

PANNON EGYETEM

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

LUKÁCS DIÁNA

2019

**KOMPLEX EGYENSÚLYI ÉS HATÉKONYSÁGI
PARAMÉTEREK VIZSGÁLATA AZ ION- ÉS
FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁBAN**

Doktori (PhD) értekezés

DOI:10.18136/PE.2019.716

Készítette:

Lukács Diána

okleveles környezetmérnök

Témavezető:

Dr. Hajós Péter, egyetemi docens

Dr. Horváth Krisztián, egyetemi docens

Készült a Pannon Egyetem
Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskolája keretében

Pannon Egyetem
Mérnöki Kar
Analitikai Kémia Intézeti Tanszék



Veszprém
2019

**KOMPLEX EGYENSÚLYI ÉS HATÉKONYSÁGI PARAMÉTEREK
VIZSGÁLATA AZ ION- ÉS FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁBAN**

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében

Írta:
Lukács Diána

Készült a Pannon Egyetem Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Dr. Hajós Péter

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....

témavezető

Témavezető: Dr. Horváth Krisztián

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....

témavezető

A jelölt a doktori szigorlaton%-ot ért el,
Veszprém,

.....

a Szigorlati Bizottság elnöke

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló: Dr. Idei Miklós igen /nem

.....

bíráló

Bíráló: Nagyné Dr. Szabó Andrea igen /nem

.....

bíráló

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

.....

a Bíráló Bizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése.

.....

az EDHT elnöke

Kivonat

Komplex egyensúlyi és hatékonysági paraméterek vizsgálata az ion- és folyadékkromatográfiában

A munka célja a folyadékkromatográfia – mint az egyik legintenzívebben fejlődő analitikai módszer – területéhez tartozó alap kutatások eredményeinek bővítése.

Az "Irodalmi összefoglaló" a kromatográfiai módszerek, alapfogalmak és elválasztások (lineáris- ill. ioncsere-kromatográfia) elméletének bemutatása mellett kitér a folyadékkromatográfiai kolonnák legfőbb fizikai és kémiai tulajdonságaira. A mérési körülmények, eszközök, anyagok és az adatok feldolgozásának matematikai ill. szoftveres háttere a "Kísérleti rész"-ben található.

A Jelölt az oszloptöltetek szemcseméret eloszlás (PSD) hatásának, kolonnatöltés minőségétől független, gyors, készülék- és oldószermentes vizsgálatára az általános sebességi modellt használja fel. Az elválasztási hatékonyság PSD függését eltérő szemcse szerkezetek és molekulaméret tartományok esetében vizsgálja. Megállapítja, hogy a tömörmagvú fázisok szűkebb PSD-je hozzájárul az ezen fázisokkal töltött oszlopok megnövekedett hatékonyságához, különösen nagyméretű molekulák esetén.

A Jelölt az oszlopbeli nyomásesés elválasztásra gyakorolt hatását a Gibbs-féle szabadentalpia egyenlet és az egyensúlyi-diszperzív modell segítségével vizsgálja. Rámutat, hogy a nyomásesés és a komponens moláris adszorpciós térfogatváltozása a retenció tényező és a vándorlási sebesség mellett, a hatékonysági paraméterek alakulására is befolyással van, mely hatás nagyméretű molekulák UHPLC elválasztása során nem hagyható figyelmen kívül. Számításokkal igazolja továbbá, hogy az oszlopbeli sávszélesedést a komponensek megnövekedett kilépési sebessége részben vagy teljes mértékben kompenzálhatja.

A dolgozat további része a komplexképződés ioncsere-kromatográfiai szerepével foglalkozik. A Jelölt Gd(III)-kelátok, szerves és szervetlen mátrixionok retenciójának egyensúlyi folyamatait vizsgálja latex anioncserélőn. Modellt vezet le a komponensek mozgófázis koncentráció/pH függő retenciójának előrejelzésére, és mintaelőkészítési eljárást dolgoz ki a mátrixalkotók eltávolítására. A Jelölt n-decil-2.2.2-kriptand csoportokkal funkcionizált anioncserélőn vizsgálja karboxilátok és szervetlen anionok retenció viselkedését. Modellt vezet le többértékű, protonálható anionok mozgófázis ionerősség/fémiontartalom függő retenciójának előrejelzésére. Vizsgálja a kriptand fázison történő visszatartás termodinamikai jellemzőit, valamint módszerfejlesztési lehetőségeit.

Abstract

Investigation of complex equilibria and efficiency parameters in ion and liquid chromatography

The aim of this work is to broaden the results of basic research in the field of liquid chromatography as one of the most intensively developing analytical methods.

In the "Literature review", the chromatographic methods, basic concepts, the theory of separations, the physical and chemical properties of liquid chromatographic columns are discussed. The measurement conditions, devices, chemicals in addition the mathematical tools and software to data processing can be found in the "Experimental" section.

The effect of particle size distribution (PSD) of the column packing on the chromatographic efficiency was studied by the use of the general rate model. This approach offered a fast and non-instrumental method that eliminates the effects of solvents and quality of packing process. The dependency of separation efficiency on PSD is examined in case of different particle-structures and various range of molecular sizes. It is confirmed that the narrower PSD core-shell phases contribute to the high efficiency of columns packed by these phases. This effect is particularly significant for large molecules.

The effect of column pressure on separation efficiency is studied by using the Gibbs free energy equation and the equilibrium-dispersive model. It is observed, that the pressure drop and the variation of molar adsorption volume of analyte affect not only the retention factor and the linear migration velocity but those also decrease the efficiency. This effect is not negligible for separation of macromolecules under UHPLC conditions. It is proved by mathematical calculations that the increase of bandwidth in the column can be compensated partially or fully by the elevated release velocity of compounds.

The rest of the work focuses on the role of complex formation reactions in ion exchange chromatography. The equilibrium processes that stay behind the retention mechanism of Gd(III)-chelates, inorganic and organic matrix ions, on latex-based resin are studied. A model is developed for predicting the retention of analytes at different concentrations and pHs of mobile phase. Furthermore a sample preparation method is developed to reduce the level of interfering matrix ions. The retention behaviour of carboxylates and inorganic anions are investigated on anion exchanger functionalized with n-decyl-2.2.2-cryptand ligands. A mathematical model is developed to predict the retention factors of multivalent and protonable anions eluted at various ionic strengths and metal ion contents of mobile phase. The retention on cryptand-based anion exchanger is studied from a thermodynamic point of view. The possibilities of method development are examined.

Kurzfassung

Untersuchung komplexer Gleichgewichts- und Effizienzparameter in der Ionen- und Flüssigkeitschromatographie

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Ergebnisse der Grundlagenforschung der Flüssigkeitschromatographie – als eine intensivsten entwickelnde analytische Methode – zu erweitern.

Die "Literaturübersicht" enthält eine Beschreibung von chromatographische Methoden, Grundlegende Begriffe, Trennungstheorien, und wichtigsten physikalischen, chemischen Eigenschaften von Flüssigchromatographiesäulen. Die Messbedingungen, Geräte, Materialien, und mathematische Hintergrund sind im "Experimenteller Teil" beschrieben.

Die Wirkung der Partikelgrößenverteilung (PSD) der Säulen wurde durch das allgemeine Geschwindigkeitsmodell untersucht. Die Effekt der PSD für die chromatographische Effizienz wurde erforscht für verschiedene Partikelstrukturen und molekularer Größenbereich. Es wurde gefunden, dass die Fused-Core-Partikeln verfügen enge PSD und dadurch mit ihrer Verwendung wird eine höhere Effizienz erreicht im Vergleich zu die vollständig porösen Partikeln, speziell für große Moleküle.

Die Effekte des Druckabfall in der Säule wurde durch die Gibbs-Energie Gleichung und das Gleichgewichts-Dispersions-Modell untersucht. Es wurde gefunden, dass der Druckabfall und molare Volumenänderung beeinflusst der Retention, Migrationsgeschwindigkeit und Effizienzparametern, weiterhin dieser Effekt kann bei der UHPLC-Trennung von großen Moleküle nicht ignoriert werden. Berechnungen zeigen auch, dass die Geschwindigkeitsgradient durch Druckabfall kann die Bandenverbreiterung kompensieren.

Die nächsten Teil die These beschreibt die Rolle der Komplexbildung in der Ionenaustauschchromatographie. Die Gleichgewichtsprozesse der Retention von Gd(III)-Chelaten und anorganische, organische Matrixanionen auf einer latexbasierte Anionenaustauscher wurde untersuchen. Ein Modell für Vorhersagen der Retention bei variable Konzentrationen/pH-Wert der mobile Phase, sowie eine Probenvorbereitung Methode für Matrixkomponente zu entfernen wurde entwickelt. Der Autor untersucht die Retentionsverhalten die Carbonsäure- und anorganische Anionen auf einer Anionenaustauscher funktionalisierte mit Kryptand-Gruppen. Es wird Modelle für Vorhersagen der Retention – unter isokratischer und Gradientenelution – bei variable Ionenstärke, Metallionengehalt und Methanolgehalt der mobile Phase beschreibt für mehrwertige und protonierungsfähige Ionen.

