uniform oszlop esetén. Ez alapján a szemcseátmérő csökkenésének meredeksége az oszlop vége felé döntő tényező a fizikai sáv szélesség alakulása szempontjából. A konkáv gradiens nem kínál az uniform oszlopnál jobb elválasztást.

A nem-uniform oszlopok közül a negatív szemcseméret gradiens 2. forgatókönyve adja a legnagyobb hatékonyságot, viszont nyomásesése is a legnagyobb (legkisebb $d_{p,e}$).

A számított fizikai sáv szélesség értékeket a 3.4 táblázat foglalja össze.



3.8. ábra A fizikai sávszélesség változása a nem-uniform oszlopban, pozitív (kék) és negatív (narancs) szemcseméret gradiens esetén, valamint a referencia oszlopban (zöld), lineáris (a), exponenciális (b) és kvintelt-exponenciális (c) szemcseméret gradiens esetén.

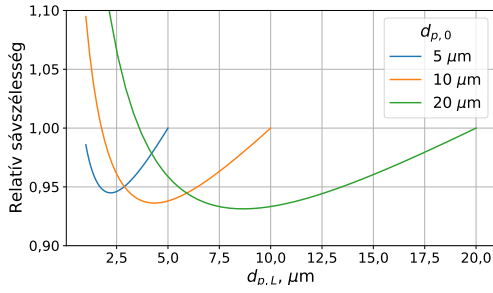
3.4. táblázat A különböző forgatókönyvekre számolt sávszélesség értékek (mm) az oszlop végén izokratikus esetben

Forgatókönyv	Fizikai sávszélesség (mm)		
	pozitív gradiens	negatív gradiens	uniform oszlop
Lineáris	2,49	1,70	1,72
Konvex	2,28	1,47	1,53
Konvex kvintelt	1,66	1,15	1,20
Konkáv	2,67	1,94	1,93
Konkáv kvintelt	2,91	2,55	2,50

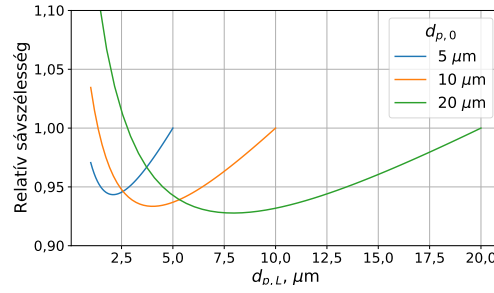
Megjegyzendő, hogy mivel a hatékonyság növekedését a komponens sávjainak fizikai szélessége jellemzi az oszlop végén, ez a hatékonyságnövekedés közvetlenül átalakítható felbontás vagy csúcskapacitás javulássá.

3.2.7. Határoló szemcseméret optimalizálása

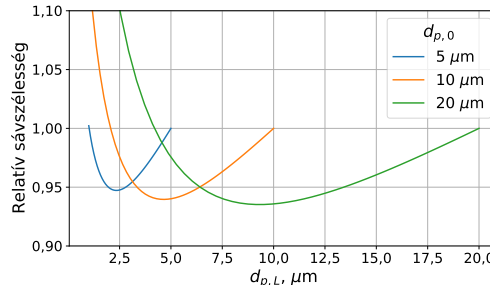
Az előző szakasz fontos következtetése, hogy a szemcseméret gradiens alakjának és típusának gondos megválasztásával a nem-uniform oszlop negatív szemcseméret gradienssel történő alkalmazása kismértékű javulást jelenthet a hatékonyabb elválasztás elérésének szempontjából. Az oszlop hatékonysága tovább növelhető a határoló szem-



(a) Lineáris



(b) Exponenciális



(c) Konkáv

3.9. ábra Az uniform és nem-uniform oszlopra számolt sávszélességek aránya az oszlop végén lévő szemcseátmérő függvényében, lineáris (a), exponenciális (b) és konkáv (c) szemcseméret-gradiens esetén.

cseméreték optimalizálásával (szemcseátmérő az oszlop elején, $d_{p,0}$, szemcseátmérő az oszlop végén $d_{p,L}$). A 3.9 ábrán a minta komponens fizikai sávszélessége a nem-uniform oszlop végén az uniform esethez viszonyítva látható, mint a végső szemcseátmérő, $d_{p,L}$, függvénye, három különböző kezdeti szemcseméret ($d_{p,0} = 5, 10, 20 \mu\text{m}$) esetén. Amikor az arány egynél kisebb, a nem-uniform oszlop jobb hatékonyságú az uniform oszlopnál. A 3.9 ábra alapján a legkisebb (végső) szemcseátmérőnek jelentős hatása van a teljes elválasztási hatékonyságra. A görbék optimuma akkor érhető el, amikor a végső szemcseméret körülbelül a kezdeti szemcseátmérő 40% -a. Lineáris és konvex forgatókönyvre (3.9a és 3.9b ábrák) a hatékonyság nyereség közel 6–8% sávszélesség csökkenésben kifejezve. Figyelemre méltó, hogy még konkáv forgatókönyv esetén (3.9c ábra) is, az oszlop hatékonysága 5%-kal javítható az előző szakasz eredményei ellenére. A 3.9 ábra hangsúlyozza az új állófázis struktúrák *in-silico* optimalizálásának fontosságát.

A szemcseméret gradiens HPLC oszlopban való alkalmazhatóságát elméleti megközelítésben vizsgáltam. Az eredmények alapján izokratikus elúciós módban az uniform oszlop mindig jobb hatékonysággal rendelkezik, függetlenül a szemcseméret gradiens paramétereitől. Ami a gradiens elúciós módot illeti, bizonyos esetekben extra sávkompresszió érhető el. Lineárisan csökkenő szemcseméret gradiens esetén ez az előny $\sim 1\%$,

konvex és konvex kvintelt negatív szemcseméret gradiens esetén $\sim 4\%$. Az oszlop két vége között a szemcsék méretének csökkenését optimalizálva az előny 5–8 % -ra növelhető, ami még mindig nem eredményez jelentős különbséget a csúcsalakban. Korábbi közleményben [100] ugyan jelentősebb nyereségről számoltak be, de fontos megjegyezni, hogy ebben a munkában a referencia oszlopot úgy választottam, hogy a látszólagos permeabilitása a nem-uniform oszlopéval megegyező legyen.

A szemcseméret gradiens alakjának és típusának gondos kiválasztásával a negatív szemcseméret gradiensekkel rendelkező nem-uniform oszlopok alkalmazása egy potenciális lehetőség a hatékonyabb elválasztás elérése érdekében. Bár ilyen szemcseméret gradiens oszlopok töltése a gyakorlatban nem lehetséges, a HPLC-ben alkalmazott 3D nyomtatás hajnalán [137, 138, 139, 140, 141] jogos előrejelzés lehet, hogy a jövőben lehetőség nyílik hatékony szemcseméret gradiens oszlopok előállítására.

Az eredmények hangsúlyozzák az új állófázis szerkezetek *in-silico* optimalizálásának fontosságát is.

3.3. Adszorpciós izotermák folyadékkromatográfiás meghatározása modell mentes inverz módszerrel

Az inverz módszer egy széles körben elterjedt technika adszorpciós izotermák meghatározására a folyadékkromatográfia területén. A módszer alapján az izoterma a komponens túltelített csúcsprofiljából kerül meghatározásra a folyadékkromatográfia tömegmérleg egyenletének iteratív megoldásával [6]. A módszer sikeres alkalmazásához szükséges egy *a priori* feltételezés az izoterma típusát illetően (Langmuir, BET, stb.). Ebben a munkában az inverz módszert úgy fejlesztettem tovább, hogy az használható legyen az izoterma típusának előzetes becslése nélkül is. A kidolgozott algoritmus implementálása Python programnyelven történt, amellyel előállítható a kromatográfiás tömegmérleg egyenlet megoldása. A Martin-Synge algoritmust [142] módosítottam, hogy segítségével a túltelített csúcsprofilok izoterma pontokra illesztett spline-okból meghatározhatóak legyenek. Az izoterma pontok számát és eloszlását optimalizáltam az eltérés minimalizálásának céljából. A fejlesztett numerikus módszer pontosságát butil-benzoát valós mérési adatokból történő izotermájának meghatározásával igazoltam. A módszer pontosságát összehasonlítottam a frontális analízis során kapott eredményekkel.

3.3.1. Elúciós profilok számítása

Az elúciós profilok kiszámítása az egyensúlyi-diszperzív modell Martin-Synge algoritmussal való megoldásával történt [142]. Ha az anyagátadás kinetikája gyors vagy a komponens diszperziós koefficiense pontosan kiszámítható, a komponens differenciális tömegmérleg egyenlete [8, 9, 10] így írható:

$$\frac{\partial c[z, t]}{\partial t} = -F \frac{\partial q[z, t]}{\partial t} - u_0 \frac{\partial c[z, t]}{\partial z} + D_a \frac{\partial^2 c[z, t]}{\partial z^2} \quad (3.48)$$

ahol q és c a komponens koncentrációja az álló-, illetve a mozgófázisban, t az idő, z a hosszirányú helykoordináta, u_0 az eluens lineáris sebessége, és $F = (1/\epsilon)/\epsilon$ a fázisarány, ahol ϵ az oszlop teljes porozitását jelöli. q és c kapcsolatát az izoterma egyenlet, $q = f(c)$, fejezi ki. A (3.48) egy lokális egyenlet, amely az oszlop bármely pontjára érvényes.

A látszólagos diszperziós koefficiens, D_a így adható meg:

$$D_a = u \frac{H}{2} \quad (3.49)$$

ahol H a látszólagos elméleti tányérmagasság (HETP), kísérletileg meghatározható. Ezzel a feltételezéssel élve az egyensúlyi-diszperzív modell megfelelően veszi figyelembe az oszlop hatékonyságának elúciós sávprofilokra gyakorolt hatását.

Ha a kromatográfiás oszlopot felosztjuk M egységre, a (3.6) egyenlet átalakítható közönséges differenciálegyenletek (ODE) sorozatává, amelyek időben folytonosak, térben pedig diszkrét. Az m -edik egységre a következő ODE definiálható:

$$\frac{\partial c_m[t]}{\partial t} = -F \frac{\partial q_m[t]}{\partial t} - u_0 \frac{\partial c_m[t] - c_{m-1}[t]}{\Delta z} \quad (3.50)$$

ahol Δz az egység hossza ($\Delta z = L/M$), és $1 \leq m \leq M$. c_m és c_{m-1} a komponens koncentrációja az m -edik és $(m-1)$ -edik egységben.

A (3.50) egyenlet $\frac{\partial q_m[t]}{\partial t}$ tagja másképpen kifejezve:

$$\frac{\partial q_m[t]}{\partial t} = \frac{d q_m}{d c} \frac{\partial c_m[t]}{\partial t} \quad (3.51)$$

Ezt behelyettesítve a (3.50) egyenletbe, megkapjuk a végső formulát:

$$\frac{\partial c_m[t]}{\partial t} = -\frac{u}{1 + F \frac{d q_m}{d c}} \frac{\partial c_m[t] - c_{m-1}[t]}{\Delta z} \quad (3.52)$$

A kezdeti feltétel $c_m[t=0] = 0$, míg az injektálás profilja négyszögfüggvény injektálás esetén $c_0[0 < t \leq 0] = c_{inj}$, ahol c_{inj} az injektált koncentráció. A komponens elúciós profilja az utolsó egységre kapott megoldás, c_M .

A (3.49) egyenletben az ED modell alapján, a látszólagos diszperziós koefficiens, D_a , egyenlő $u(H/2)$ -vel. Így, a (3.52) egyenlet ekvivalens az ED modell egyenletével, ha $\Delta z = H$, vagy másképp kifejezve, ha az egységek száma, amelyre az oszlopot felosztjuk, megegyezik az elméleti tányérszámmal:

$$\Delta z = \frac{L}{N} \quad (3.53)$$

ahol L az oszlop hossza, és N az elméleti tányérszám.