Tartalomjegyzék

Bevezetés	1
Célkitűzés	2
1. Irodalmi összefoglaló	4
1.1. Kromatográfiás módszerekről általánosságban	4
1.1.1. Folyadékkromatográfiás módszerek csoportosítása	5
1.1.2. Ionkromatográfiás módszerek csoportosítása	6
1.2. Folyadékkromatográfiás alapfogalmak, hatékonysági paraméterek	7
1.3. Folyadékkromatográfiás elválasztások elmélete	11
1.3.1. Elméleti modellek a lineáris kromatográfiában	12
1.3.1.1. Egyensúlyi-diszperzív modell	14
1.3.1.2. A kromatográfia általános sebességi modellje	14
1.3.1.3. A retenció termodinamikai alapjai	18
1.3.2. Retenciós elméletek az ioncsere-kromatográfiában	20
1.3.2.1. Lineáris oldószererősségi modell	21
1.3.2.2. Hoover modell, kettős eluens modell és bővített kettős eluens modell	22
1.3.2.3. Többszörös eluens/minta modell	23
1.3.2.4. Latex modell	24
1.3.2.5. Kriptand modell	24
1.3.2.6. Retenció leírása gradiens ioncsere-kromatográfiában	26
1.4. Folyadékkromatográfiás kolonnák jellemzése	28
1.4.1. Folyadékkromatográfiás oszloptöltetek fizikai szerkezete	28
1.4.2. Folyadékkromatográfiás oszloptöltetek kémiai szerkezete	32
2. Kísérleti rész	36
2.1. Felhasznált eszközök, anyagok	36
2.1.1. Gadolínium-kelátok szerves és szervesetlen mátrixban való elválasztása latex-alapú anioncserélő állófázison	36
2.1.1.1. Alkalmazott berendezések, eszközök	36
2.1.1.2. Alkalmazott oszlopok	36
2.1.1.3. Alkalmazott vegyszerek	37

2.1.2.	Karboxilátok és szervesetlen anionok elválasztása makrociklus alapú anioncserélő állófázison	38
2.1.2.1.	Alkalmazott berendezések, eszközök	38
2.1.2.2.	Alkalmazott oszlopok	38
2.1.2.3.	Alkalmazott vegyszerek	38
2.2.	Adatfeldolgozás, paraméterillesztés	39
3.	Eredmények	40
3.1.	Állófázis szemcseméret eloszlás hatásának vizsgálata a folyadékkromatográfiás hatékonyságra	40
3.1.1.	Lokális tányérmagasság eloszlás matematikai leírása	41
3.1.2.	Szemcseméret eloszlás hatása az oszlop hatékonyságára	43
3.2.	Oszlopbeli nyomásviszonyok retencióra és hatékonyságra gyakorolt hatásának vizsgálata	48
3.2.1.	A retenció alakulása az oszlopbeli nyomásesés függvényében	48
3.2.2.	Elválasztási hatékonyság nyomásgradiens esetén	50
3.3.	Mintaoldatbeli komplexképződésen alapuló anioncsere-kromatográfiás elválasztások vizsgálata gadolínium-kelátok példáján	56
3.3.1.	Protonálódási és komplexképződési egyensúlyi folyamatok leírása	56
3.3.2.	A kromatográfiás módszer jellemzése, retenciós adatbázis felvétele	60
3.3.3.	Mintakomponensek és mátrixionok retencióját leíró modell levezetése, alkalmazása	63
3.3.4.	Mátrixhatások csökkentésére szolgáló mintaelőkészítési eljárás kidolgozása és minősítése	68
3.4.	Állófázisbeli komplexképződésen alapuló anioncsere-kromatográfiás karbonsav elválasztások kriptand-funkcionalizált tölteteken	72
3.4.1.	Komponensek retenciójának leírása kriptand típusú állófázis esetén	74
3.4.1.1.	Bővített kriptand retenciós modell levezetése	74
3.4.1.2.	Bővített kriptand retenciós modell alkalmazása	76
3.4.2.	Komponensek kriptand állófázison való megkötődésének termodinamikai jellemzése	83
3.4.3.	Koncentráció- és kapacitásgradiensek kriptand típusú állófázison való alkalmazása	85
3.4.3.1.	Koncentrációgradiens kriptand típusú állófázison való alkalmazása	85
3.4.3.2.	Kapacitásgradiens kriptand típusú állófázison való alkalmazása	87
3.4.4.	Szerves oldószer, mint ioncsere-kromatográfiás eluensmódosító használata kriptand típusú állófázis esetén	89
4.	Összefoglalás	93

Irodalomjegyzék	97
Tézispontok	i
Theses	iii
A szerző tudományos munkássága	v
I. Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó közlemények	v
II. Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó konferencia előadások és poszterek	v
III. Az értekezés tématerületét érintő konferencia előadások és poszterek . . .	vii
Köszönetnyilvánítás	ix
Függelék	x

Jelölésjegyzék

α	szelektivitási tényező	Δt_{inj}	injektálás alatt eltelt idő
A_S	aszimmetria faktor	Δt_{out}	kromatogramon megjelenő csúcs szélessége
$A_{S_{0,1}}$	csúcsmagasság 10%-ánál mért aszimmetria faktor	ΔV_m	moláris térfogatváltozás
β	szemcseszerkezetet leíró segédparaméter	Δz	oszlopmenti vándorlás elemi lépéseinek hossza
b_g	gradiens faktor	Δz_{in}	mintadugó kezdeti szélessége
B_g	normalizált gradiens meredekség	Δz_{out}	oszlopból kilépő sáv szélessége
c_0	kezdeti mozgófázis koncentráció	D_L	axiális diszperziós koefficiens
c_{inj}	injektálási profil	D_m	molekuláris diffúziós tényező
c_m	mozgófázisbeli koncentráció (C)	d_p	kolonna töltetszemcse átmérő
c_{max}	maximális mozgófázis koncentráció	D_p	pórusbeli diffúziós koefficiens
c_n	koncentráció az „n”-edik tányéron	d_{pore}	töltetszemcse pórusátmérő
C_p	pórusbeli koncentráció	E	mért és számított detektorjelek közötti eltérés
C_p^*	egyensúlyi pórusbeli koncentráció	E_m	mozgófázisbeli ellenion koncentráció
c_s	állófázisbeli koncentráció (C_s)	ϵ	töltet teljes porozitása
c_{tot}	mozgófázis összkoncentráció	ϵ_e	oszlop (szemcséken kívüli) porozitás
D_A	mintaanion megoszlási hányadosa	ϵ_p	töltetszemcse belső porozitása
$D_{a,i}$	látszólagos diszperziós koefficiens	η	mozgófázis viszkozitása
d_c	kolonna átmérő	F	fázisarány
δ_{ax}	axiális diszperzióra vonatkozó tag	f_H	lokális tányérmagasságok valószínűségi sűrűségfüggvénye
δ_d	pórusbeli diffúzióra vonatkozó tag	f_{rp}	töltet szemcseméretét leíró valószínűségi sűrűségfüggvény
Δ^*G	szabadentalpia változás a homológ sor egyes tagjai között	γ_e	töltetágy gátlási faktora
ΔE	belső energia változás	γ_p	szemcsébéli pórusok gátlási faktora
δ_f	külső anyagtranszportot leíró tag	H	tányérmagasság
ΔG_0	reakció szabadentalpia változása a homológ sor első tagjára vonatkozóan	H_0	nulla szórással jellemezhető eloszlásra számított tányérmagasság
Δp	nyomásesés a kolonna mentén		

H_{col}	átlagos lokális tényérmagasság	m	kalibrációs mérőgörbe meredeksége
h_{eddy}	örvénydiffúziós koeficiens	M_0	oszlopból kilépő sávprofil nulladik momentuma
H_{rel}	relatív tényérmagasság	M_n	oszlopból kilépő sávprofil „n”-edik momentuma
H_σ	adott „ σ ” szórású eloszlásra számított tényérmagasság	μ_0	nulladik momentum (csúcsterület)
k	retenciós tényező	μ_1	első abszolút momentum (retenciós idő)
k'	retenciós tényező szerves oldószer tartalmú mozgófázis esetén	$\bar{\mu}_2$	második centralizált momentum (csúcsvariancia)
k_0	retenciós tényező nulla nyomásra vonatkozó értéke	μ_n	„n”-edik abszolút vagy normalizált momentum
k'_0	retenciós tényező szerves oldószer mentes mozgófázis esetén	$\bar{\mu}_n$	„n”-edik centralizált momentum
$k_{0,g}$	gradiens retenciós tényező kezdeti értéke	μ_{r_p}	töltet szemcseméretét jellemző log-normális eloszlás várható értéke
k_a	adszorpció sebességi állandója	n	mérési pontok száma
K_a	adszorpció egyensúlyi állandója	N	tányérszám
K_{a1}	első savi disszociációs állandó	$N_{i,z}$	„i”-edik komponens tömegárama a kolonna „z”-edik pontjában
K_{a2}	második savi disszociációs állandó	n_c	csúcskapacitás
$K_{A/E}$	ioncsere-egyensúlyi állandó	n_i	szénatomszám
k_{back}	sáv végének retenciós tényezője	N_{init}	kezdeti tányérszám (gradiens)
K_d	megoszlási hányados	ν	redukált sebesség
k_f	külső anyagátadási koeficiens	p	nyomás
k_{front}	sáv frontjának retenciós tényezője	Φ'	szerves oldószer térfogatarány
K_{H-A}	mintaion ionpárképzési állandója protonált kriptand kötőhelyen	Φ_{Cry}	szabad kriptand molekulák mólaránya
K_{H-OH}	mozgófázision ionpárképzési állandója protonált kriptand kötőhelyen	Φ_{CryH}	egyszeresen protonált kriptand molekulák mólaránya
k_{in}	oszlopba belépő komponens retenciós tényezője	Φ_{CryH_2}	kétszeresen protonált kriptand molekulák mólaránya
K_j	„j”-edik protonálódási állandó	Φ_{CryM}	fémionnal komplexált kriptand molekulák mólaránya
K_M	„M” fémion komplexképzési állandója kriptand kötőhelyen	Φ_j	„j”-szeresen protonált ionforma mólaránya
K_{M-A}	mintaion ionpárképzési állandója komplexált kriptand kötőhelyen	p_{in}	belépő nyomás a kolonna elején
K_{M-OH}	mozgófázision ionpárképzési állandója komplexált kriptand kötőhelyen	p_{out}	kilépő nyomás a kolonna végén
k_{out}	oszlopból kilépő komponens retenciós tényezője	\bar{q}	állófázisbeli koncentráció az adott szemcsére vonatkozóan
L	oszlophossz	Q	oszlop ioncserekapacitása

Q_0	a teljes ioncserekapacitás, ioncserében részt nem vevő szabad kriptand specieszek formájában való része	t_R	retenciós idő
Q_H	protonált kriptand molekulák biztosított ioncserekapacitás	$t_{R,g}$	gradiens retenciós idő
q_i	állófázisbeli egyensúlyi koncentráció	$t_{R,init}$	gradiens retenciós idő kezdeti értéke
Q_M	komplexált kriptand molekulák biztosította ioncserekapacitás	$t_{R,n}$	retenciós idő az „n”-edik gradiens szakasz végén
R_c	kolonna sugara	t_{stepx}	retenciós idő az „x”-edik gradiens lépés végén
$\%RC$	visszanyerési hatékonyság	u_0	mozgófázis áramlási sebesség
r_{core}	töltetszemcse tömör magjának sugara	u_{back}	sávvég vándorlási sebessége
R_g	gradiens meredekség	u_{front}	sávfront vándorlási sebessége
ρ	tömör mag és szemcsesugár aránya	v	mozgófázis térfogatáram
r_p	töltetszemcse sugara	V_{inj}	injektált mintatérfogat
R_s	felbontás	V_m	mozgófázis térfogat
S	komponens mintabeli mennyisége	V_R	retenciós térfogat
S'	retenciós tényező szerves oldószer tartalom függvényében való változását leíró paraméter	V_s	állófázis térfogat
S_c	kolonna keresztmetszete	w	súlytényező
σ_{r_p}	a töltet szemcseméretét jellemző log-normális eloszlás szórása	W	csúcsszélesség
SP	komponens addíciónált mennyisége	$W_{0,5}$	félértéksszélesség
SPS	komponens addíciónált mintabeli mennyisége	x	mintai töltés
t_0	holtidő	x'	mintai látszólagos töltés
t_d	gradiens késési idő	ξ	molekula-pórusátmérő arány
TF	„tailing” faktor	x_p	szemcseszerkezetet leíró paraméter
t_g	gradiens program időtartama	x_{sp}	felületen porózus szemcse szerkezetét leíró paraméter
$t_{R,max}$	utolsóként eluálódó komponens retenciós ideje	x_{tp}	teljesen porózus töltetszemcse szerkezetét leíró paraméter
$t_{R,min}$	elsőként eluálódó komponens retenciós ideje	y	mozgófázisbeli ellenion töltése
		z	oszlop menti távolság
		z_g	gradiens profilt leíró paraméter