3.3.2. Izotermák meghatározása inverz módszerrel

Oldat fázisban az anyagok izotermájának meghatározása általában kísérleti úton történik, ami rendkívül mintaigényes és emellett nagy mennyiségű hulladékot termel. Az inverz módszert alkalmazva az izoterma meghatározása a túltelített csúcsprofilból történik, az ED modell megoldását a mért csúcsra illesztve. Ebben az esetben azonban szükséges egy becslés a komponens izoterma modelljét illetően. Ebben a munkában egy bizonyos számú izoterma pontra illesztett spline-t használtam, mint izotermát az ED modellben az inverz módszer alkalmazása során. Az izoterma pontok száma optimalizálásra került a mért és számított csúcsprofilok különbségének minimalizálása érdekében. Ezt a különbséget a reziduális négyzetösszeg fejezi ki, ami a következőképpen számítható:

$$SSR = \sum_i (c_i^{\text{calc}} - c_i^{\text{meas}})^2 \quad (3.54)$$

ahol c_i^{calc} és c_i^{meas} a mért és számolt koncentrációk az i pontban.

3.3.3. Izoterma pontok eloszlása

A kidolgozott izoterma egyenlet mentes módszer sikeres alkalmazásához elengedhetetlen meghatározni az izoterma pontok minimális számát és eloszlását az x tengely mentén, hogy pontos sávprofilokat nyerjünk. Az izoterma pontok számának és eloszlásának változtatásával a sávprofilok kiszámíthatók az izoterma egyenlet mentes Martin-Syngé algoritmus segítségével. Az így kapott eredmények összevethetők az izoterma pontok előállításához használt izoterma egyenletből számolt sávprofillal. A különböző esetek pontossága a sávprofilok eltérés négyzetösszegével számszerűsíthető. A számítások során az izoterma pontok száma 10 és 500 között változott. Az izoterma pontok eloszlására öt különböző forgatókönyvet vizsgáltam. Ezek a következők:

Langmuir izoterma:

1. lineáris eloszlás a c tengelyre.
2. logaritmikus eloszlás a c tengelyre.

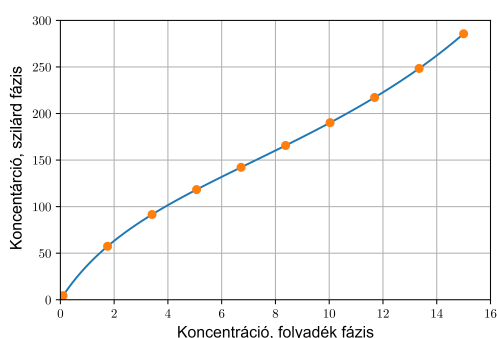
BET izoterma:

3. logaritmikus eloszlás a c tengelyre.
4. logaritmikus eloszlás a q tengelyre.
5. lineáris eloszlás a c tengelyre.

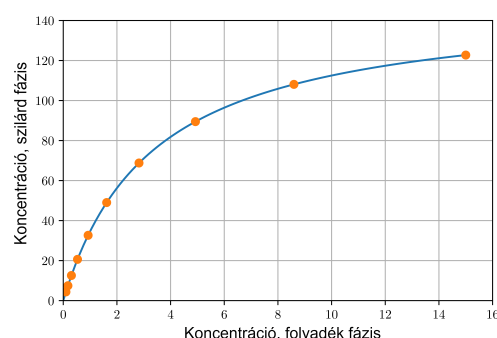
A különböző forgatókönyvekre számolt SSR értékeket a 3.5 táblázat foglalja össze. Az eredmények azt mutatják, hogy konkáv izoterma esetén – mint a Langmuir izoterma – az izoterma pontok c -tengelyre való logaritmikus eloszlása, míg konvex izotermák esetén – amilyen a BET izoterma – az izoterma pontok c -tengelyre való lineáris eloszlása adja a legpontosabb eredményeket (lásd 3.10 ábra). Az eredményekből arra is következtethetünk, hogy az izoterma egyenlet mentes modell még kis számú (10-20) izoterma pont esetén is alkalmas túltelített csúcsprofilok számítására konvex és konkáv izotermák esetén is.

3.5. táblázat Az egyes forgatókönyvekre számolt SSR értékek különböző számú izoterma pontok esetén

Forgatókönyv	Izoterma pontok száma				
	10	20	40	100	500
1	1,69	$2,28 \cdot 10^{-2}$	$1,60 \cdot 10^{-4}$	$1,41 \cdot 10^{-7}$	$7,07 \cdot 10^{-13}$
2	1,41	$1,40 \cdot 10^{-4}$	$1,08 \cdot 10^{-6}$	$5,61 \cdot 10^{-10}$	$5,84 \cdot 10^{-13}$
3	0,46	$1,10 \cdot 10^{-4}$	$1,81 \cdot 10^{-5}$	$1,98 \cdot 10^{-6}$	$2,32 \cdot 10^{-8}$
4	4270	156,6	31,05	$2,50 \cdot 10^{-4}$	$2,95 \cdot 10^{-6}$
5	-	1,54	$2,67 \cdot 10^{-3}$	$9,67 \cdot 10^{-7}$	$5,73 \cdot 10^{-8}$



(a) BET izoterma



(b) Langmuir izoterma

3.10. ábra Az izoterma pontok optimális eloszlása konvex (a) és konkáv izoterma (b) esetén.

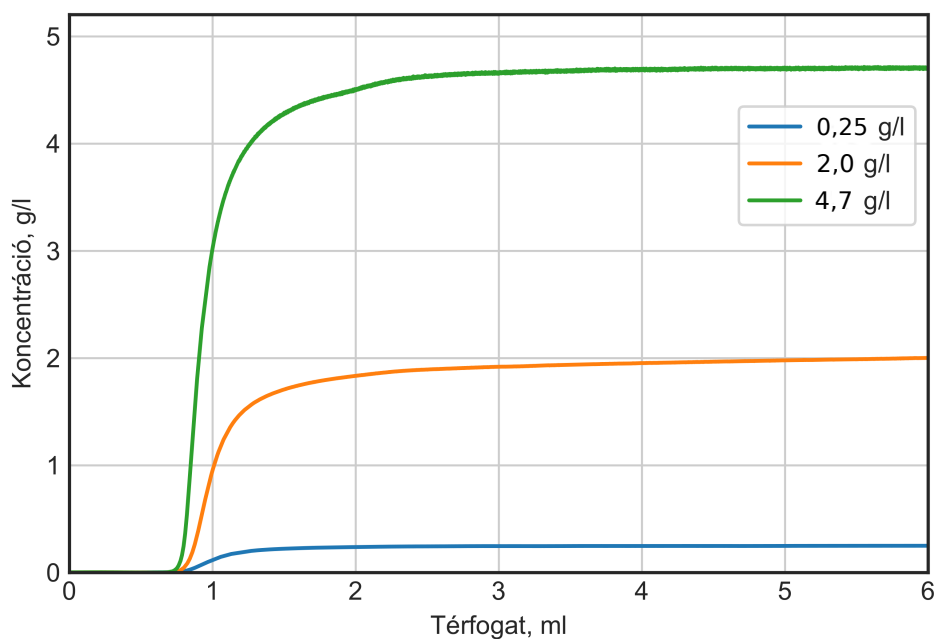
3.3.4. Butil-benzoát izotermájának meghatározása frontális analízissel és izoterma egyenlet mentes inverz módszerrel

A frontális analízis dinamikus módszer, amely alkalmas izotermák meghatározására. Az izoterma meghatározásához áttörési görbék felvételére van szükség, amelyek a mintát különböző koncentrációban tartalmazó elegyek oszlopra injektálásával nyerhetők. Az izoterma az áttörési görbék frontjának inflexiós pontjainak ismeretében állítható elő a következő képlettel:

$$q = \frac{c (V_{\text{infl}} - V_0)}{V_S} \quad (3.55)$$

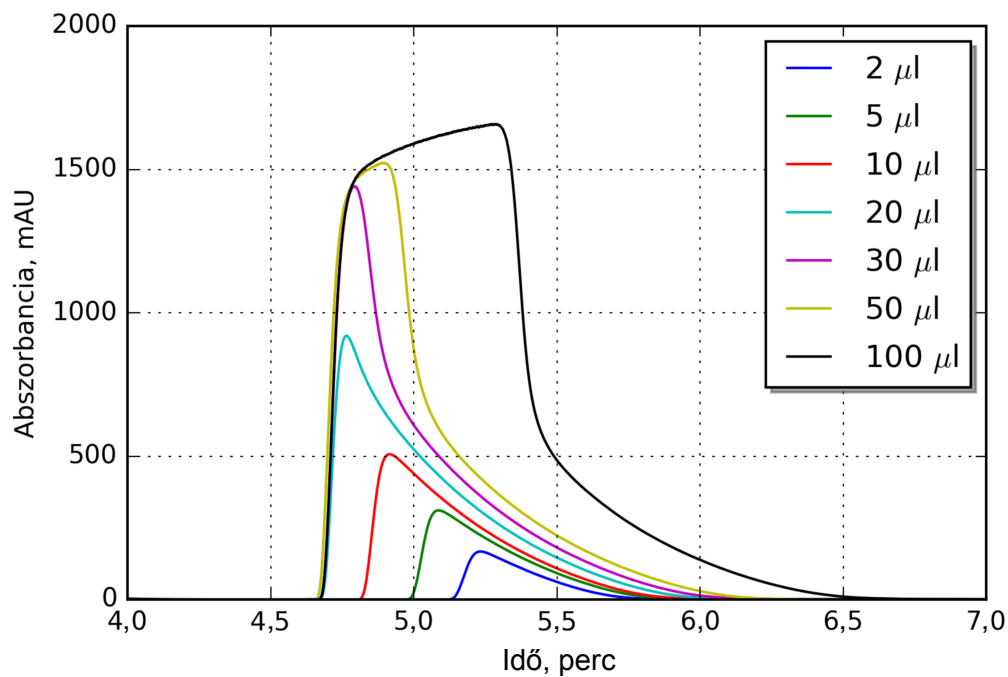
ahol c a minta mozgófázisbeli koncentrációja, V_{infl} az inflexiós ponthoz tartozó retenciós térfogat, V_0 a holtterfogat és V_S az állófázis térfogata.

Az áttörési görbék inflexiós pontjának meghatározása köbös spline illesztéssel történt. A spline deriváltjának maximuma adja az inflexiós pontot. A holtterfogat meghatározása uracil injektálásával történt. A 3.11. ábrán a butil-benzoát három különböző koncentrációhoz tartozó áttörési görbéje látható.



3.11. ábra A 0,25 g/l (kék), a 2,0 g/l (narancs) és a 4,7 g/l (zöld) koncentrációjú butilbenzoát minták áttörési görbéi.

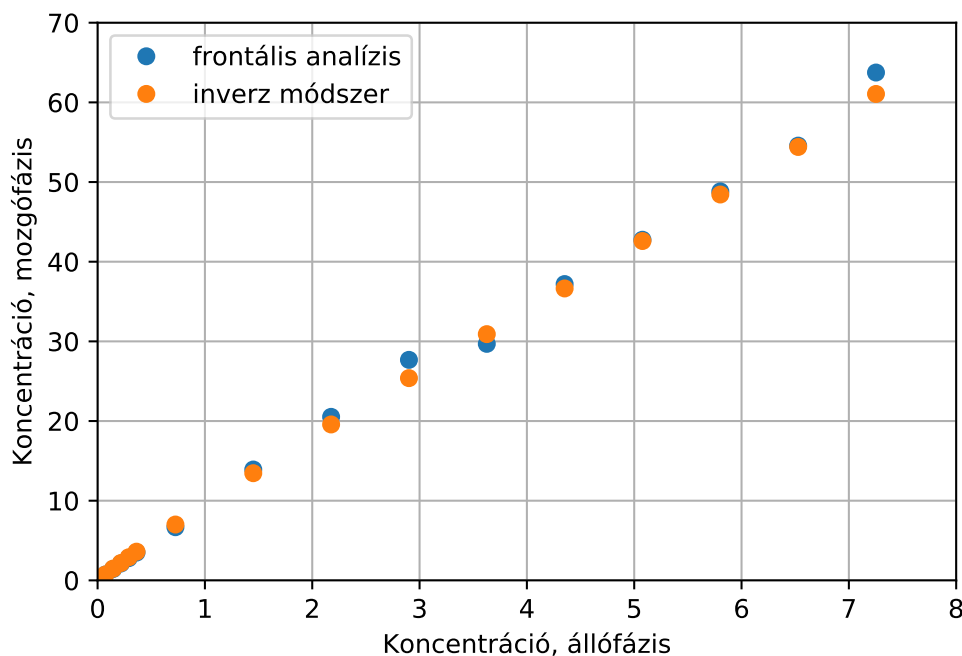
Megjegyzendő, hogy ezek az áttörési görbék szolgáltak a detektor kalibrációjának alapjául, melynek segítségével a detektorjel (abszorbancia) koncentrációvá alakítható.



3.12. ábra A butil benzoát különböző injektálási térfogatokhoz tartozó csúcsalakjai 30°-on.

A 3.12. ábra a butil benzoát kromatogramjait illusztrálja különböző térfogatú, a frontális analízis módszere során alkalmazott mintaoldat injektálása esetén. A csúcsalak az injektálás térfogatának növelésével jelentősen változik. 30 μ l-es injektált térfogatig feltételezhető, hogy a butil-benzoát adszorpcióját Langmuir-típusú izoterma írja le. Az injektált térfogat további növelésével azonban nyilvánvalóvá válik, hogy a komponens adszorpciójára BET-típusú izoterma jellemző, azaz az adszorpció többretegű. Ennek megfelelően az izoterma egyenlet mentes inverz módszerben az izoterma pontok eloszlása lineáris a c -tengelyre (abszcissza). Az izoterma meghatározásához a legnagyobb térfogatú injektálás kromatogramját használtam. Az abszorbancia átváltása koncentrációra a frontális analízis során nyert kalibrációs görbe segítségével történt.

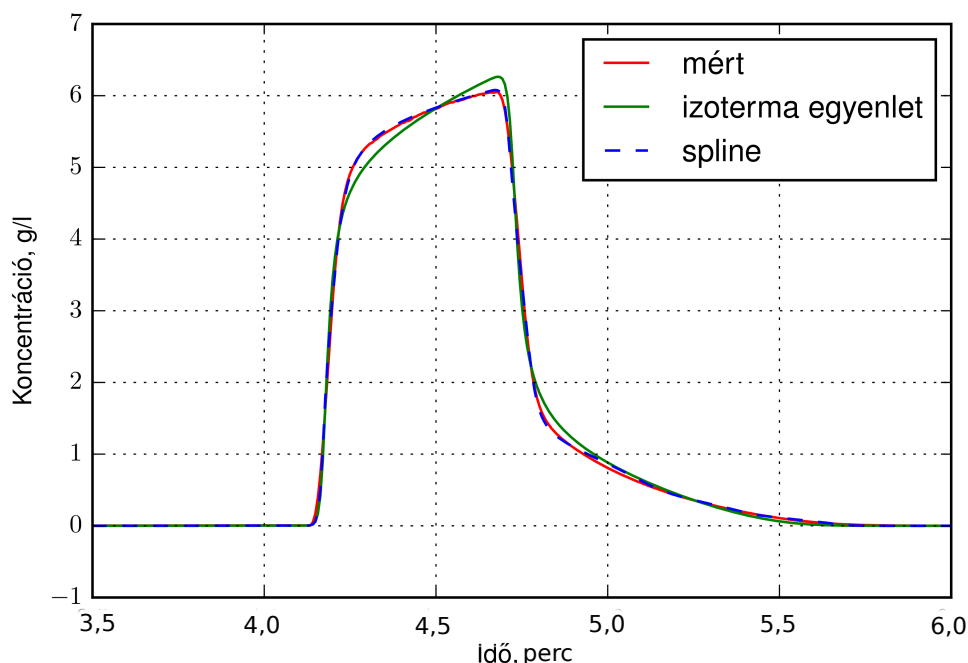
A 3.13. ábrán a frontális analízissel és az izoterma egyenlet mentes inverz módszerrel kapott izotermák összehasonlítása látható. Az összehasonlítás alapján a két különböző módszerrel meghatározott izotermák 3-4 pontja között fedezhető fel némi eltérés. Ettől eltekintve kijelenthető, hogy a két módszer eredményei között megfelelő egyezés van, az izotermák közötti különbség nem jelentős. Megállapítható, hogy a modellmentes inverz módszer alkalmas izotermák túltelített csúcsokból történő pontos meghatározására, a frontális analízisnél kevesebb minta és oldószer felhasználása mellett.



3.13. ábra Frontális analízissel (kék) és az izoterma egyenlet mentes inverz módszerrel (narancs) meghatározott izoterma pontok (30°C).

A 3.14. ábrán a butil-benzoát 20°C-on mért, illetve illesztett csúcsalakjai láthatók. Kijelenthető, hogy az izoterma egyenlet mentes inverz módszerrel lényegesen jobb il-

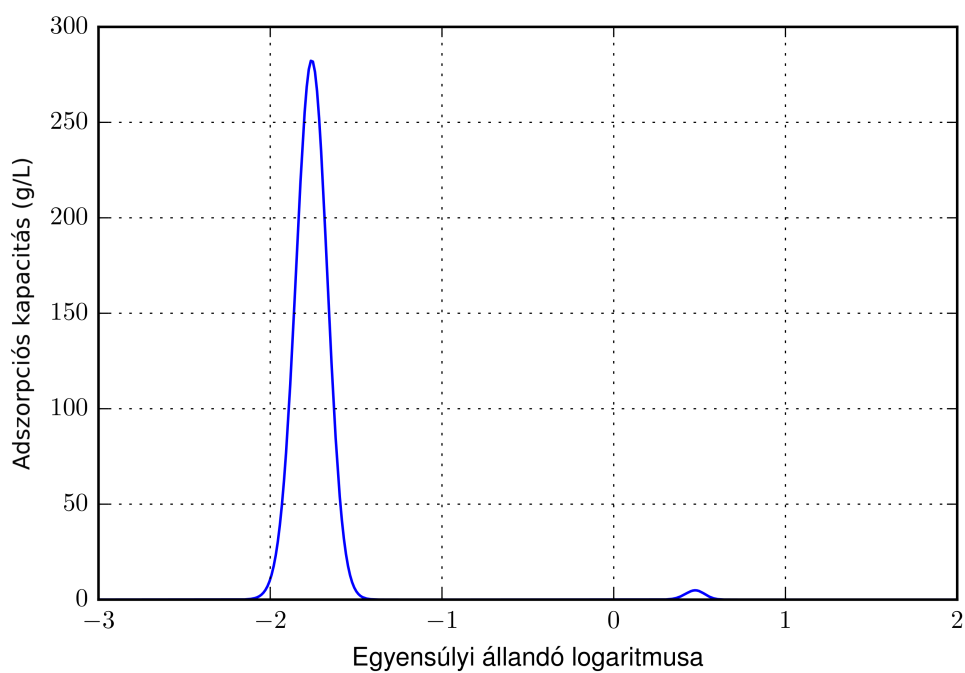
leszkesedés érhető el, mint a hagyományos izoterma egyenleten alapuló inverz módszer esetében.



3.14. ábra A butil-benzoát 20 °C-on mért (piros), izoterma modellen alapuló (zöld) és izoterma modell mentes (kék) módszerrel meghatározott csúcsalakja.

A 3.15. ábrán a fejlesztett módszerrel kapott izoterma pontok alapján végzett adszorpciós energiaeloszlás analízis eredménye látható, ami azt mutatja, hogy az állófázis kétfajta, különböző energiájú kötőhellyel rendelkezik. Ennek lehetséges magyarázata, hogy az alkalmazott fordított fázisú HPLC oszlop esetén a szilikagél felületének módosítására alkalmazott szilanizálás nem tekinthető tökéletesnek, a $-C_{18}$ csoportok mellett a szemcsék felületén jelen vannak szabad $-SiOH$ csoportok is. A butil-benzoát adszorpciója az alkalmazott HPLC oszlop esetén tehát egy bi-BET izotermával írható le. Ez az adszorpciós energia analízis vizsgálat izoterma modellen alapuló inverz módszer esetén nem kivitelezhető.

Preparatív elválasztások hatékony optimalizálásához szükséges a komponensek izotermájának ismerete. A frontális analízis, mint az izotermák meghatározásának legpontosabb módszere, nagy mennyiségű mintát és oldószert igényel. Ezzel szemben az inverz módszer segítségével egy komponens izotermája egyszerűen meghatározható a túltelített csúcsból. Utóbbi módszer hátránya, hogy előzetes feltételezést igényel az izoterma típusára és egyenletére vonatkozóan. A kifejlesztett izoterma egyenlet mentes inverz módszer egyesíti a frontális analízis és az inverz módszer előnyeit. Az előbbihez hasonlóan pontos izoterma pontokat eredményez, de az utóbbihoz hasonlóan az izoter-



3.15. ábra A butil-benzoát adszorpció energieloszlása 30°C hőmérsékleten.

ma pontokat egy túltelített kromatográfiás csúcsból határozza meg, így sokkal kevesebb mintát és oldószert igényel, mint a frontális analízis. Ez különösen drága komponensek (pl. monoklonális antitestek) izotermájának meghatározásakor jelent nagy előnyt.

3.4. Statikus longitudinális ioncsere gradiens oszlopok hatékonyságának vizsgálata

A ioncsere-kapacitás gradiens állófázis és a gradiens elúció kombinációjának elválasztási hatékonyságra gyakorolt hatását elméleti megközelítésben vizsgáltam. Referenciaként egy konstans ioncsere-kapacitású oszlopot vettem figyelembe, amelynek analízis ideje megegyezik az ioncsere-kapacitás gradiens oszlopéval.

3.4.1. Elúciós profilok számítása

Az elúciós profilok számítása az egyensúlyi-diszperzív (ED) modell Martin-Synge algoritlussal való megoldásán alapult [142] [lásd (3.48) és (3.49) egyenletek].

A Martin-Synge tányérmodell [21] a kromatográfiás oszlopot folytonosan kevert egységek sorozataként kezeli. Az összes ilyen egységre a következő nemlineáris differenciál egyenlet oldható meg:

$$\frac{d c_m[t]}{d t} = -F \frac{d q_m[t]}{d t} - u \frac{c_m[t] - c_{m-1}[t]}{\Delta z} \quad (3.56)$$

A kezdeti feltétel, $c_m[t = 0] = c_{inj}$, ahol m az egység sorszáma, c_{inj} az injektált koncentráció és c_M a komponens elúciós profilja. Ha az oszlopot M egységre osztjuk, akkor $1 \leq m \leq M$. Δz az egység hossza, amelyre az egyenletet megoldjuk ($\Delta z = L/M$). c_m és c_{m-1} a komponens koncentráció profilja az m -edik és az $(m - 1)$ -edik egységben.

Az (1.24) egyenlet alapján, az ED modell szerint a látszólagos diszperziós koefficiens, D_a , kifejezhető, mint $u(H/2)$. Így a (3.56) egyenlet ekvivalens az ED modell egyenletével, ha $\Delta z = H$, vagy más szavakkal, ha az egyensúlyi egységek - amelyekre az oszlopot felosztjuk - száma megegyezik annak elméleti tányérszámával:

$$\Delta z = \frac{L}{N} \quad (3.57)$$

ahol L az oszlop hossza, és N az elméleti tányérszám.

Mivel ebben a munkában lineáris körülményeket feltételeztem a (3.56) egyenlet a következő formára egyszerűsíthető:

$$\frac{d c_m[t]}{d t} = - \frac{u}{1 + k_m} \frac{c_m[t] - c_{m-1}[t]}{H} \quad (3.58)$$

ahol k_m a komponens retenciós tényezőjének változása az oszlop hossza mentén:

$$k_m = K_{A/OH} \left(\frac{Q_m}{[OH^-]} \right)^n \quad (3.59)$$

Ebben az egyenletben $K_{A/OH}$ az ioncsere szelektivitási koefficiens, Q_m az oszlop ioncsere kapacitása az $m \cdot \Delta z$ pozícióban, ami az ioncsere kapacitás oszlop hossza menti változását leíró függvényből számítható, $[OH^-]$ az eluens koncentráció, és n a komponens ion töltése. A (3.56) egyenlet numerikus megoldása a Martin-Synge algoritmusból származtatható, és így a koncentráció profilok és a csúcs momentumai kinyerhetők minden egyensúlyi egységre. Az utolsó egységre kapott megoldás adja az elúciós profilt.