Bevezetés

Az analitikai módszerek fejlesztésére folyamatos és egyre növekvő igény mutatkozik ipari, környezeti, és élettani területeken egyaránt. A vizsgálati technikákkal szemben támasztott alapvető elvárások a rövid analízisidő, valamint a megbízhatóság és az érzékenység. A megoldandó analitikai feladatok sokszínűsége és komplexitása mintaspecifikus módszerek kidolgozását teszi szükségessé, mely az esetek többségében jelentős háttérmunkát igényel a szakemberek részéről.

A felmerülő analitikai feladatok megoldása során a műszerezettség mellett a rendelkezésre álló idő a legfőbb korlátozó tényező. Belátható, különösen komplex minták esetén, hogy a rendszer és a vizsgálandó komponensek illetve a mintamátrix tulajdonságainak ismerete nélkül a módszerfejlesztés nehézkes és hosszadalmas folyamat lehet.

Az alap kutatások fő célja a gyakorlati tapasztalatok és az elméleti ismeretek közötti kapcsolatok megtalálása, mely adott esetben a már meglévő, és alapvetően elfogadottnak tartott elméletek kibővítését igényli. Ezen kutatások eredményei olyan, a későbbiekben kamatoztatható tudást adnak a szakemberek számára, mely jelentősen megkönnyíti, és nem utolsósorban meggyorsítja az adott analitikai probléma megoldására leginkább alkalmas módszer megtalálását, kidolgozását.

A Pannon Egyetem Analitikai Kémia Intézeti Tanszékén működő Kromatográfiai Kutatócsoporthoz 2009-ben, még alapszakos hallgatóként csatlakoztam. Az elválasztástudomány, azon belül is a folyadékkromatográfia elméletében és gyakorlatában egyaránt jelentős eredményekkel rendelkező csoport munkájába bekapcsolódva több különböző témájú kutatásban is részt vettem, betekintést nyerve ezáltal a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia és ioncsere-kromatográfia fejlődésébe. Tudományos munkámat a BSc majd MSc oklevél megszerzését követően, a PhD fokozat elnyerése érdekében doktori képzés keretében is folytattam, mely kutatásaim eredményeit jelen értekezésben kívánom ismertetni.

Célkitűzés

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia területén a széleskörű használatnak köszönhetően folyamatos fejlesztések zajlanak mind az oszloptöltetek mind a készülékek tekintetében. A fő cél természetesen az elválasztások hatékonyságának növelése, mely alapvetően a sáv szélesedés csökkentésén alapul. A kromatográfias oszlopok tekintetében az egyik legfőbb hatékonyságot befolyásoló paraméter a töltet szemcseméret eloszlása (particle size distribution = PSD), melynek hatása széles körben vizsgált. Fontos azonban megjegyezni, hogy az oszloptöltetek minősége nehezen reprodukálható, így a mérési eredmények komplexek és nehezen összehasonlíthatóak. Előbbiek ismeretében doktori munkám egyik fő céljaként olyan elméleti kutatást fogalmaztam meg, mely lehetőséget ad a szemcseméret eloszlás, oszloptöltés minőségétől független, gyors, valamint készülék- és oldószerhasználat mentes vizsgálatára. A PSD hatását szisztematikusan, különböző szemcseszerkezetek (teljesen porózus, tömörmagvú) és eltérő vizsgálandó molekulaméret tartományok szempontjából is vizsgálni kívántam.

A kromatográfias oszlopbeli nyomásesés elválasztásra gyakorolt hatásának vizsgálata, különösen a $2\ \mu\text{m}$ alatti szemcseátmérőjű töltetek és az ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfias (UHPLC) rendszerek megjelenésével újra előtérbe került. A nyomásváltozás, elsősorban nagyméretű molekulák (pl.: peptidek, proteinek) esetén jelentős változást okozhat a komponensek retenciójában, mely jelenség a lineáris áramlási sebesség és a moláris térfogat megváltozására vezethető vissza. Egy korábbi kutatáshoz [1] csatolkozva elméleti szinten kívántam vizsgálni az oszlopbeli nyomásesés és a moláris térfogatváltozás retenciós és hatékonysági paraméterekre gyakorolt hatását. Ezen vizsgálataimat egy korábban már mérési eredményekkel igazolt matematikai modell alkalmazásával kívántam megvalósítani.

Az elmúlt években a gadolínium illetve a különböző Gd(III) tartalmú komponensek környezeti és biológiai mintákban történő vizsgálata egyre nagyobb figyelmet kapott, tekintettel a szabad Gd(III) toxikus hatására. A Gd(III), mint környezeti szennyező fő forrását a Gd-kelátok MRI kontrasztanyagként való felhasználása révén a kórházi szennyvíz kibocsátások jelentik [2]. A felszíni vizekben és akár ivóvízben is előforduló, jellemzően nyomnyi Gd(III) mennyiségi meghatározására az AAS, ICP-OES és ICP-MS technikák, míg a különböző Gd(III) specieszek vizsgálatára csatolt technikák (pl.: CE/ESI-MS, HILIC/ICP-MS, HILIC/ESI-MS, HPLC/UV-VIS, HPLC/ICP-MS, HPLC-ICP-OES)

használatosak [3]. Ezen módszerek műszer és szerves oldószer igénye jelentős. Az ionkromatográfiai technikák szintén lehetőséget nyújtanak a különböző Gd(III) specieszek minőségi és mennyiségi meghatározására, továbbá az egyes szerves és szerves mátrixonok meghatározását is lehetővé teszik, mindemellett műszerigényük jelentősen egyszerűbb, és nem igénylik szerves oldószer használatát. Előbbiek ismeretében ionkromatográfiai kutatásaim egyik irányaként a mintaoldatbeli komplexképződés Gd-kelátok példáján történő anioncsere-kromatográfiai vizsgálatát fogalmaztam meg. A protonálódási és komplexképződési tulajdonságok figyelembevételével tanulmányozni kívántam különböző kelátképző ligandumok lúgos elúciós tartományban való alkalmazhatóságát, figyelembe véve az esetlegesen zavaró mátrixkomponensek hatását. Szisztematikusan változtatott mozgófázis összetétel mellett méréseket kívántam végezni különböző Gd-kelát komplexek és szerves anionok elválasztására, retenciós adatbázis felépítése érdekében. Olyan elméleti modell levezetését tűztem ki célul, mely alkalmas a különböző komponensek mérési körülményektől függő retenciójának megfelelően pontos előrejelzésére. Célom volt továbbá olyan mintaelőkészítési eljárás kidolgozása, mely a mátrixkomponensek hatékony eltávolítása mellett lehetővé teszi nyomnyi mennyiségben jelenlévő Gd(III) fémion reprezentatív mennyiségi meghatározását különböző eredetű mintaoldatokból anioncsere-kromatográfiai módszerrel.

Alifás és aromás karbonsavak vizsgálatára, egyszerű kémiai szerkezetük ellenére számos területen, környezeti mintákban, élettudományban, ipari folyamatokban (pl.: műanyag-, élelmiszer-, gyógyszer-, kozmetikai- és vegyipar), valamint kémiai kutatásokban (pl.: szerves szintézisek) igény mutatkozik. Ezen komponensek analízisére leginkább az ionkizárásos, a fordított-fázisú, valamint az ioncsere-kromatográfiai módszerek terjedtek el. Utóbbi technika előnye, hogy a szerves és szerves anionos komponensek szerves oldószer felhasználás nélkül, nagy érzékenységgel, szimultán vizsgálhatók. Az ioncsere-kromatográfiában használt állófázisok kevésbé elterjedt csoportja a makrociklikus molekulával funkcionizált töltetek. Előbbiek esetében az elválasztást meghatározó kémiai folyamatok teljes részletességgel nem ismertek, melynek okán kutatásaim másik irányvonalának az állófázisbeli komplexképződés anioncsere-kromatográfiai szempontból való vizsgálatát jelöltem meg. Méréseimet makrociklikus komplexképző ligandummal funkcionizált állófázison, a mozgófázis összetételének és koncentrációjának szisztematikusan változtatása mellett kívántam elvégezni. Olyan adatbázis felépítése volt a célom, mely tartalmazza különböző karbonsav- és szerves anionok alkáli-hidroxid elúcióval, kriptand állófázison, eltérő elválasztási körülmények esetén mutatott retenciós adatait. Elméleti modellt kívántam levezetni, mely alkalmas egy- és többértékű, illetve protonálódni képes anionok makrociklikus állófázison mutatott retenciós viselkedésének előrejelzésére alkáli-hidroxid elúció esetén. Vizsgálni kívántam továbbá a különböző analitok elválasztásának termodinamikai jellemzőit, valamint módszer optimalizálási lehetőségeit. Utóbbiak tekintetében hagyományos koncentrációgradiens, kapacitásgradiens és szerves eluensmódosító alkalmazásának elválasztásra gyakorolt hatásait kívántam kutatni.

1. Irodalmi összefoglaló

1.1. Kromatográfiás módszerekről általánosságban

Többalkotós rendszerek minőségi és mennyiségi összetételének meghatározása az analitikai vizsgálatok terén rendszeresen előforduló feladat, mely jellemzően csak az alkotók egymástól való elválasztása után lehetséges. Az analitikai szeparációs feladatok megoldásának leggyakrabban használt módszere a kromatográfia, mely az 1970-es évektől jelentős fejlődésen ment keresztül és független tudománnyá vált. A kromatográfiás módszerek számos szempont szerint csoportosíthatók, melyek közül a legelterjedtebbek az 1.1.1. ábrán láthatóak.