3.4.1.1. Az ekvivalens ioncsere kapacitás meghatározása

Az ekvivalens ioncsere kapacitás, Q_e , definiálható, mint a nem-gradiens, uniform oszlop kapacitása, amelynek analízis ideje megegyezik a nem-uniform, gradiens kapacitású oszlopéval. Másképp fogalmazva, az utolsóként eluálódó ion retenciós ideje mindkét oszlop esetén azonos. Jandera és Churáček gradiens retenciós modellje [143] alapján, a retenciós idő, t_R , gradiens elúció esetén így fejezhető ki:

$$t_R = t_0 + \frac{[OH^-]_0}{\beta} \left[\left(1 + (n+1) \frac{\beta}{[OH^-]_0} k_0 t_0 \right)^{\frac{1}{n+1}} - 1 \right] \quad (3.60)$$

ahol t_0 a holtidő, β a gradiens meredeksége, és k_0 a mintakomponens retenciós tényezője az analízis kezdeti, $[OH^-]_0$ hidroxidion koncentrációján. A retenciós idő a (3.58) egyenlet megoldásából származtatható, mint az első normalizált momentum, amelynek ismeretében a (3.60) egyenletet Q_e -re átrendezve (amit a k_0 tartalmaz) kinyerhető az ekvivalens ioncsere kapacitás, ami az uniform oszlop kapacitása, amelynek analízis ideje megegyezik a nem-uniform oszlop analízis idejével. Az ekvivalens ioncsere kapacitású oszlop referenciaként szolgál, amelynek hatékonysága összehasonlítható különböző kapacitás-gradiens oszlopok hatékonyságával.

3.4.2. Ioncsere kapacitás gradiensek

Munkám során három különböző ioncsere kapacitás gradiens forgatókönyvet vizsgáltam. Mindhárom esetben a pozitív és negatív gradiensekre is, a nem-uniform oszlopokra számolt felbontásokat összevetettem az ezeknek megfelelő ekvivalens uniform (a nem-uniform oszlopéval megegyező analízis időt adó, konstans ioncsere kapacitású) oszlopok felbontásával. Pozitív kapacitás gradiens esetén a komponens sávjának sebessége és szélessége egyaránt csökken, miközben az oszlop vége felé halad. Negatív gradiens esetén ennek az ellenkezője figyelhető meg: az oszlop vége felé haladva mindkét paraméter növekszik. A számítások alapján a két csúcskeskenyítő hatás (növekvő sebesség és sávkompresszió) közül az utóbbi a jelentősebb, ezért a továbbiakban csak a pozitív gradienseket részletezem. A vizsgált forgatókönyvek a következők:

1. Lineáris gradiens

$$Q_z = \frac{q_L - q_0}{L} z + q_0 \quad (3.61)$$

2. Konvex gradiens

$$Q_z = (q_L - q_0) \left(\frac{z}{L} \right)^i + q_0 \quad (3.62)$$

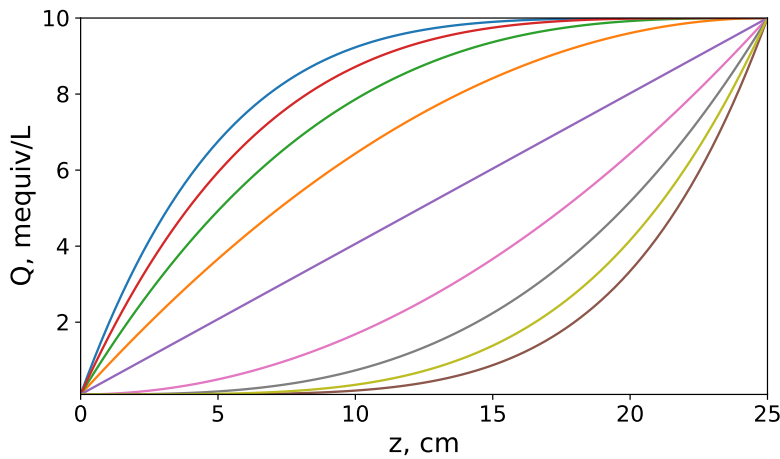
3. Konkáv gradiens

$$Q_z = (q_0 - q_L) \left(\frac{L - z}{L} \right)^i + q_L \quad (3.63)$$

ahol i egy pozitív egész szám (értéke 2 és 5 között változik)

q_0 és q_L az ioncsere kapacitás értéke az oszlop elején, illetve végén.

A különböző kapacitás gradiens profilok a 3.16. ábrán láthatók:



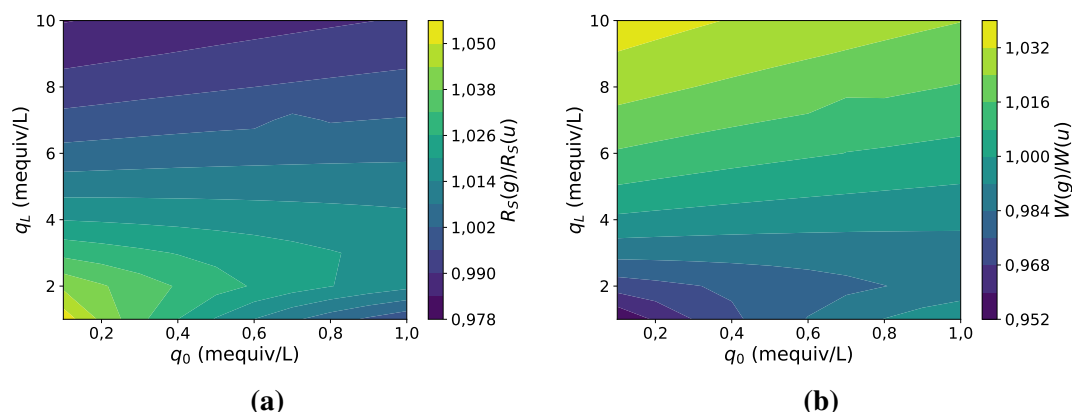
3.16. ábra A felhasznált különböző kapacitás gradiens modellek profiljai

3.4.3. Ioncsere kapacitás gradiens oszlopok felbontása

Ebben a részben azt vizsgáltam, hogy a kapacitás gradiens oszlopnak van-e előnye az azonos analízis idővel rendelkező uniform oszlophoz képest. Ehhez kiszámítottam a gradiens oszlop felbontását különböző q_0 és q_L értékekre, majd minden esetre meghatároztam a Q_e értékét, és összehasonlítottam a gradiens oszlop felbontását az uniform oszlopéval. Munkám során a q_0 értéke 0,1 és 1 mequiv/L, a q_L értéke 1 és 10 mequiv/L között változott. Ebben a részben kizárólag lineáris kapacitás gradienst használtam.

Azonos töltésű ionok elválasztása A gradiens oszlop felbontását azonos töltésű ionokra egyértékű ionok esetén a nitrácion és kloridion elválasztásának példáján keresztül vizsgáltam.

A 3.17a. ábra a gradiens és uniform oszlop felbontásának arányát mutatja q_0 és q_L függvényeként nitrát és klorid ion elválasztásának esetén.



3.17. ábra Gradiens és uniform oszlop elválasztási paramétereinek aránya q_0 és q_L függvényében lineáris ioncsere kapacitás gradiens esetén:

(a) A gradiens és uniform oszlop felbontásának aránya klorid és nitrát ion elválasztása esetén

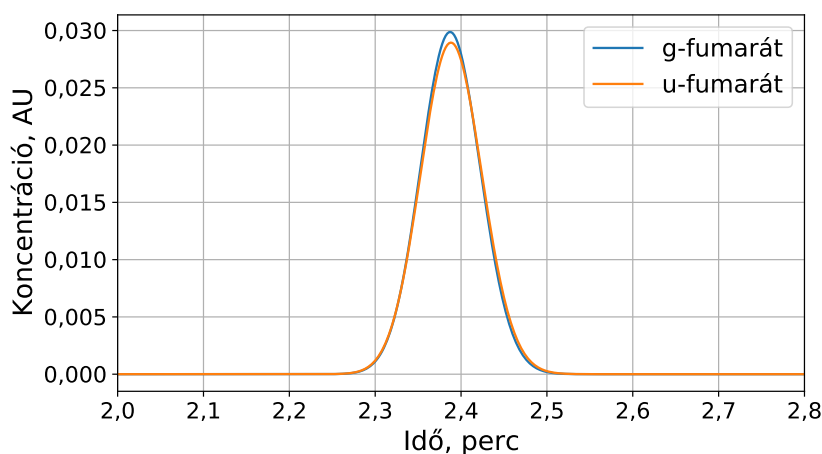
(b) A gradiens és uniform oszlopra számolt sávszélességek aránya nitrát ion esetén

A gradiens oszlop marginális előnyét az uniform oszloppal szemben a kapacitás gradiens extra sávkcsökkentő hatása okozza. A 3.17b. ábra a gradiens és uniform oszlopra számolt sávszélességek arányát mutatja nitrát ion esetén. A gradiens oszlop kis előnye csak a gyakorlati szempontból kevésbé fontos tartományban mutatkozik meg, mivel ebben a tartományban az egyes oszlopok felbontása minimális, és a retenciós idők közel vannak a holtidőhöz.

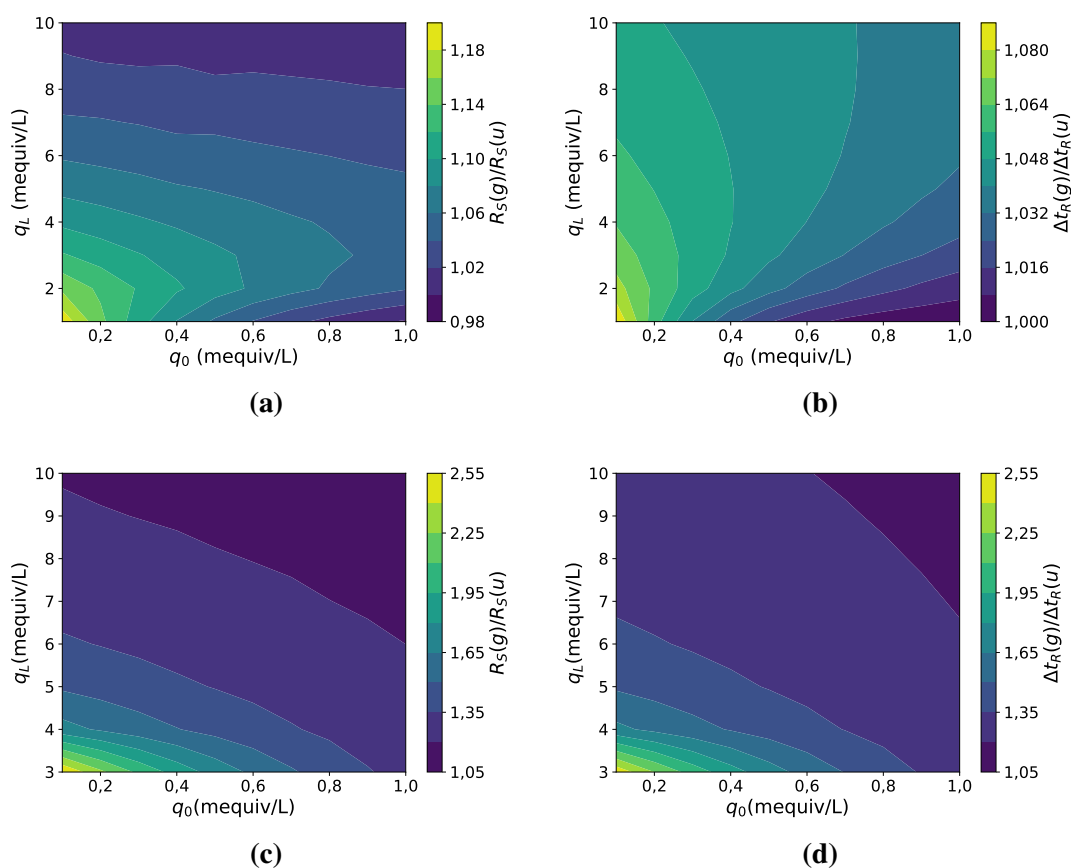
Hasonló következtetés vonható le a kétértékű ionok elválasztásának vizsgálata esetén szulfátion és fumarátion példáján keresztül. A 3.18. ábra a fumarátion csúcsalakjainak összehasonlítását mutatja gradiens (g) és uniform (u) oszlop esetén. A számolás paramétere a következők voltak: $q_0=0,4$ mequiv/L, $q_L=2$ mequiv/L, $Q_e=1,29$ mequiv/L. Ezen paraméterek esetén $\sim 4\%$ felbontásbeli előny figyelhető meg ioncsere kapacitás gradiens figyelembe véve.