Csoportosítási szempont					
Kromatográfiás ágy alakja	Kölcsönhatás típusa	Mozgófázis halmazállapota	Állófázis halmazállapota	Mozgófázis/állófázis minősége	
Kétdimenziós	Papirkromatográfia	Adszorpciós kromatográfia	Gázkromatográfia	szilárd	apoláris / poláris (Normál-fázisú kromatográfia)
	Vékonyréteg kromatográfia	Megosztásos kromatográfia	Folyadékkromatográfia	folyadék	poláris / apoláris (Fordított-fázisú kromatográfia)
Háromdimenziós	Oszlop kromatográfia	Ionkromatográfia	Szuperkritikus fluidum kromatográfia	szilárd fázison kötött folyadék	poláris+ionpárképző / apoláris (Ionpárkromatográfia)
		Méretkizárásos kromatográfia		puffer / töltéssel rendelkező (Ioncsere-kromatográfia)	
		Affinitás kromatográfia		puffer / kationcserélő (Ionkizárásos kromatográfia)	
					poláros v. apoláros / hidrofil v. hidrofób gél (Gélkromatográfia)
					vizes oldószer / poláros (Hidrofil kölcsönhatáson alapuló kromatográfia)
					királis v. akirális / akirális v. királis (Királis kromatográfia)

1.1.1. ábra. Kromatográfiás módszerek csoportosítása [4–6].

A felsorolt tulajdonságok száma jól tükrözi a kromatográfia széleskörű – környezeti, biológiai, laboratóriumi, ipari stb. – alkalmazhatóságát. Az illékony komponensek vizsgálatára alkalmas gázkromatográfia, valamint a természetes és szintetikus polimerek elválasztására széles körben használt szuperkritikus fluidumkromatográfia mellett a leginkább elterjedt elválasztástechnika a nagynyomású-/nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

(HPLC), mely analitikai és preparatív célokra, kis- és nagyméretű molekulák (peptidek, proteinek), enantiomerek, aminosavak stb. elválasztására, továbbá csatolt technikák alkalmazása mellett proteomikai és glikonomikai kutatásokban is széles körben használt [4].

Jelen dolgozat az adszorpciós folyadékkromatográfia, valamint az ionkromatográfia tárgykörébe tartozó problémákkal foglalkozik.

1.1.1. Folyadékkromatográfias módszerek csoportosítása

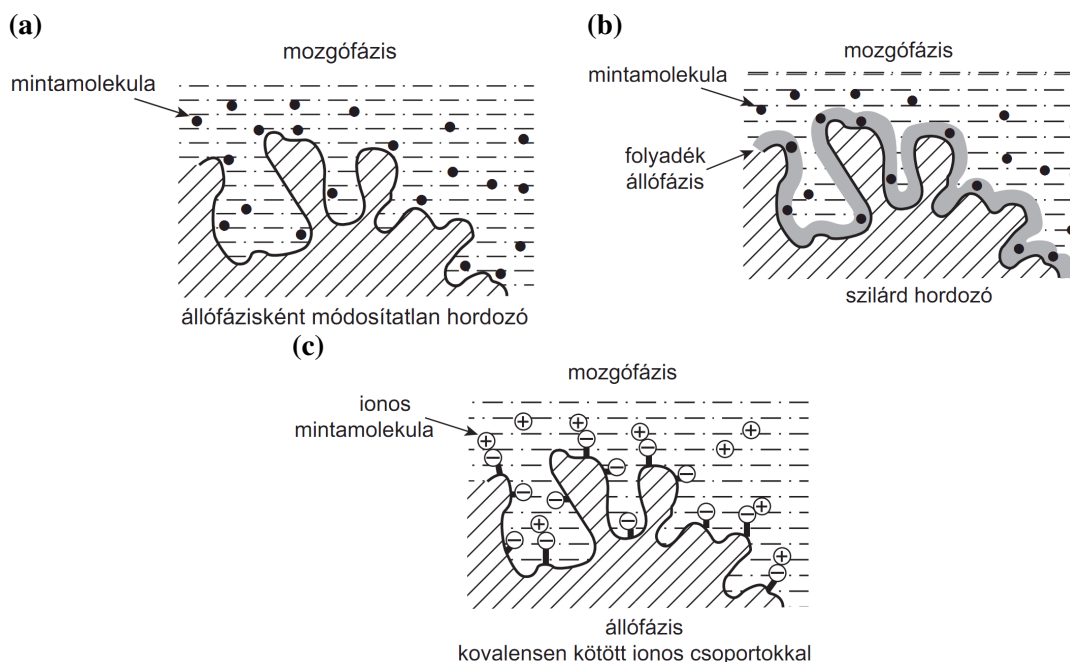
Mint az korábban már említésre került, a kromatográfias módszerek különböző szempontok szerint vizsgálhatók. Az 1.1.1. ábrán szereplő, talán legfontosabb csoportosítási szempont az elválasztás során használt kromatográfias fázisok minősége. Az alkalmazandó álló- illetve mozgófázis az adott folyadékkromatográfias feladattól függően kerül megválasztásra, ugyanis az egyes elválasztási módok eltérő tulajdonsággal rendelkező mintakomponensek analizését teszik lehetővé.

A *normál-fázisú kromatográfiában* (NPC – normal-phase chromatography) az oszloptöltet poláris (pl.: szilika), míg a mozgófázis kevésbé poláris szerves oldószerek (pl.: hexán/diklórometán) elegye. Ez az elválasztási módszer leginkább a vízoldhatatlan minták, a preparatív folyadékkromatográfia, valamint izomerek elválasztása során használatos.

A vízoldható komponensek vizsgálatára leginkább elterjedt *fordított-fázisú kromatográfia* (RPC – reversed-phase chromatography) valamilyen apoláris (pl.: C₁₈) állófázist, illetve poláris tulajdonságokkal rendelkező, víz és szerves oldószer tartalmú mozgófázist alkalmazó folyadékkromatográfias módszer.

A *nem-vizes fordított-fázisú kromatográfiában* (NARP – non-aqueous reversed-phase chromatography) az RPC-hez hasonlóan apoláris (pl.: C₁₈) állófázist, de azzal ellentétben vízmentes, csak szerves oldószerekből álló mozgófázist (pl.: acetonitril/diklórometán) használnak. Ez a módszer az erősen hidrofób, vízoldhatatlan komponensek vizsgálatát teszi lehetővé. Az NPC, RPC és NARP módszerek az adszorpciós (1.1.2.a ábra) kromatográfia területéhez sorolhatók.

A *hidrofil-kölcsönhatás kromatográfia* (HILIC – hydrophilic interaction chromatography) egy speciális, megoszláson (1.1.2.b ábra) alapuló elválasztási technika az erősen poláris, így a fordított-fázisú tölteteken retenciót nem vagy csak alig szenvedő komponensek vizsgálatára. Ezen módszer esetében mind az állófázis (pl.: szilika vagy amidkötésű) mind a mozgófázis poláris karakterű. Az eluens, hasonlóan az RPC technikához, víz és szerves oldószer (pl.: acetonitril) keveréke, azonban ebben az esetben a víztartalom növelésével érhető el az elúciós erő növekedése [4].



1.1.2. ábra. Adszorpción (a), megoszláson (b) és ioncserén (c) alapuló kölcsönhatások sematikus ábrázolása [5].

1.1.2. Ionkromatográfiai módszerek csoportosítása

A folyadékkromatográfia másik nagy területét az ionkromatográfiai módszerek jelentik, melyeket alapvetően az elválasztandó mintaalkotók minősége különböztet meg a korábban említett, hagyományos technikáktól. Az ionkromatográfia azon folyadékkromatográfiai módszerek gyűjtőneve, melyek ionos vagy ionizálható komponensek analízisét teszik lehetővé. Az alábbiakban a három legelterjedtebb ionkromatográfiai technikát ismertetem részletesebben.

Az *ioncsere-kromatográfia* alapvetően az állófázis és a mozgófázis között lejátszódó ioncsere-folyamatokon (1.1.2.c ábra) alapszik, de polarizálható ionok esetén további, nemionos adszorpciók is befolyásolják az elválasztási mechanizmust. A komponensek visszatartása a sztírol, vinil-benzol, metakrilát vagy polivinil-alkohol alapú polimer gyantán elhelyezkedő funkcionális csoportokkal való kölcsönhatásokon alapul. Ezzel a módszerrel, megfelelően funkcionális állófázist használva mind szervetlen, mind pedig szerves anionok és kationok vizsgálata megvalósítható. Kvaterner ammónium funkcionális csoportokkal ellátott polimer állófázisok anionos, míg szulfonát vagy karboxilát ioncserélő helyekkel rendelkező gyanták kationos komponensek elválasztását teszik lehetővé.

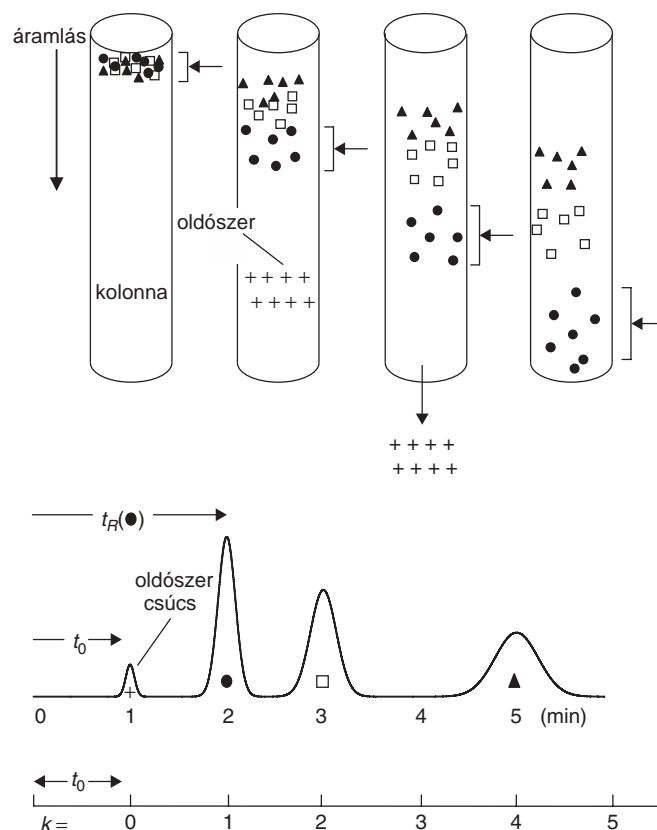
Az *ionkizárásos kromatográfia*ban a visszatartás mechanizmusát a Donnan-kizárás, a sztérikus-gátlás, valamint adszorpciók befolyásolják, továbbá bizonyos töltetek esetén H-híd kötések együttesen befolyásolják. Ionkizáráson alapuló elválasztásokban jellemzően nagykapacitású, teljesen szulfonált, polisztirol-divinilbenzol kopolimer alapú kationcserélő tölteteket használnak. A módszer alkalmas gyenge szervetlen és szerves savak vizsgálatára, valamint az említett állófázisokon retenciót nem szenvedő erős savaktól való

elválasztására. Megfelelő detektálási módot választva aminosavak, aldehidek és alkohokok is vizsgálhatóak ezzel a technikával.