A 3.18. ábra a (3.60) egyenlet hitelességét igazolja, mivel a két csúcs tökéletesen illeszkedik egymásra és retenciós idejük azonos.

Különböző töltésű ionok elválasztása A különböző töltésű ionok ioncsere kapacitás gradiens oszlopon való elválasztását klorid-szulfát és nitrát-szulfát ionok elválasztásának példáján keresztül modelleztem. Ebben az esetben a kapacitás gradiens okozta sávszélesség csökkenés mellett az egyértékű ion retenciós idejének csökkenése is hozzájárul a felbontás javulásához. A 3.19. ábra a gradiens és uniform oszlopokra számolt felbontások arányát, illetve a két ion retenciós idő különbségének arányát ábrázolja a q_L és q_0 függvényében klorid és szulfát, illetve nitrát és szulfát ionok elválasztása esetén.



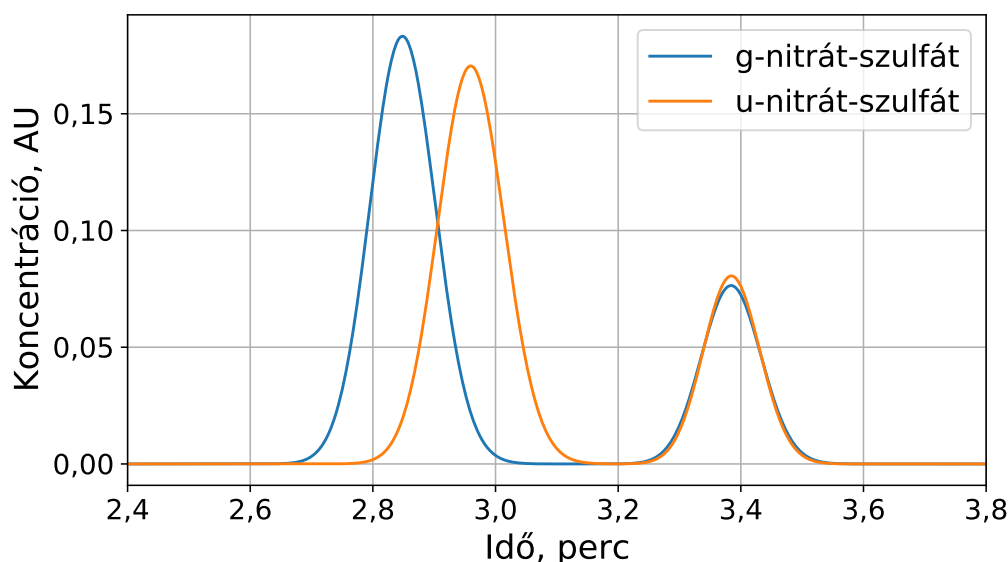
3.18. ábra A fumarát ion elúciós profilja gradiens (kék) és uniform (narancs) oszlop esetén



3.19. ábra A gradiens és uniform oszlopra számolt felbontások aránya [(a) és (c)], illetve a két ion retenciós idő különbségének aránya [(b) és (d)] a q_L és q_0 függvényében klorid és szulfát [(a) és (b)], illetve nitrát és szulfát [(c) és (d)] ionok elválasztása esetén.

Ahogy azt a 3.19a. és 3.19c. ábra mutatja, az ioncsere kapacitás értéke az oszlop elején és végén döntő jelentőségű az elválasztás hatékonysága szempontjából. Minden q_0 értékhez tartozik egy q_L érték, ahol a felbontásnak maximuma van. Elválasztások tervezésekor fontos még figyelembe venni az egyes ionok ioncsere szelektivitási konstansait is. A számítások alapján az ioncsere gradiens oszlop előnye jelentősebb egyértékű és kétértékű ionok elválasztása esetén, mint azonos töltésű ionok elválasztása esetén.

A 3.20. ábrán a nitrát és szulfát ionok gradiens (g) és uniform (u) oszlopokra számolt elúciós profiljainak összehasonlítása látható. A számítás paraméterei a következők: $q_L=7$ mequiv/l, $q_0=0,5$ mequiv/l, $Q_e=4,2$ mequiv/l. Ezekkel a paraméterekkel a gradiens oszlop előnye ~ 24 % az uniform oszlophoz képest a felbontást tekintve.



3.20. ábra A nitrát és szulfát ion elúciós profilja gradiens (kék) és uniform (narancs) oszlopon

3.4.4. Az ioncsere-kapacitás gradiens profiljának hatása a felbontásra

Az ioncsere kapacitás gradiens profilja (Q_z) egy fontos tényező az oszlop hatékonysága szempontjából. A 3.6. táblázat a gradiens oszlop felbontásbeli javulását mutatja a Q_e kapacitású uniform oszlophoz képest nitrát és szulfát ionok elválasztása esetén különböző Q_z ioncsere kapacitás gradiens profilokra, adott q_0 és q_L értékek esetén (0,5 és 7 mequiv/l).

3.6. táblázat A felbontás javulása különböző Q_z profilok esetén

Forgatókönyv	<i>i</i>	Q_e , mequiv/l	R_S -u	R_S -g	Javulás, %
Lineáris	-	0,420	2,12	2,63	24
Konvex	2	0,330	1,56	2,45	57
	3	0,282	1,22	2,33	90
	4	0,250	0,99	2,22	125
	5	0,228	0,81	2,12	163
Konkáv	2	0,520	2,67	3,02	13
	3	0,568	2,91	3,17	9
	4	0,596	3,03	3,25	7
	5	0,614	3,12	3,30	6

Ahogy a fenti adatokból látszik, a határoló kapacitás értékek mellett a kapacitás gradiens profilja is döntő tényező az elválasztás szempontjából. A gradiens oszlop előnye elsősorban akkor jelentkezik, ha az egyes oszlopok felbontása kisebb, nagyobb felbontásnál az előny kevésbé jelentős.

A felbontás javulása gradiens oszlop esetén a retenciós idő és az egyértékű ion sáv szélességének csökkenése által valósul meg.

Az ioncsere kapacitás gradiens HPLC oszlopban való kihasználását elméleti megközelítésben vizsgáltam. A kapacitás gradienst különböző függvényekkel (lineáris, konvex és konkáv) modelleztem. Ezeknek a nem-uniform oszlopoknak a felbontását minden forgatókönyvre kiszámítottam egyértékű és kétértékű anionok elválasztása esetén a határoló kapacitás értékek függvényében. Az eredményeket összehasonlítottam az uniform referencia oszlopok felbontásával, amelyek analízis ideje azonos volt, mint a gradiens oszlop esetében. Az eredményeket számított elúciós profilokkal szemléltettem. Számításaim alapján az azonos töltésű ionok esetében az elválasztási hatékonyság csak kis mértékben javult. A gradiens oszlop előnye a kapacitás gradiens okozta extra sáv szélesség csökkenésnek köszönhető. Ami az egyértékű és kétértékű ionok elválasztását illeti, a gradiens oszlop előnye jelentősebb az egyértékű ionok retenciós idejének és sáv szélességének csökkenése miatt. Az ioncserélő kapacitás gradiens profiljának és határértékeinek körültekintő megválasztásával az ilyen nem-uniform oszlopok alkalmazása az eluens koncentráció gradiensével együtt potenciális javulást jelenthet a hatékonyabb elválasztások elérésében. Az eredmények az újszerű állófázis-szerkezetek *in silico* optimalizálásának fontosságát is hangsúlyozzák.

4. Összefoglalás

A munkám célja az oszlopban lejátszódó fizikai és kémiai folyamatok vizsgálata volt lineáris- és nemlineáris folyadékkromatográfiában. A kétrétegű tömörmagvú szemcsés állófázisok hatékonyságát az általános sebességi modell Laplace tartományban történő megoldásával vizsgáltam. Az eredmények alapján a kétrétegű szemcsék akkor biztosítanak nagyobb elválasztási hatékonyságot a hagyományos héjszerkezetű fázisokkal szemben, ha a külső réteg visszatartása, illetve pórus diffúziója nagyobb, mint a belső rétegé. Ily módon a kétrétegű szemcseszerkezet az oszlop hatékonyságát 15-20%-kal növelheti.

A szemcseméret gradiens HPLC oszlopban való alkalmazására történt számítások azt mutatták, hogy gradiens elúciós módban negatív – azaz az oszlop vége felé haladva csökkenő – szemcseméret gradienssel rendelkező oszlopok az extra sávkompressziós hatásnak köszönhetően, a szemcseméret gradiens profiljától függően ~ 1 -4% hatékonyságnövekedést mutatnak összehasonlítva azonos permeabilitású konstans szemcsemérettel rendelkező oszlopokkal. A határoló szemcseméreteket optimalizálva ez az előny tovább növelhető ~ 5 -8%-ra.

Munkám során olyan izoterma egyenlet mentes inverz módszert dolgoztam ki, amely során az izoterma egyenlet helyett az izoterma pontokra illesztett spline deriváltját illesztettem a Martin-Synge algoritmus tömegmérleg egyenletébe, ezáltal ez a módszer nem igényel előzetes feltételezést az izoterma típusára vonatkozóan. A módszer pontosságát butil-benzoát izotermájának mérésekből történő meghatározásával igazoltam. Az eredmények azt mutatják, hogy az izoterma egyenlet mentes inverz módszer a frontális analízisével összevethető pontossággal alkalmazható folyadékkromatográfiás módszer izotermák meghatározására.

Az ioncsere kapacitás gradiens HPLC oszlop hatékonyságára gyakorolt hatására vonatkozó számítások eredményei azt mutatták, hogy különböző töltésű ionok elválasztása esetén, az ioncsere kapacitás gradienst eluens koncentráció gradienssel kombinálva hatékonyságnövekedés érhető el az azonos analízis idejű konstans ioncsere kapacitással rendelkező oszlophoz képest. Ez a hatékonyságnövekedés egyértékű ion retenciós idejének, valamint sávszélességének csökkenésén keresztül nyilvánul meg.

Irodalomjegyzék

- [1] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan, Introduction to Modern Liquid Chromatography, John Wiley and Sons, Ltd, 2009. doi:10.1002/9780470508183.ch15.
- [2] K. Miyabe, Moment analysis of chromatographic behavior in reversed-phase liquid chromatography, J. Sep. Sci. 32 (2009) 757–770. doi:10.1002/jssc.200800607.
- [3] E. Wicke, Empirische und theoretische untersuchungen der sorptionsgeschwindigkeit von gasen an porösen stoffen II, Kolloid-Zeitschrift 86 (1939) 295 – 313. doi:10.1007/BF01511392.
- [4] J. N. Wilson, A Theory of Chromatography, J. Am. Chem. Soc. 62 (1940) 1583 – 1591. doi:10.1021/ja01863a071.
- [5] D. DeVault, The Theory of Chromatography, J. Am. Chem. Soc. 65 (1943) 532 – 540. doi:10.1021/ja01244a011.
- [6] G. Guiochon, A. Felinger, D. G. Shirazi, A. M. Katti, Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography, Academic Press, 2006.
- [7] G. Guiochon, L. Jacob, Theory of chromatography at finite concentration, Chromatogr. Rev. 14 (1971) 77 – 120. doi:10.1016/0009-5907(71)80004-2.
- [8] J. C. Giddings, Plate height of nonuniform chromatographic columns. gas compression effects, coupled columns, and analogous systems, Anal. Chem. 35 (1963) 353–356. doi:10.1021/ac60196a026.
- [9] J. van Deemter, F. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, Chem. Eng. Sci. 5 (1956) 271 – 289. doi:10.1016/0009-2509(96)81813-6.
- [10] P. C. Haarhoff, H. J. Van der Linde, Concentration dependence of elution curves in non-ideal gas chromatography, Anal. Chem. 38 (1966) 573–582. doi:10.1021/ac60236a013.