Az *ionpár-kromatográfiában* alapvetően adszorpciós folyamatok határozzák meg a komponensek visszatartását. Az állófázis jellemzően semleges, alacsony polaritású, nagy fajlagos felülettel rendelkező divinil-benzol vagy oktadecil-szilika. Az oszlop szelektivitását az alkalmazott mozgófázis (pl.: víz, vizes puffer oldat) határozza meg, mely szerves módosítót, a vizsgálandó komponensnek megfelelő ionpárképző reagenst tartalmaz. Az ionpár-kromatográfia anionos és kationos felületaktív anyagok, valamint átmenetifém-komplexek elválasztására alkalmas technika [6].

1.2. Folyadékkromatográfias alapfogalmak, hatékonysági paraméterek

A folyadékkromatográfias elválasztások során a mintaalkotók visszatartását azok állófázissal kialakuló interakciója határozza meg. Amennyiben ezen kölcsönhatások erőssége megfelelő mértékben különbözik az egyes komponensekre vonatkozóan, úgy lehetővé válik azok fizikai elválasztása és önálló detektálása.



1.2.1. ábra. Háromkomponensű minta kromatográfias elválasztásának mechanizmusa [4].

A vizsgálandó minta kis térfogatát az oszlopra injektálva az elválasztandó komponensek a mozgófázis hajtóereje révén folyamatosan haladnak a detektor irányába (1.2.1. ábra).

Elsőként a visszatartást nem szenvedő oldószer molekulák lépnek ki az oszlopból. Az állófázissal kölcsönhatást kialakító mintakomponensek, annak eltérő erőssége függvényében haladnak, és különböző idők alatt hagyják el az oszlopot [4].

Habár az injektálás során igen keskeny mintasáv kerül az oszlopra, a komponensek adott szélességű, Gauss-jellegű csúcsok formájában jelennek meg a kromatogramon. Ezen görbék csúcsmaximumának helye, illetve a görbe alatti terület egyedi minőségi és mennyiségi információt szolgáltat az adott komponensről. Az injektált mintasáv kiszélesedése az oszlopban lejátszódó lassú adszorpciós kinetika, longitudinális- és örvénydiffúzió, valamint egyéb oszlopon kívüli hatások következménye. Általánosságban elmondható, hogy minél nagyobb visszatartást szenved egy adott komponens az állófázison, annál szélesebb zónában hagyja el oszlopot, és annál nagyobb bázisszélességű csúcsként jelenik meg a kromatogramon [4].

Az alábbiakban a visszatartás mértékének, azaz a komponensek retenciójának és az elválasztás hatékonyságának számszerű jellemzésére szolgáló alapfogalmakat ismertetem.

A komponensek oszlopban való tartózkodásának ideje azok vándorlási sebességétől függ, melyet az álló- illetve mozgófázis közötti megoszlás határoz meg. Előbbi egyensúlyi folyamat az ún. *megoszlási hányadossal* (K_d) jellemezhető, melynek számszerű értékét

$$K_d = \frac{c_s}{c_m} \quad (1.1)$$

az adott komponens álló- és mozgófázisbeli koncentrációjának (c_s ill. c_m) hányadosa adja meg. Az elválasztás során lejátszódó egyensúlyi folyamatok és az azokkal összefüggésben lévő vándorlási sebesség erősen függ az adott komponens molekuláris tulajdonságaitól, a mozgófázis összetételétől, az állófázis kémiai szerkezetétől, valamint a hőmérséklettől. A nyomás retencióra gyakorolt hatása jellemzően kicsi, a hagyományos készülékek esetében alkalmazott körülmények között (pl.: < 5000 psi) többnyire elhanyagolható [4].

Adott komponens visszatartása a *retenció tényező* vagy más néven kapacitási faktor (k) értékével írható le a megoszlási hányados, valamint az álló- és a mozgófázis térfogatarányának ismeretében (1.2).

$$k = \frac{V_s}{V_m} K_d \quad (1.2)$$

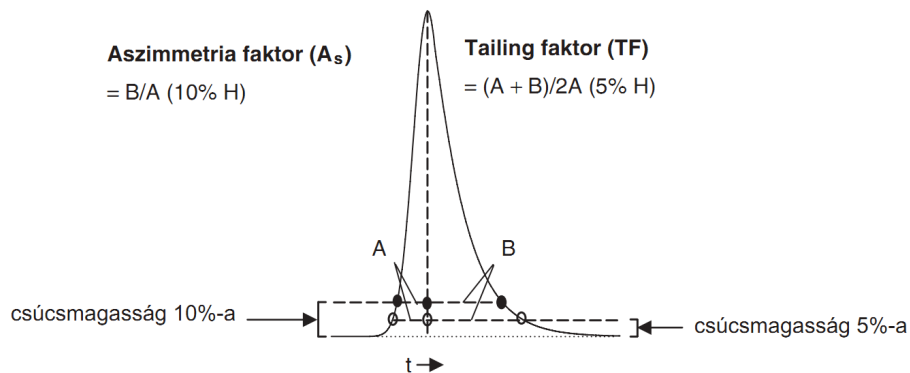
A retenció tényező a kromatogram kiértékelésével, az adott komponenscsúcs maximumához tartozó *retenció idő* (t_R), illetve az oldószer-csúcsához tartozó *holtidő* (t_0) alapján is meghatározható (1.3).

$$k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \quad (1.3)$$

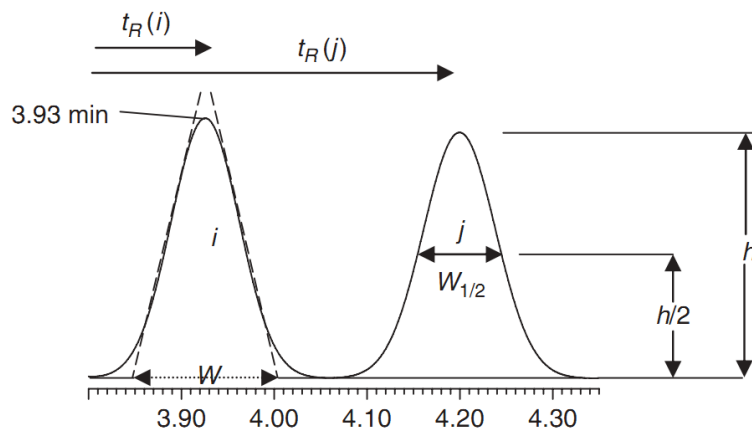
Előbbi megközelítéssel a retenció tényező egyszerűen és pontosan számítható, mely jelentősen megkönnyíti a gyakorlati munkát mind a rutin analízisek mind pedig a módszerfejlesztés során [4].

A komponensek retenciós idő értékei mellett a hozzájuk tartozó csúcsok geometriája is fontos információval szolgál az elválasztást illetően. Ideális esetben szimmetrikus, Gauss-görbe jellegű csúcsok alkotják a kromatogramot, azonban gyakran találkozhatunk előbbtől eltérő csúcshalakkal (1.2.2.a ábra), melyek jellemzésére az aszimmetria (A_s) illetve "tailing" (TF) faktorok szolgálnak. Erősen aszimmetrikus csúcsok esetén ($TF > 2$), melyet előidézhethet a kolonna mechanikai ill. kémiai sérülése, a nagy injektálási térfogat, termosztálási probléma, nem megfelelően megválasztott minta ill. eluens koncentráció, pH stb., jelentősen romlik az elválasztás hatékonysága.

(a)



(b)



1.2.2. ábra. Kromatográfias csúcsok geometriájának jellemzése aszimmetria (a) illetve csúcsszélesség (b) alapján [4].

Mint ahogy az az 1.2.1. ábrán is látható, a mintaalkotók oszlopbeli vándorlása során a mintasáv kiszélesedik, ezáltal a komponensek a kromatogramon adott szélességű csúcsok formájában jelennek meg. Könnyen belátható, hogy a csúcsok szélessége hatással van az elválasztás hatékonyságára. Utóbbi egyik mérőszáma az ún. *tányérszám* (N), amelynek értéke az

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (1.4)$$

összefüggéssel, a retenciós idő és a *csúcsszélesség* (W) ismeretében számítható. t_R és W egyaránt komponenstől, oszloptól és elválasztási körülményektől függő paraméterek.

A csúcsszélesség meghatározásának módja az 1.2.2.b ábrán látható, mely szerint a bázis-szélesség (alapvonalis csúcsszélesség) a kromatográfias csúcs oldalaira, az inflexiós pontokon át illesztett egyenesek által kijelölt időablak szélességét jelenti. A csúcsszélesség egyszerűbb és pontosabb mérésére a *félértékszélesség* ($W_{0,5}$) szolgál, mely a kromatográfias csúcsmagasság felénél (1.2.2.b ábra) mért csúcsszélességet jelenti. A tányérszám a félértékszélesség ismeretében az (1.5) összefüggés szerint számítható [4].

$$N = 5,554 \left(\frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2 \quad (1.5)$$

Az (1.4) és (1.5) egyenletek szimmetrikus csúcsok esetén jól alkalmazhatóak, azonban aszimmetrikus csúcsok esetén használatuk nem javasolt. Az egyik széles körben elterjedt, tányérszám meghatározására alkalmas összefüggés erősen aszimmetrikus ($TF > 2$) csúcsok esetében a Dorsey-Foley-egyenlet (1.6),

$$N = \frac{41,7 (t_R/W_{0,1})^2}{(B/A) + 1,25} \quad (1.6)$$

mely a teljes csúcsmagasság 10% -ánál mért aszimmetria faktor ($A_{S_{0,1}}$) és csúcsszélesség ($W_{0,1}$) ismeretében adja meg N értékét [7].

A kromatográfias oszlop elméletben felosztható olyan részekre, melyekben az elválasztandó komponensek megoszlása az álló- és a mozgófázis között az egyensúlyi megoszlással azonos. Ezen egyensúlyi egységeket nevezzük *tányéroknak*. Azt, hogy egy adott oszlop hány darab ilyen tányérra osztható, az elméleti tányérszámmal adhatjuk meg, mely ezen megközelítésben az adott L hosszúságú oszlopban elhelyezkedő, H magasságú tányérok számát jelenti (1.7).

$$N = \frac{L}{H} \quad (1.7)$$

A megfelelő elválasztást biztosító kromatográfias körülmények kiválasztása során fontos mérőszám az adott módszerrel elérhető *felbontás* (R_s).

$$R_s = \frac{2 [t_{R(j)} - t_{R(i)}]}{W_i + W_j} \quad (1.8)$$

A felbontás számításánál a két egymás után eluálódó komponens (i és j) retenciós idejének különbségét és a csúcsok szélességét együttesen vesszük figyelembe. Különösen mennyiségi meghatározás során, az alapvonalis elválasztás preferált, mely két közel azonos méretű csúcs esetén $R_s > 1,5$ felbontás értéket jelent. Az (1.8) egyenletből látható, hogy a felbontás javítása a retenciós idők különbségének növelésével és/vagy a csúcsszélességek csökkentésével érhető el. Fontos megjegyezni továbbá, hogy a csúcsok aszimmetriájának növekedése jelentősen rontja a felbontást, így adott esetben a csúcsalak javítására is szükséges hangsúlyt fektetni.

Módszerfejlesztések során jellemzően az (1.9) összefüggés használatos, mely egyszerű (azonos csúcshélességet feltételez) és emellett megbízható leírást ad a felbontás számítására a hatékonyság, a szelektivitás és a retenció együttes figyelembevételével.

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N}_{(a)} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)_{(b)} \left(\frac{k}{1 + k} \right)_{(c)} \quad (1.9)$$

ahol a szelektivitási tényező

$$\alpha = \frac{k_j}{k_i} \quad (1.10)$$

A módszer felbontása leghatékonyabban a szelektivitás változtatásával növelhető, azonban a megfelelő elválasztás érdekében mindhárom tagot (a, b, c) célszerű optimalni. A módszerfejlesztések első lépése az oszlop kiválasztása (tányérszám, oszlophossz, szemcseátmérő stb.), melyet a megfelelő retenció tartomány ($1 < k < 10$) elérése, majd a szelektivitás optimalítása követ. A végső lépés a felbontás és az analízisidő között kompromisszumot adó módszer megtalálása.

Nagyszámú komponenst tartalmazó minták esetén, ahol jellemzően nincs szükség teljes alapvonal elválasztásra, a felbontás helyett az ún. *csúcskapacitás* (n_c) szolgál a hatékonyság jellemzésére.

$$n_c = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \frac{t_{R,\max}}{t_0} \quad (1.11)$$

ahol $t_{R,\max}$ az utolsóként eluálódó csúcs retenció ideje. A csúcskapacitással azon csúcsok számát adjuk meg, melyek $R_s = 1$ felbontással az általunk megválasztott analízisidőn belül a kromatogramon azonosíthatók. Ortogonális elválasztás esetén a teljes csúcskapacitás az egyes dimenziók csúcskapacitásának szorzata, mely jól mutatja a kétdimenziós elválasztások létjogosultságát a kiemelten komplex minták analízisében [4].

1.3. Folyadékkromatográfias elválasztások elmélete

A folyadékkromatográfias elválasztások során lejátszódó fizikai és kémiai folyamatok ismerete és megértése jelentősen megkönnyíti a kísérleti munka megtervezését, a mérési eredmények feldolgozását/értelmezését, valamint az adott rendszer adta lehetőségek hatékony kihasználására irányuló módszerfejlesztést.

A következőkben a kutatómunkámhoz szorosabban kapcsolódó, folyadékkromatográfiában ismert elméleti modelleket mutatom be.

1.3.1. Elméleti modellek a lineáris kromatográfiában

A kromatográfia bonyolult, egymással jellemzően kapcsolatban álló hidrodinamikai, termodinamikai és kinetikai folyamatokat foglal magába, melyek egyaránt fontos szerepet játszanak az elválasztás végső kimenetelében. Az elúciós profilk leírására, a lineáris kromatográfia fejlődési irányainak megfelelően az alábbi három modell típus alakult ki.

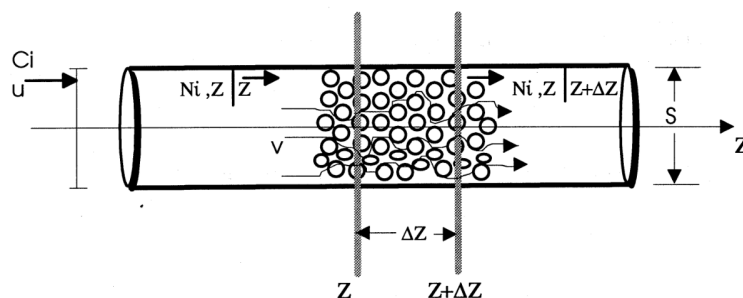
- tányérmodellek
- statisztikus modellek
- anyagmérleget és anyagátadási kinetikát leíró differenciális egyenletek megoldására szolgáló modellek

A tányérmodellek (Martin és Synge (1941) [8], illetve Craig (1944) modell [9]) a kromatográfias oszlopot adott számú, jól elkülönített, tökéletesen kevert cellára osztják, mely egységekben a mozgó- és az állófázis tökéletes egyensúlyban van. Ezek a modellek empirikus modellnek tekinthetők.

A statisztikus modellek (Giddings és Eyring (1955) [10], Dondi (1986, 2002) [11, 12], Felinger (1999, 2004) [13, 14]) a "mikroszkópikus valószínűségi" módszert alkalmazzák, mely a kromatográfias elválasztást sztochasztikus folyamatként kezeli, és a komponensek oszlopbeli vándorlására, a sávprofilok leírására valószínűségi sűrűség függvényt vagy karakterisztikus függvényt alkalmaz.

A kolonna mentén folyamatosan haladó mintakomponens sávok profilja a megfelelő tömegmérleg egyenlet rendszerek megoldásával írható le, melyhez szükséges továbbá a kezdeti és peremfeltételek, valamint az álló- és a mozgófázisbeli koncentrációk közötti kapcsolat, azaz az adszorpciós izoterma definiálása. Amennyiben feltételezzük, hogy az elválasztandó komponensek a kromatográfias oszlopban való tartózkodásuk alatt kémiaiilag nem alakulnak át, úgy minden komponensre felírhatjuk a differenciális tömegmérleg egyenletet.

Az elválasztás során a mozgófázisra vonatkozóan felírható differenciális tömegmérleg szerint az i komponens Δz szélességű kolonna részbe Δt idő alatt belépő és azzal egy időben kilépő mennyisége közötti különbség az adott oszlopszakaszban felhalmozódó mennyiséggel azonos [15].



1.3.1. ábra. Differenciális tömegmérleg a kromatográfias oszlop adott szakaszában [15].

Az említett kolonnaszakaszba belépő és onnan kilépő tömegáram az alábbi egyenletekkel adható meg.

$$N_{i,z} = \epsilon S \left(u_0 C_i - D_{L,i} \frac{\partial C_i}{\partial z} \right) \Big|_{z,t} \quad (1.12a)$$

$$N_{i,z}|_{z+\Delta z} = \epsilon S \left(u_0 C_i - D_{L,i} \frac{\partial C_i}{\partial z} \right) \Big|_{z+\Delta z,t} \quad (1.12b)$$

$$S = \pi R_c^2 = \frac{\pi d_c^2}{4} \quad (1.12c)$$

ahol ϵ a töltet teljes porozitása, S a kolonna keresztmetszetének területe, u_0 a mozgófázis átlagos áramlási sebessége, C_i és $D_{L,i}$ a komponens mozgófázisbeli koncentrációja illetve axiális diszperziós tényezője, z az oszlop menti távolság, R_c és d_c pedig a kolonna sugara illetve átmérője. Az (1.12a) és (1.12b) egyenletekben a zárójelben szereplő első tag a konvekciót, míg a második tag a molekuláris és az örvénydiffúzió okozta axiális diszperziót írja le. A be- és kilépő tömegáramok különbsége a vizsgált $S\Delta z$ térfogatú kolonnarészben

$$S\Delta z \left(\epsilon \frac{\partial C_i}{\partial t} + (1 - \epsilon) \frac{\partial C_{s,i}}{\partial t} \right) \Big|_{z,t} \quad (1.13)$$

Előbbi összefüggéseket felhasználva, amennyiben Δz nullához tart, valamint a mozgófázis térfogatáram és az axiális diszperzió értékét állandónak tekintjük, úgy a *tömegmérleg egyenlet* az alábbi formában írható fel.

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + F \frac{\partial C_{s,i}}{\partial t} + u_0 \frac{\partial C_i}{\partial z} = D_{L,i} \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \quad (1.14)$$

ahol a fázisarány $F = V_s/V_m = (1 - \epsilon)/\epsilon$ alakban az álló- (V_s) és a mozgófázis (V_m) térfogat ismeretében számítható. Az (1.14) egyenlet bal oldalán a mozgó- illetve az állófázisbeli visszatartás és a konvekció, az egyenlet jobb oldalán pedig a diffúziót leíró tag szerepel.

Az oszlopban végbemenő folyamatok tömegmérlegét és az anyagátadási kinetikát leíró másodfokú parciális differenciálegyenlet rendszerek megoldása kapcsán legismertebb elméletek

- a kromatográfia ideális modellje,
- az egyensúlyi-diszperzív modell,
- az összevont kinetikai modell,
- az általános sebességi modell és
- az összevont pórusediffúziós modell.

A kromatográfia *ideális modellje* (Wicke (1939) [16], Wilson (1940) [17], DeVault (1943) [18]) a legegyszerűbb elmélet, mely elhanyagolja az axiális diszperzió sávprofilra gyakorolt hatását, továbbá az anyagátadás kinetikáját végtelenül gyorsnak tekintve olyan végte-

len hatékonyságú oszlopot feltételez, melyben az álló- és a mozgófázis állandó egyensúlyban van. A fenti egyszerűsítéseknek köszönhetően a modell jól alkalmazható nemlineáris izoterma profilok esetén az oszlopban zajló termodinamikai folyamatok leírására.