- [11] D. M. Ruthven, Principles of Adsorption and Adsorption Processes, Wiley, New York, 1984.
- [12] M. Suzuki, Adsorption Engineering, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1990.
- [13] W. Piątkowski, D. Antos, K. Kaczmarski, Modeling of preparative chromatography processes with slow intraparticle mass transport kinetics, *J. Chromatogr. A* 988 (2003) 219 – 231. doi:10.1016/S0021-9673(02)02060-5.
- [14] K. Kaczmarski, M. Mazzotti, G. Storti, M. Morbidelli, Modeling fixed-bed adsorption columns through orthogonal collocations on moving finite elements, *Comput. Chem. Eng.* 21 (1997) 641 – 660. doi:10.1016/S0098-1354(96)00300-6.
- [15] K. Kaczmarski, D. Antos, H. Sajonz, P. Sajonz, G. Guiochon, Comparative modeling of breakthrough curves of bovine serum albumin in anion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 925 (2001) 1 – 17. doi:10.1016/S0021-9673(01)01035-4.
- [16] X. Liu, K. Kaczmarski, A. Cavazzini, P. Szabelski, D. Zhou, G. Guiochon, Modeling of preparative reversed-phase HPLC of insulin, *Biotechnol. Prog.* 18 (2002) 796–806. doi:10.1021/bp020003a.
- [17] E. Kučera, Contribution to the theory of chromatography: Linear non-equilibrium elution chromatography, *J. Chromatogr. A* 19 (1965) 237 – 248. doi:10.1016/S0021-9673(01)99457-9.
- [18] M. Kubín, Beitrag zur theorie der chromatographie II. Einfluss der diffusion ausserhalb und der adsorption innerhalb des sorbens-korns, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 30 (1965) 2900–2907. doi:10.1135/cccc19652900.
- [19] S. Lievenspiel, V. der Laan, Notes on the diffusion-type model for longitudinal mixing in flow, *Chem. Eng. Sci.* 9 (1959) 266 – 267. doi:10.1016/0009-2509(59)85009-0.
- [20] J. H. Knox, Practical Aspects of LC Theory, *J. Chromatogr. Sci.* 15 (1977) 352–364. doi:10.1093/chromsci/15.9.352.
- [21] A. Martin, R. Synge, A new form of chromatogram employing two liquid phases: 1. A theory of chromatography 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins, *Biochem. J.* 12 (1941) 1358–1368. doi:10.1042/bj0351358.

- [22] S. Brunauer, P. H. Emmett, E. Teller, Adsorption of gases in multimolecular layers, *J. Am. Chem. Soc.* 60 (1938) 309 – 319. doi:10.1021/ja01269a023.
- [23] F. Gritti, W. Piatkowski, G. Guiochon, Comparison of the adsorption equilibrium of a few low-molecular mass compounds on a monolithic and a packed column in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 978 (1) (2002) 81 – 107. doi:10.1016/S0021-9673(02)01279-7.
- [24] P. Vajda, A. Felinger, Multilayer adsorption on fractal surfaces, *J. Chromatogr. A* 1324 (2014) 121 – 127. doi:10.1016/j.chroma.2013.11.028.
- [25] G. Carta, Scale-up and optimization in preparative chromatography: Principles and biopharmaceutical applications, *J. Am. Chem. Soc.* 11 (2003) 3398–3399. doi:10.1021/ja025322c.
- [26] J. Samuelsson, T. Undin, T. Fornstedt, Expanding the elution by characteristic point method for determination of various types of adsorption isotherms, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 3737 – 3742. doi:10.1016/j.chroma.2011.04.035.
- [27] T. Fornstedt, Characterization of adsorption processes in analytical liquid–solid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 792–812. doi:10.1016/j.chroma.2009.12.044.
- [28] J. Samuelsson, R. Arnell, T. Fornstedt, Potential of adsorption isotherm measurements for closer elucidating of binding in chiral liquid chromatographic phase systems, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1491–1506. doi:10.1002/jssc.200900165.
- [29] A. Seidel-Morgenstern, Experimental determination of single solute and competitive adsorption isotherms, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 255–272. doi:10.1016/j.chroma.2003.11.108.
- [30] D. H. James, C. S. G. Phillips, The chromatography of gases and vapours. part III. The determination of adsorption isotherms, *J. Chem. Soc.* 76 (1954) 1066–1070. doi:10.1039/JR9540001066.
- [31] G. Schay, G. Szekely, Gas adsorption measurements in flow systems, *Acta Chim. Hung.* 5 (1954) 167.
- [32] E. Glueckauf, Theory of chromatography. Part 10.—Formulae for diffusion into spheres and their application to chromatography, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 51 (1955) 1540. doi:10.1039/TF9555101540.

- [33] E. Cremer, H. Huber, Messung von adsorptionsisothermen an katalysatoren bei hohen temperaturen mit hilfe der gas-festkörper-eluierungschromatographie, *Angew. Chem.* 73 (1961) 461–465. doi:10.1002/ange.19610731303.
- [34] F. Helfferich, Travel of molecules and disturbances in chromatographic columns: A paradox and its resolution, *J. Chem. Educ.* 41 (1964) 410. doi:10.1021/ed041p410.
- [35] S. Golshan-Shirazi, G. Guiochon, Experimental characterization of the elution profiles of high concentration chromatographic bands using the analytical solution of the ideal model, *Anal. Chem.* 61 (1989) 462–467. doi:10.1021/ac00180a017.
- [36] J. Jacobson, J. Frenz, C. Horváth, Measurement of adsorption isotherms by liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 316 (1984) 53 – 68. doi:10.1016/S0021-9673(00)96140-5.
- [37] J.-X. Huang, C. Horváth, Adsorption isotherms on high-performance liquid chromatographic sorbents: I. Peptides and nucleic acid constituents on octadecyl-silica, *J. Chromatogr. A* 406 (1987) 275 – 284. doi:10.1016/S0021-9673(00)94035-4.
- [38] J.-X. Huang, C. Horváth, Adsorption isotherms on high-performance liquid chromatographic sorbents.: II. Proteins on cation exchangers with silica support, *J. Chromatogr. A* 406 (1987) 285 – 294. doi:10.1016/S0021-9673(00)94036-6.
- [39] E. V. Dose, G. Guiochon, Calibrating detector responses using chromatographic peak shapes, *Anal. Chem.* 62 (1990) 816–820. doi:10.1021/ac00207a009.
- [40] E. V. Dose, S. Jacobson, G. Guiochon, Determination of isotherms from chromatographic peak shapes, *Anal. Chem.* 63 (1991) 833–839. doi:10.1021/ac00008a020.
- [41] J. Åke Jönsson, P. Lökvist, Determination of adsorption isotherms from chromatographic measurements, using the peak maxima method, *J. Chromatogr. A* 408 (1987) 1 – 7. doi:10.1016/S0021-9673(01)81785-4.
- [42] A. Felinger, A. Cavazzini, G. Guiochon, Numerical determination of the competitive isotherm of enantiomers, *J. Chromatogr. A* 986 (2003) 207–225. doi:10.1016/S0021-9673(02)01919-2.

- [43] A. Cavazzini, A. Felinger, G. Guiochon, Comparison between adsorption isotherm determination techniques and overloaded band profiles on four batches of monolithic columns, *J. Chromatogr. A* 1012 (2003) 139–49. doi:10.1016/S0021-9673(03)01185-3.
- [44] U. D. Neue, HPLC Columns, Theory, Technology, and Practice, *Instrum. Sci. Technol.* 26 (1998) 439–440. doi:10.1080/10739149808001913.
- [45] U. D. Neue, HPLC Columns, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [46] I. Halasz, M. Naefe, Influence of column parameters on peak broadening in high-pressure liquid chromatography, *Anal. Chem.* 44 (1972) 76–84. doi:10.1021/ac60309a021.
- [47] C. Dewaele, M. Verzele, Influence of the particle size distribution of the packing material in reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 260 (1983) 13–21. doi:10.1016/0021-9673(83)80002-8.
- [48] E. M. Renkin, Filtration, diffusion, and molecular sieving through porous cellulose membranes., *J. gen. Physiol* 38 (1954) 225–243.
- [49] D. C. Lommen, L. R. Snyder, Fast HPLC separations with small nonporous particles, *LC GC* 11 (1993) 222–232.
- [50] G. Jilge, K. Unger, U. Esser, H.-J. Schäfer, G. Rathgeber, W. Müller, Evaluation of advanced silica packings for the separation of biopolymers by high-performance liquid chromatography: VI. Design, chromatographic performance and application of non-porous silica-based anion exchangers, *J. Chromatogr. A* 476 (1989) 37–48. doi:10.1016/S0021-9673(01)93854-3.
- [51] K. Kalghatgi, C. Horváth, Rapid analysis of proteins and peptides by reversed-phase chromatography, *J. Chromatogr. A* 398 (1987) 335–339. doi:10.1016/S0021-9673(01)96522-7.
- [52] J. J. Kirkland, Superficially porous silica microspheres for the fast high-performance liquid chromatography of macromolecules, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1239–1245. doi:10.1021/ac00035a009.
- [53] R. Groh, Diplomarbeit, Universität des Saarlandes, 1975.
- [54] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, H. Zhang, Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1357 (2014) 36–52. doi:10.1016/j.chroma.2014.05.010.

- [55] S. Fekete, E. Oláh, J. Fekete, Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 57 – 71. doi:10.1016/j.chroma.2011.09.050.
- [56] C. Horvath, S. R. Lipsky, Column Design in High Pressure Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 7 (1969) 109–116. doi:10.1093/chromsci/7.2.109.
- [57] C. Horvath, S. R. Lipsky, Fast liquid chromatography. Investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers, *Anal. Chem.* 39 (1967) 1422–1428. doi:10.1021/ac60256a003.
- [58] J. J. Kirkland, Controlled surface porosity supports for high-speed gas and liquid chromatography, *Anal. Chem.* 41 (1969) 218–220. doi:10.1021/ac60270a054.
- [59] J. Kirkland, T. Langlois, J. DeStefano, Fused core particles for HPLC columns, *Am. Lab.* 39 (2007) 18–21.
- [60] J. Kirkland, F. Truszkowski, C. Dilks, G. Engel, Superficially porous silica microspheres for fast high-performance liquid chromatography of macromolecules, *J. Chromatogr. A* 890 (2000) 3 – 13. doi:10.1016/S0021-9673(00)00392-7.
- [61] J. O. Omamogho, J. P. Hanrahan, J. Tobin, J. D. Glennon, Structural variation of solid core and thickness of porous shell of 1.7 μm core-shell silica particles on chromatographic performance: Narrow bore columns, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1942 – 1953. doi:10.1016/j.chroma.2010.11.067.
- [62] F. Gritti, G. Guiochon, Diffusion models in chromatographic columns packed with fully and superficially porous particles, *Chem. Eng. Sci.* 66 (2011) 3773 – 3781. doi:10.1016/j.ces.2011.04.039.
- [63] F. Gritti, T. Farkas, J. Heng, G. Guiochon, On the relationship between band broadening and the particle-size distribution of the packing material in liquid chromatography: Theory and practice., *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8209 – 8221. doi:10.1016/j.chroma.2011.09.034.
- [64] F. Gritti, G. Guiochon, Theoretical investigation of diffusion along columns packed with fully and superficially porous particles, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 3476 – 3488. doi:10.1016/j.chroma.2011.03.063.