1.3.1.1. Egyensúlyi-diszperzív modell

A kromatográfia *egyensúlyi-diszperzív modellje* (Giddings (1965) [19], van Deemter (1956) [20], Haarhoff és Van der Linde (1966) [21]) szerint amennyiben az anyagátadási kinetika nem végtelenül gyors, úgy minden nem-egyensúlyi eredetű, sávprofil alakulásához hozzájáruló folyamat (anyagátadási gátlás, véges adszorpció-deszorpció kinetika) összevonható egy ún. látszólagos axiális diszperziós tagba, mely az elválasztás során állandó és a koncentrációtól független paraméter [15].

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + F \frac{\partial q_i}{\partial t} + u_0 \frac{\partial C_i}{\partial z} = D_{a,i} \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \quad (1.15a)$$

$$D_{a,i} = \frac{H L}{2t_0} = \frac{H u_0}{2} \quad (1.15b)$$

ahol q_i a komponens állófázisbeli egyensúlyi koncentrációja. A látszólagos diszperziós koefficiens ($D_{a,i}$) az oszlophossz (L), a mozgófázis áramlási sebessége (u_0) és a holtidő (t_0) ismeretében kapcsolatot teremt a tömegmérleg egyenlet, valamint az oszlop hatékonyságát (H) jellemző elméleti tányérmagasság (HETP = height equivalent to a theoretical plate) között. Lineáris izotermát feltételezve, $q = a C$ ahol a izoterma paraméter a megoszlási hányadossal azonos, úgy $k = F a$ és a modell az alábbi formában adható meg.

$$(1 + k) \frac{\partial C}{\partial t} + u_0 \frac{\partial C}{\partial z} = D_a \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \quad (1.16)$$

Az *összevont kinetikai modellek* (Ruthven (1984) [22]) esetében az általános tömegmérleg egyenlet kinetikai egyenletekkel bővül, ezáltal figyelembe vehetők a sávszélesedést okozó kinetikai eredetű folyamatok. Amennyiben az adszorpció/deszorpció, azaz a retenciós mechanizmus a leglassabb folyamat az elválasztás során, úgy a reakció-diszperzív modell, míg ha az anyagátadási mechanizmus sebessége a meghatározó akkor a transzport-diszperzív modell használatos.

1.3.1.2. A kromatográfia általános sebességi modellje

A legátfogóbb kromatográfias elmélet az *általános sebességi modell*, mely minden a sávprofil alakulására hatást gyakorló termodinamikai és kinetikai folyamatot figyelembe vesz, beleértve az axiális diszperziót (molekuláris és örvénydiffúzió), az anyagátadási gátlást (külső és belső film anyagátadási gátlás), a pórusbeli diffúziót, valamint az adszorpció és deszorpció kinetikáját. Az általános sebességi modell elkülöníti a töltet szemcsék

között áramló (1.17a) illetve a szemcsék pórusaiban stagnáló (1.17b) mozgófázist és azokra külön tömegmérleg egyenletet határoz meg.

$$u_0 \frac{\partial C}{\partial z} + \frac{\partial C}{\partial t} + F \frac{\partial \bar{q}}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \quad (1.17a)$$

$$\epsilon_p \frac{\partial C_p}{\partial t} + (1 - \epsilon_p) \frac{\partial C_s}{\partial t} = D_p \left(\frac{\partial^2 C_p}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_p}{\partial r} \right) \quad (1.17b)$$

ahol u_0 a mozgófázis lineáris vándorlási sebessége (L/t_0), F az oszlop teljes porozitásának $((1 - \epsilon)/\epsilon)$ ismeretében megadható fázisarány, D_L az axiális diszperziós koefficiens, mely a molekuláris és az örvénydiffúziós állandók összege, ϵ_p a szemcse belső porozitása, C_p a komponens pórusbeli, C_s az állófázis által adszorbeált koncentrációja, D_p pedig a pórusbeli diffúziós koefficiens.

Az adott szemcsére vonatkozóan az állófázisbeli koncentráció (\bar{q}) gömbszimmetrikus, r_p sugarú szemcse esetén

$$\bar{q} = \frac{3}{r_p^3} \int_0^{r_p} r^2 q dr \quad (1.18)$$

Az (1.17a) egyenletben szereplő $\partial \bar{q} / \partial t$ tag az adott szemcsére vonatkoztatott átlagos adszorpciós sebesség, mely gömb alakú szemcsék esetén, mint a külső felületre vonatkozó peremfeltétel az (1.19) egyenlettel adható meg, ahol k_f a külső anyagátadási tényező.

$$\frac{\partial \bar{q}}{\partial t} = \frac{3}{r_p} \frac{1}{D_p} \frac{\partial C_p}{\partial r} \Big|_{r=r_p} = \frac{3}{r_p} \frac{1}{k_f} (C - C_p|_{r=r_p}) \quad (1.19)$$

Ha feltételezzük, hogy az adszorpció-deszorpció sebessége végtelenül gyors, akkor a komponens mozgó- és állófázisbeli koncentrációjának kapcsolatát az adszorpciós izoterma adja meg, mely lineáris kromatográfiában $C_s = K_a C_p$. Amennyiben az adszorpció-deszorpció folyamata lassú, úgy a két fázisbeli koncentráció kapcsolata kinetikai egyenlettel, elsőrendű kinetika esetén az alábbi összefüggéssel írható le.

$$\frac{\partial C_s}{\partial t} = k_a (C_p - C_p^*) = k_a \left(C_p - \frac{C_s}{K_a} \right) \quad (1.20)$$

ahol k_a és K_a az adszorpció sebességi illetve egyensúlyi állandója, C_p^* pedig az egyensúlyi pórusbeli koncentráció.

Az általános sebességi modell összetettségéből adódóan kevésbé népszerű, mint az egyensúlyi-diszperzív modell, és használata elsősorban a lassú anyagátadási kinetikával jellemezhető kromatográfiás elválasztások esetén indokolt.

A parciális differenciál egyenletek rendszerén alapuló általános sebességi modell megoldása numerikus módszer alkalmazását igényli. A modell lineáris izotermára vonatkozó megoldását Laplace-tartományba elsőként Kučera [23] és Kubin [24] (1965) írták le. Bár előbbi megoldás nem transzformálható vissza időtartományba, a kromatográfiás sávokat egyértelműen leíró statisztikai momentumok könnyen származtathatóak belőle.

Az L hosszúságú oszlopból kilépő sávprofil n -edik momentuma (1.21a), n -edik abszolút vagy normalizált momentuma (1.21b) és n -edik centralizált momentuma (1.21c) az alábbi egyenletekkel adható meg [15].

$$M_n = \int_0^\infty C(t, z = L)t^n dt \quad (1.21a)$$

$$\mu_n = \frac{M_n}{M_0} = \frac{\int_0^\infty C(t, L)t^n dt}{\int_0^\infty C(t, L) dt} \quad (1.21b)$$

$$\bar{\mu}_n = \frac{\int_0^\infty C(t, L)(t - \mu_1)^n dt}{\int_0^\infty C(t, L) dt} \quad (1.21c)$$

A kromatográfiás csúcsok alapvetően három momentummal jellemezhetők. A nulladik momentum (μ_0) a csúcs területét, az első abszolút momentum (μ_1) a komponens retenció idejét, míg a második centralizált momentum ($\bar{\mu}_2$) a varianciát, azaz a csúcshélességet adja meg. Az általános sebességi modell alapján a kromatográfiás csúcs első momentuma a töltéscsemce porozitásának (ϵ_p) figyelembevételével

$$\mu_1 = t_R = \frac{L}{u} [1 + x_p(K_a(1 - \epsilon_p) + \epsilon_p)] \quad (1.22)$$

A csúcs második centralizált momentuma, az adszorpció-deszorpció kinetikáját végtelenül gyorsnak tekintve a (1.23) egyenlettel adható meg.

$$\bar{\mu}_2 = \frac{2L}{u} (\delta_{ax} + \delta_f + \delta_d) \quad (1.23)$$

ahol δ_{ax} és δ_f az axiális diszperzióra illetve a külső anyagtranszportra vonatkozó tagok, melyek az alábbi összefüggésekkel számíthatók.

$$\delta_{ax} = \frac{D_L}{u^2} [1 + x_p(K_a(1 - \epsilon_p) + \epsilon_p)]^2 \quad (1.24a)$$

$$\delta_f = \frac{r_p}{3k_f} [x_p(K_a(1 - \epsilon_p) + \epsilon_p)]^2 \quad (1.24b)$$

Az (1.24b) egyenletben k_f a külső anyagátadási folyamat sebességét jellemzi. A fenti összefüggésekben szereplő x_p tag egy a töltéscsemce szerkezetét figyelembe vevő paraméter, mely teljesen porózus (totally porous = tp) illetve felületen porózus (superficially porous = sp) szemcsék esetében az alábbi összefüggésekkel írható le.

$$x_{tp} = \frac{(1 - \epsilon_e)}{\epsilon_e} \quad (1.25a)$$

$$x_{sp} = \frac{(1 - \epsilon_e)(1 - \rho^3)}{\epsilon_e} \quad (1.25b)$$

ahol ϵ_e az oszlop porozitása, ρ pedig a tömör mag sugarának (r_{core}) a szemcse teljes sugarához (r_p) viszonyított aránya ($\rho = r_{core}/r_p$).