- [65] F. Gritti, G. Guiochon, The mass transfer kinetics in columns packed with halo-ES shell particles, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 907 – 921. doi:10.1016/j.chroma.2010.12.046.
- [66] F. Gritti, Fast LC-fast analytical chromatography and the role of the design of new stationary phases, *Am. Pharm. Rev.* 14 (2011) 26 – 33.
- [67] K. Kaczmarek, G. Guiochon, Modeling of the mass-transfer kinetics in chromatographic columns packed with shell and pellicular particles, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4648 – 4656. doi:10.1021/ac070209w.
- [68] K. Horváth, F. Gritti, J. N. Fairchild, G. Guiochon, On the optimization of the shell thickness of superficially porous particles, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6373 – 6381. doi:10.1016/j.chroma.2010.08.013.
- [69] F. Gritti, K. Horváth, G. Guiochon, How changing the particle structure can speed up protein mass transfer kinetics in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1263 (2012) 84–98. doi:10.1016/j.chroma.2012.09.030.
- [70] T. Alvarez-Segura, J. R. Torres-Lapasió, C. Ortiz-Bolsico, M. C. García-Alvarez-Coque, Stationary phase modulation in liquid chromatography through the serial coupling of columns: A review, *Anal. Chim. Acta* 923 (2016) 1–23. doi:10.1016/j.aca.2016.03.040.
- [71] C. Ortiz-Bolsico, J. R. Torres-Lapasió, M. C. García-Alvarez-Coque, Approaches to find complementary separation conditions for resolving complex mixtures by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1229 (2012) 180–189. doi:10.1016/j.chroma.2012.01.034.
- [72] T. Alvarez-Segura, C. Ortiz-Bolsico, J. R. Torres-Lapasió, M. C. García-Alvarez-Coque, Serial versus parallel columns using isocratic elution: A comparison of multi-column approaches in mono-dimensional liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1390 (2015) 95–102. doi:10.1016/j.chroma.2015.02.058.
- [73] H. J. Issaq, J. Gutierrez, Mixed packings in high performance liquid chromatography. II. Mixed packings vs. mixed ligands, *J. Liq. Chromatogr.* 11 (1988) 2851–2861. doi:10.1080/01483918808076765.
- [74] A. P. Halfpenny, P. R. Brown, Mixed mode chromatography via column switching for the simultaneous HPLC analysis of ionic and non-ionic nucleic acid constituents, *Chromatographia* 21 (1986) 317–320. doi:10.1007/BF02311602.

- [75] R. Nogueira, M. Lämmerhofer, W. Lindner, Alternative high-performance liquid chromatographic peptide separation and purification concept using a new mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange type stationary phase, *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 158–169. doi:10.1016/j.chroma.2005.06.093.
- [76] E. Ordoñez, J. Quintana, R. Rodil, R. Cela, Computer assisted optimization of liquid chromatographic separations of small molecules using mixed-mode stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1238 (2012) 91–104. doi:10.1016/j.chroma.2012.03.055.
- [77] S. P. Dixon, I. D. Pitfield, D. Perrett, Comprehensive multi-dimensional liquid chromatographic separation in biomedical and pharmaceutical analysis: a review, *Biomed. Chromatogr.* 20 (2006) 508–529. doi:10.1002/bmc.672.
- [78] P. Jandera, Comprehensive two-dimensional liquid chromatography – practical impacts of theoretical considerations. A review, *Cent. Eur. J. Chem.* 10 (2012) 844–875. doi:10.2478/s11532-012-0036-z.
- [79] P. Jandera, T. Hájek, M. Staňková, Monolithic and core-shell columns in comprehensive two-dimensional HPLC: a review., *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 139–151. doi:10.1007/s00216-014-8147-3.
- [80] J. Ma, X. Hou, B. Zhang, Y. Wang, L. He, The analysis of carbohydrates in milk powder by a new "heart-cutting" two-dimensional liquid chromatography method, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 91 (2014) 24–31. doi:10.1016/j.jpba.2013.11.006.
- [81] R. Shalliker, Two-dimensional HPLC analysis of oligostyrenes: Comprehensive and online heart-cutting techniques, *J. Sep. Sc.* 32 (2009) 2903–2911. doi:10.1002/jssc.200900175.
- [82] C. Milroy, G. Dennis, R. Shalliker, Targeted isolations from complex samples using two-dimensional HPLC. Part 1: Analytical scale analysis, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 35 (2012) 1481–1496. doi:10.1080/10826076.2011.619038.
- [83] C. Milroy, G. Dennis, R. Shalliker, Targeted isolations from complex samples using two-dimensional HPLC. Part 2: A semi-continuous heart cutting, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 35 (2012) 1921–1932. doi:10.1080/10826076.2011.627611.
- [84] J. L. Glajch, J. C. Gluckman, J. G. Charikofsky, J. M. Minor, J. J. Kirkland, Simultaneous selectivity optimization of mobile and stationary phases in

- reversed-phased liquid chromatography for isocratic separations of phenylthiohydantoin amino acid derivatives, *J. Chromatogr. A* 318 (1985) 23–39. doi:10.1016/S0021-9673(01)90661-2.
- [85] P. H. Lukulay, V. L. McGuffin, Solvent modulation in liquid chromatography: extension to serially coupled columns, *J. Chromatogr. A* 691 (1995) 171 – 185. doi:10.1016/0021-9673(94)01184-G.
- [86] F. Garay, Application of a flow-tunable, serially coupled gas chromatographic capillary column system for the analysis of complex mixtures, *Chromatographia* 51 (2000) 108 – 120. doi:10.1007/BF02492792.
- [87] K. Chen, F. Lynen, M. D. Beer, L. Hitzel, P. Ferguson, M. Hanna-Brown, P. Sandra, Selectivity optimization in green chromatography by gradient stationary phase optimized selectivity liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7222–7230. doi:10.1016/j.chroma.2010.09.029.
- [88] S. Fekete, S. Codesido, S. Rudaz, D. Guillarme, K. Horváth, Apparent efficiency of serially coupled columns in isocratic and gradient elution modes, *J. Chromatogr. A* 1571 (2018) 121 – 123. doi:10.1016/j.chroma.2018.08.002.
- [89] E. Deconinck, A. Kamugisha, P. van Campenhout, P. Courselle, J. O. De Beer, Development of a stationary phase optimised selectivity liquid chromatography based screening method for adulterations of food supplements for the treatment of pain, *Talanta* 138 (2015) 240–246. doi:10.1016/j.talanta.2015.03.010.
- [90] B. Sreedhar, A. Seidel-Morgenstern, Preparative separation of multi-component mixtures using stationary phase gradients, *J. Chromatogr. A* 1215 (2008) 133–144. doi:10.1016/j.chroma.2008.11.003.
- [91] Y. Chu, I. Wainer, Determination of the enantiomers of verapamil and norverapamil in serum using coupled achiral-chiral high-performance liquid, *J. Chromatogr. B* 497 (1989) 191–200. doi:10.1016/0378-4347(89)80018-0.
- [92] D. Johnson, I. Wainer, Enantioselective separation of cyclic chiral ketones and their corresponding diastereomeric alcohols by HPLC on chiral and chiral/chiral coupled stationary phases, *Chirality* 8 (1996) 551–555. doi:10.1002/(SICI)1520-636X(1996)8:8<551::AID-CHIR3>3.0.CO;2-C.
- [93] R. Ferretti, B. Gallinella, F. L. Torre, L. Zanitti, Direct resolution of a new antifungal agent, voriconazole (UK-109,496) and its potential impurities, by use of coupled achiral-chiral high-performance liquid chromatography, *Chromatographia* 47 (1998) 649–654. doi:10.1007/BF02467448.

- [94] K. H. Kim, H. J. Kim, J. Kang, W. Mar, Determination of metoprolol enantiomers in human urine by coupled achiral-chiral chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22 (2000) 377–384. doi:10.1016/S0731-7085(99)00279-4.
- [95] R. Sardella, M. Lämmerhofer, B. Natalini, W. Lindner, In-line coupling of a reversed phase column to cope with limited chemoselectivity of a quinine carbamate-based anion-exchange type chiral stationary phase, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1702–1711. doi:10.1002/jssc.200800058.
- [96] J. Giddings, *Unified Separation Science*, Wiley, New York, 1991.
- [97] L. M. Blumberg, Limits of resolution and speed of analysis in linear chromatography with and without focusing, *Chromatographia* 39 (1994) 719–728. doi:10.1007/BF02274589.
- [98] L. M. Blumberg, Variance of a zone migrating in a linear medium: II. Time-varying non-uniform medium, *J. Chromatogr. A* 637 (1993) 119 – 128. doi:10.1016/0021-9673(93)83204-6.
- [99] S. Codesido, S. Rudaz, D. Guillarme, K. Horváth, S. Fekete, Apparent efficiency of serially coupled columns in gradient elution liquid chromatography: Extension to the combination of any column formats, *J. Chromatogr. A* 1588 (2019) 159–162. doi:10.1016/j.chroma.2018.12.037.
- [100] S. Codesido, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, G. Desmet, S. Fekete, Impact of particle size gradients on the apparent efficiency of chromatographic columns, *J. Chromatogr. A* 1603 (2019) 208–2015. doi:10.1016/j.chroma.2019.06.048.
- [101] E. Blasius, W. Adrian, K.-P. Janzen, G. Klautke, Darstellung und eigenschaften von austauschern auf basis von kronenverbindungen, *J. Chromatogr. A* 96 (1974) 89 – 97. doi:10.1016/S0021-9673(01)81221-8.
- [102] T. Takayanagi, I. Ikeda, S. Motomizu, Analysis of complex formation between crown ethers and potassium ion by determining retention factors in reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 932 (2001) 165 – 170. doi:10.1016/S0021-9673(01)01248-1.
- [103] T. Okada, Nonaqueous anion-exchange chromatography II. Changing anion-exchange selectivity by resin surface complex formation of crown ethers, *J. Chromatogr. A* 758 (1) (1997) 29 – 35. doi:10.1016/S0021-9673(96)00711-X.

- [104] J. Weiss, Handbook of Ion Chromatography, 3rd edition, WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim, 2004.
- [105] J. D. Lamb, R. G. Smith, Application of macrocyclic ligands to ion chromatography, *J. Chromatogr. A* 546 (1991) 73 – 88. doi:10.1016/S0021-9673(01)93007-9.
- [106] J. D. Lamb, R. G. Smith, J. Jagodzinski, Anion chromatography with a crown ether-based stationary phase and an organic modifier in the eluent, *J. Chromatogr. A* 640 (1993) 33 – 40. doi:10.1016/0021-9673(93)80165-5.
- [107] E. Blasius, K. P. Janzen, Ion chromatography and catalysis of organic reactions using polymers with cyclic polyethers as anchor groups, *Israel. J. Chemistry* 26 (1985) 25–34. doi:10.1002/ijch.198500064.
- [108] L. W. Lim, K. Tokunaga, T. Takeuchi, Development of chemically bonded crown ether stationary phases in capillary ion chromatography, *Chromatography* 35 (2014) 95–101. doi:10.15583/jpchrom.2014.012.
- [109] M. A. Rey, C. A. Pohl, J. J. Jagodzinski, E. Q. Kaiser, J. M. Riviello, A new approach to dealing with high-to-low concentration ratios of sodium and ammonium ions in ion chromatography, *J. Chromatogr. A* 804 (1998) 201 – 209. doi:10.1016/S0021-9673(97)01271-5.
- [110] J. Strzelbicki, B. Strzelbicka, K. Schügerl, R. A. Bartsch, Crown ethers in separation of alkali metal cations 7 (1992) 1523 – 1528. doi:10.1016/B978-0-444-88677-4.50070-2.
- [111] S. A. Oehrle, Controlled changes in selectivity of cation separations by capillary electrophoresis using various crown-ether additives, *J. Chromatogr. A* 745 (1996) 87 – 92. doi:10.1016/0021-9673(96)00187-2.
- [112] J. D. Lamb, R. G. Smith, R. C. Anderson, M. K. Mortensen, Anion separations on columns based on transition metal-macrocyclic complex exchange sites, *J. Chromatogr. A* 671 (1) (1994) 55 – 62. doi:10.1016/0021-9673(94)80221-1.
- [113] J. D. Lamb, P. A. Drake, Chemically suppressed anion chromatography based on macrocycle—cation complexation, *J. Chromatogr. A* 482 (1989) 367 – 380. doi:10.1016/S0021-9673(01)83925-X.
- [114] A. Woodruff, C. A. Pohl, A. Bordunov, N. Avdalovic, Adjustable-capacity anion-exchange separator, *J. Chromatogr. A* 956 (2002) 35 – 41. doi:10.1016/S0021-9673(01)01577-1.

- [115] M. C. Bruzzoniti, R. M. D. Carlo, K. Horvath, D. Perrachon, A. Prella, R. Tófalvi, C. Sarzanini, P. Hajós, High performance ion chromatography of haloacetic acids on macrocyclic cryptand anion exchanger, *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 188 – 196. doi:10.1016/j.chroma.2008.02.028.
- [116] D. Lukács, K. Horváth, P. Hajós, Development of retention mechanism for the separation of carboxylic acids and inorganic anions in cryptand-based ion chromatography, *J. Chromatogr. A* 1621 (2020) 461066. doi:10.1016/j.chroma.2020.461066.
- [117] S. J. Chen, J. S. Shih, The application of cryptand 22 as a bifunctional stationary phase for ion chromatography, *J. Chin. Chem. Soc.* 38 (1991) 211–216. doi:10.1002/jccs.199100036.
- [118] A. Yamamoto, S. Kodama, A. Matsunaga, Y. Inoue, T. Aoyama, Y. Kumagai, Characteristics of a column suitable for capacity gradient chromatography with a borate eluent, *The Analyst* 126 (2001) 465–468. doi:10.1039/B008478F.
- [119] C. Bo, X. Wang, C. Wang, Y. Wei, Preparation of hydrophilic interaction/ion-exchange mixed-mode chromatographic stationary phase with adjustable selectivity by controlling different ratios of the co-monomers, *J. Chromatogr. A* 1487 (2017) 201 – 210. doi:10.1016/j.chroma.2017.01.061.
- [120] V. Pucci, M. A. Raggi, J. M. Svec, F. Fréchet, Monolithic columns with a gradient of functionalities prepared via photoinitiated grafting for separations using capillary electrochromatography, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 779–788. doi:10.1002/jssc.200401828.
- [121] A. V. Forzano, C. N. Cain, S. C. Rutan, M. M. Collinson, In situ silanization for continuous stationary phase gradients on particle packed LC columns, *Anal. Methods* 11 (2019) 3648–3656. doi:10.1039/C9AY00960D.
- [122] C. N. Cain, A. V. Forzano, S. C. Rutan, M. M. Collinson, Destructive stationary phase gradients for reversed-phase/hydrophilic interaction liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1570 (2018) 82 – 90. doi:10.1016/j.chroma.2018.07.073.
- [123] S. Horváth, F. Gritti, K. Horváth, Theoretical study of the efficiency of liquid chromatography columns with particle size gradient, *J. Chromatogr. A* 1651 (2021) 462331. doi:10.1016/j.chroma.2021.462331.
- [124] C. A. Pohl, Preparation of ion exchange columns with longitudinal stationary phase gradients, *Heliyon* 7 (2021) e06961. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e06961.

- [125] J. A. Nelder, R. Mead, A Simplex Method for Function Minimization, *The Computer Journal* 7 (1965) 308–313. doi:10.1093/comjnl/7.4.308.
- [126] K. Horváth, P. Hajós, Retention profiles and mechanism of anion separation on latex-based pellicular ion exchanger in ion chromatography, *J. Chromatogr. A* 1104 (1) (2006) 75–81. doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.064.
- [127] R. Ohmacht, I. Kiss, Application of a New Non-Porous Stationary Phase (Kovasil-H) for the Fast Separation of Peptides by HPLC, *Chromatographia* 42 (9-10) (1996) 595–598. doi:10.1007/BF02290299.
- [128] C. Kulsing, Y. Yang, C. Munera, C. Tse, M. T. Matyska, J. J. Pesek, R. I. Boyesen, M. T. Hearn, Correlations between the zeta potentials of silica hydride-based stationary phases, analyte retention behaviour and their ionic interaction descriptors, *Anal. Chim. Acta* 817 (2014) 48–60. doi:10.1016/j.aca.2014.01.054.
- [129] P. Forssén, E. Multia, J. Samuelsson, M. Andersson, T. Aastrup, S. Altun, D. Wallinder, L. Wallbing, T. Liangsupree, M.-L. Riekkola, T. Fornstedt, Reliable strategy for analysis of complex biosensor data, *Anal. Chem.* 90 (8) (2018) 5366–5374. doi:10.1021/acs.analchem.8b00504.
- [130] E. Kučera, Contribution to the theory of chromatography: Linear non-equilibrium elution chromatography, *J. Chromatogr. A* 19 (1965) 237–248. doi:10.1016/S0021-9673(01)99457-9.
- [131] K. Kaczmariski, G. Guiochon, Modeling of the mass-transfer kinetics in chromatographic columns packed with shell and pellicular particles, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4648. doi:10.1021/ac070209w.
- [132] A. Cavazzini, F. Gritti, K. Kaczmariski, N. Marchetti, G. Guiochon, Mass-transfer kinetics in a shell packing material for chromatography, *Anal. Chem.* 79 (2007) 5972. doi:10.1021/ac070571a.
- [133] S. Fekete, R. Berky, J. Fekete, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Evaluation of a new wide pore core–shell material (AerisTM WIDEPORE) and comparison with other existing stationary phases for the analysis of intact proteins, *J. Chromatogr. A* 1236 (2012) 177–188. doi:10.1016/j.chroma.2012.03.018.
- [134] H. Poppe, J. Paanakker, M. Bronckhorst, Peak width in solvent-programmed chromatography: I. General description of peak broadening in solvent-programmed elution, *J. Chromatogr. A* 204 (1981) 77–84. doi:10.1016/S0021-9673(00)81641-6.

- [135] J. Kozeny, Ueber kapillare leitung des wassers im boden, Sitzungsber Akad. Wiss., Wien 136(2a) (1927) 271 – 306.
- [136] P. Carman, Fluid flow through granular beds, Chem. Eng. Res. Des. 75 (1997) S32 – S48. doi:10.1016/S0263-8762(97)80003-2.
- [137] R. Rezanavaz, 3D printing of porous polymeric materials for stationary phases of chromatography columns, University of Canterbury, 2018. doi:10.26021/1788.
- [138] U. Simon, S. Dimartino, Direct 3D printing of monolithic ion exchange adsorbers, J. Chromatogr. A 1587 (2019) 119 – 128. doi:10.1016/j.chroma.2018.12.017.
- [139] M. G. Moleirinho, S. Feast, A. S. Moreira, R. J. Silva, P. M. Alves, M. J. Carrondo, T. Huber, C. Fee, C. Peixoto, 3D-printed ordered bed structures for chromatographic purification of enveloped and non-enveloped viral particles, Sep. Purif. Technol. 254 (2021) 117681. doi:10.1016/j.seppur.2020.117681.
- [140] S. Couck, J. Lefevre, S. Mullens, L. Protasova, V. Meynen, G. Desmet, G. V. Baron, J. F. Denayer, CO₂, CH₄ and N₂ separation with a 3DFD-printed ZSM-5 monolith, Chem. Eng. J. 308 (2017) 719 – 726. doi:10.1016/j.cej.2016.09.046.
- [141] U. Kalsoom, P. N. Nesterenko, B. Paull, Current and future impact of 3D printing on the separation sciences, Trends Anal. Chem. 105 (2018) 492 – 502. doi:10.1016/j.trac.2018.06.006.
- [142] K. Horváth, J. N. Fairchild, K. Kaczmarski, G. Guiochon, Martin-Synge algorithm for the solution of equilibrium-dispersive model of liquid chromatography, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 8127 – 8135. doi:10.1016/j.chroma.2010.10.035.
- [143] P. Jandera, J. Churáček, Gradient elution in liquid chromatography: II. Retention characteristics (retention volume, band width, resolution, plate number) in solvent-programmed chromatography — theoretical considerations, J. Chromatogr. A 91 (1974) 223 – 235. doi:10.1016/S0021-9673(01)97902-6.

Tézispontok

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

Thesis

1. Bi-layer liquid chromatography stationary phase particles provide higher separation efficiency compared to conventional shell phases when the retention or pore diffusion of the outer layer is higher than that of the inner layer. In this way, the double layer grain structure can increase the column efficiency by 15-20%.
2. In gradient elution mode, columns with a negative - i.e. decreasing - particle size gradient towards the end of the column show an efficiency increase of $\sim 1-4\%$ compared to columns with constant particle size and the same permeability, due to the extra band compression effect, depending on the particle size gradient profile. By optimizing the boundary particle sizes, this advantage can be further increased up to $\sim 5-8\%$.
3. The developed isotherm-free inverse method for determining isotherms, in which the derivative of spline fitted to the isotherm points is used instead of the isotherm equation in the mass balance equation of the Martin-Synge algorithm, can be used to isotherm determination with an accuracy comparable to that of the frontal analysis.
4. By combining an ion exchange capacity gradient with an eluent concentration gradient, an increase in efficiency can be achieved compared to a column with a constant ion exchange capacity for the same analysis time. This increase in efficiency is manifested through an increase in the difference in retention times and a decrease in bandwidths.

A szerző tudományos munkássága

I. Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó publikációk

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

II. Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó konferencia előadások és poszterek

Nemzetközi konferencián bemutatott előadások és poszterek

1. **Szabolcs Horváth**, Fabrice Gritti, Krisztián Horváth: Effect of multi porous layer on the efficiency of core-shell particles, 24TH International Symposium on Separation Sciences : ISSS (2018), 17-20 June 2018, Jasná, Slovakia
2. **Szabolcs Horváth**, Evelin Farsang, Krisztián Horváth : Theoretical study of the efficiency of HPLC columns with particle size gradient, 48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 16-20 June 2019, Milan, Italy

3. Krisztián Horváth, **Szabolcs Horváth** : Applicability and Efficiency of Gradient Stationary Phases in HPLC, 12th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 11-13 September 2019, Siófok, Hungary
4. Krisztián Horváth, **Szabolcs Horváth** : Design and Optimization of Capacity Gradient Stationary Phases, 33rd International Symposium on Chromatography: ISC 2022, 18-22 September 2022, Budapest, Hungary

III. Az értekezés tématerületét érintő publikációk

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

IV. Az értekezés tématerületét érintő konferencia előadások és posztterek

Nemzetközi konferencián bemutatott előadások és posztterek

1. Evelin Farsang, **Szabolcs Horváth**, Krisztián Horváth: Study of retention behavior of bioactive macromolecules in ultrahigh pressure liquid chromatography, 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques: HPLC 2017, 18-22 June 2017, Prague, Czech Republic
2. Evelin Farsang, **Szabolcs Horváth**, Krisztián Horváth: The effect of axial temperature and pressure gradients on the separation efficiencies of macromolecules, 24th International Symposium on Separation Sciences : ISSS (2018), 17-20 June 2018, Jasná, Slovakia
3. Evelin Farsang, **Szabolcs Horváth**, Regina Törőcsik, Márton Szigeti, András Guttman, Krisztián Horváth: Development of HILIC Method for Liquid Chromatographic Separation of Maltodextrins with UV Detection, 9th International Symposium on the Separation and Characterization of Natural and Synthetic Macromolecules, 30 January-1 February 2019, Amsterdam, Netherlands
4. **Szabolcs Horváth**, Krisztián Horváth: Qualitative interpretation of retention behaviour of proteins under UHPLC condition, 12th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 11-13 September 2019, Siófok, Hungary

Hazai konferencián bemutatott előadások és posztterek

1. Horváth Krisztián, **Horváth Szabolcs**, Farsang Evelin, Surguta Miklós, Lukács Diána: Axiális hőmérséklet gradiens hatása kromatográfiás elválasztások hatékonyságára, Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2016, 2016 november 9-11, Kesztemét, Magyarország

2. **Horváth Szabolcs**, Törőcsik Regina, Szigeti Márton, Guttman András, Horváth Krisztián: HILIC módszer fejlesztése maltodextrinek folyadékkromatográfiás elválasztására UV detektálás alkalmazásával, Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2018, 2018 november 8-10, Tapolca, Magyarország

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Horváth Krisztián egyetemi docensnek, amiért bevezetett a tudományos életbe és mindenben számíthattam a segítségére.

Köszönöm Dr. Hajós Péter, Dr. Lukács Diána és Dr. Farsang Evelin tanácsait a dolgozat szerkesztésére vonatkozóan és a szakmai segítséget. Köszönöm továbbá az Analitikai Kémia Intézeti Tanszék valamennyi dolgozójának és hallgatójának a támogatást és az együtt töltött időt.

Hálámat fejezem ki családomnak és barátaimnak, akik mindvégig segítettek és hittek bennem.

Veszprém, 2023

Horváth Szabolcs