A töltéscsémák pórusaiban zajló diffúzió sávszélesedéshez való hozzájárulása (δ_d) teljesen illetve felületen porózus csémák esetében az alábbiak szerint írható le [25].

$$\delta_{d,tp} = \frac{r_p^2}{15D_p} \frac{(1 - \epsilon_e)}{\epsilon_e} [K_a(1 - \epsilon_p) + \epsilon_p]^2 \quad (1.26a)$$

$$\delta_{d,sp} = \beta \frac{r_p^2}{15D_p} \frac{(1 - \epsilon_e)}{\epsilon_e} [K_a(1 - \epsilon_p) + \epsilon_p]^2 \quad (1.26b)$$

$$\beta = (1 - \rho^3)^2 \frac{1 + 2\rho + 3\rho^2 - \rho^3 - 5\rho^4}{(1 + \rho + \rho^2)^2} \quad (1.26c)$$

Az általános sebességi modell Laplace-tartományban való megoldásával kapott momentumokat felhasználva az oszlop elméleti tányérmagassága (H)

$$H = \frac{\bar{\mu}_2}{\mu_1^2} L \quad (1.27)$$

összefüggést felhasználva az alábbi formában adható meg.

$$H = \frac{2D_L}{u_0} + \frac{2u_0}{F} \left(\frac{k_1}{1 + k_1} \right)^2 \left[\frac{r_p^2}{15D_p} \beta + \frac{r_p}{3k_f} \right] \quad (1.28a)$$

$$k_1 = \frac{1 - \epsilon_e}{\epsilon_e} (K_a(1 - \epsilon_p) + \epsilon_p) \quad (1.28b)$$

ahol u_0 a mozgófázis lineáris vándorlási sebessége, F a fázisarány ($(1 - \epsilon_e)/\epsilon_e$), k_1 a zóna visszatartási tényező, r_p a töltéscséma sugara, β pedig egy segédparaméter a különböző csémakonstrukciók (porózus, tömörmagvú) figyelembevételére (1.26c). A fenti (1.28a) összefüggésben szereplő D_L és D_p az axiális diszperziót és a pórusdiffúziót jellemző faktorok, míg k_f a külső anyagátadási tényező, melyek [25] alapján az alábbi összefüggésekkel adhatóak meg.

$$D_L = D_m \left[\gamma_e + \frac{1 - \epsilon_e}{\epsilon_e} (1 - \rho^3) \Omega \right] + h_{\text{eddy}} r_p u_0 \quad (1.29a)$$

$$D_p = \Omega D_m \quad (1.29b)$$

$$k_f = \frac{1,09}{\epsilon_e} \frac{D_m}{2r_p} (\epsilon_e \nu)^{1/3} \quad (1.29c)$$

$$\Omega = \epsilon_p \gamma_p \left[(1 - \xi)^2 (1 - 2,104 \xi + 2,09 \xi^3 - 0,956 \xi^5) + \frac{3K_a}{1 + 0,5K_a} \right] \quad (1.30a)$$

$$\nu = \frac{u_0 2r_p}{D_m} \quad (1.30b)$$

ahol D_m és h_{eddy} a molekuláris- illetve örvénydiffúziós tényező, ϵ_e és ϵ_p a töltet illetve a csémák porozitása, γ_e és γ_p a töltetanyag, és a csémakonstrukció gátlási faktora,

ρ a tömör mag teljes szemcsesugarához viszonyított aránya, ξ a molekula és az átlagos pórusátmérő aránya, ν a redukált sebesség, K_a pedig az adszorpció egyensúlyi állandója.

1.3.1.3. A retenció termodinamikai alapjai

A komponensek elválasztása azok oszlopbeli retencióján alapul, melyet a fázisok közötti megoszlás határoz meg. A komponens álló- és mozgófázisbeli koncentrációjának viszonyát az adszorpció izotermák írják le. Ezen egyensúlyi izotermák alakulását jelentősen befolyásolja a rendszer fizikai állapota (pl.: hőmérséklet, nyomás). A hőmérséklet (T) egyensúlyi állandóval (K_a) való kapcsolatát a van't Hoff egyenlet (1.31) adja meg.

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (1.31)$$

ahol ΔH és ΔS a folyamat entalpia és entrópia változása, R pedig az egyetemes gázállandó. A van't Hoff összefüggést egy a fázisarányra (F) vonatkozó taggal kiegészítve a retenció tényező az (1.32) egyenlet szerint számítható.

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln F \quad (1.32)$$

Az egyensúlyi állandó hőmérsékletfüggésének vizsgálata során fontos figyelembe venni, hogy a mozgófázis viszkozitása és ezáltal áramlási sebessége a hőmérséklettel változhat, mely közvetetten nyomásváltozást idézhet elő az oszlopban [15].

A rendszerbeli nyomás a mozgófázis sűrűségére, viszkozitására, hőmérsékletére, a komponens diffúziójának sebességére, valamint az álló- és mozgófázis kölcsönhatásaira is hatással lehet [26]. A nyomás kromatográfias elválasztásra gyakorolt hatását – beleértve a kolonna holtterfogat és porozitás változását – elméleti szempontból Martin és Guiochon (2005) [27] részletesen vizsgálta. A komponensek retenciójának nyomásfüggését HPLC körülményekre (< 400 bar) vonatkozóan már 1993 és 1997 között számos tanulmány (Ringo, Evans, McGuffin et al. [28–33]) igazolta. Az UHPLC rendszerek (400–1200 bar) megjelenésével 2006 és 2011 között további publikációk (Fallas, Neue, Hadley, McCalley, Guillaume, Sandra et al. [34–38]) foglalkoztak a retenció tényező és a rendszernyomás közötti kapcsolat részletes leírásával.

A nyomás növelése mellett nagy molekulaméretű komponensek (pl.: peptidek, proteinek) esetén, kismolekulákkal szemben a retenció jelentősebb növekedését tapasztalták [39]. Előbbi jelenséget a komponens moláris térfogatának megváltozásával hozták kapcsolatban, mely feltevés helyességét a termodinamika egyik alapegyenlete (1.33) is igazolja.

$$\ln k = -\frac{\Delta G}{RT} + \ln F = -\frac{\Delta E}{RT} - p \frac{\Delta V_m}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln F \quad (1.33)$$

ahol ΔG , ΔE és ΔS a rendszer Gibbs-féle szabadentalpia, belső energia és entrópia változását, p a nyomást, míg F a fázisarányt, ΔV_m pedig a moláris térfogatváltozást jelöli. A nyomás hatása a moláris térfogat mellett, melyet elsőként Giddings (1965) [19]

írt le, az állófázis és a komponens szolvatációs illetve hidratációs folyamataira is kiterjed. Fordított-fázisú kromatográfiában, amennyiben csökken a komponens körülvevő szolvatációs réteg vastagsága úgy a molekula hidrofobicitása, és ennek eredményeként a visszatartása is növekszik [40].

Bár a moláris térfogatváltozás jó indikátor a nyomás retencióra gyakorolt hatásának vizsgálatában, fontos megjegyezni, hogy előbbi, különösen nagyméretű molekulák esetén egy igen összetett jelenség. Egy 2012-es tanulmány [39] szerint magas nyomástartományban feltételezhető a nagyméretű biomolekulák konformációjának, azaz moláris térfogatának és hidrofobicitásának együttes változása. Látható tehát, hogy makromolekulák esetén az oszlopbeli nyomásváltozás retencióra gyakorolt hatásának modellezése meglehetősen komplex feladat [39, 40].

Fekete, Horváth és Guillaume 2013-as tanulmányukban, a sűrűdési hő hatásától függetlenül részletesen vizsgálták terápiás peptidek UHPLC elválasztása során a nyomás moláris térfogatra és retencióra, valamint termodinamikai paraméterekre gyakorolt hatását [1]. Az általuk levezetett modell alkalmas a retenciós tényező és nyomásesés adatok ismeretében a vizsgált komponens moláris térfogatváltozásának megfelelően pontos becslésére. A szerzők a (1.33) egyenlet átrendezésével a retenciós tényező (k) adott nyomásra vonatkozó értékének számítására az alábbi összefüggéseket írták le.

$$k = k_0 \exp\left(-\frac{\Delta V_m}{RT}p\right) \quad (1.34a)$$

$$k_0 = F \exp\left(-\frac{\Delta E}{RT} + \frac{\Delta S}{R}\right) \quad (1.34b)$$

ahol k_0 a retenciós tényező nulla nyomásra vonatkozó határértéke. Fontos kiemelni, hogy a fenti összefüggések csak állandó oszlopnomás esetén érvényesek. Izokratikus körülményeket, lineáris nyomásgradiens profilt és állandó fázisarányt feltételezve az L hosszúságú oszlop adott z pontján jellemző lokális nyomás:

$$p[z] = p_{in} - \frac{\Delta p}{L}z \quad (1.35)$$

ahol p_{in} a kolonna elején mért belépő nyomás, Δp pedig a nyomásesés, azaz a belépő és kilépő nyomások különbsége. A kromatográfiás oszlop nyomásesése az oszlop és a mozgófázis tulajdonságainak ismeretében a Kozeny-Carman összefüggéssel (1.36) számítható.

$$\Delta p = F \frac{\eta u_0 L}{d_p^2} \quad (1.36)$$

ahol η és u_0 a mozgófázis viszkozitása és áramlási sebessége, d_p pedig a töltet átlagos szemcseátmérője. Az (1.34a) és (1.35) egyenleteket összevonva a komponens lokális

retenciós tényezője az (1.37) összefüggéssel írható le.

$$k[z] = k_0 \exp \left[-\frac{\Delta V_m}{RT} \left(p_{in} - \frac{\Delta p}{L} \Delta z \right) \right] = k_{in} \exp \left(\frac{\Delta V_m}{RT} \frac{\Delta p}{L} z \right) \quad (1.37)$$

ahol k_{in} a komponens oszlop elején jellemző retenciós tényezője. A (1.37) egyenlet átalakításával nyomás-indukált sebesség gradiens esetén a retenciós idő számítására az alábbi összefüggést kapjuk [1].

$$t_R = t_0 \left[1 + \frac{k_0 R T}{\Delta p \Delta V_m} \exp \left(-\frac{p_{in} \Delta V_m}{R T} \right) \left[\exp \left(\frac{\Delta p \Delta V_m}{R T} \right) - 1 \right] \right] \quad (1.38)$$

Az (1.38) egyenlet segítségével a rendszerparaméterek és a vizsgálandó komponensek molekuláris tulajdonságainak ismeretében az adott komponens retenciós idejének oszlopbeli nyomásgradiens esetén várható értéke könnyen számítható.

1.3.2. Retenciós elméletek az ioncsere-kromatográfiában

Az ioncsere-kromatográfiás elválasztások során lejátszódó egyensúlyi folyamatokat leíró modellek között alapvetően elméleti illetve empirikus modellek különíthetők el.

A teoretikus modellek levezetése elméleti összefüggések felhasználásával történik, mely összefüggések változói fizikai illetve kémiai jelentéssel bírnak az elválasztás során lejátszódó folyamatok tekintetében. A retenciós tényező elméleti modell segítségével való számítása előzetes ismereteket vagy becsléseket igényel a mintaion, az állófázis és a mozgófázis tulajdonságaira vonatkozóan. Ezek a paraméterek (pl.: ioncsere-egyensúlyi állandók, ioncserekapacitás, gyantatérfogó stb.) jellemzően szisztematikusan változtatott kísérleti körülmények mellett rögzített mérési adatbázis alapján kerülnek számításra. Amennyiben az említett paraméterek ismertek, úgy lehetőség van a retenciós tényező különböző mérési körülmények (mozgófázis összetétel, koncentráció, pH, hőmérséklet stb.) esetén várható értékének becslésére.

Az anioncsere-kromatográfiában ismert főbb elméleti modellek a

- lineáris oldószererősségi modell,
- Hoover modell,
- kettős eluens modell,
- Kuwamoto modell,
- bővített kettős eluens modell,
- többszörös eluens/minta modell,
- latex modell és
- kriptand modell.

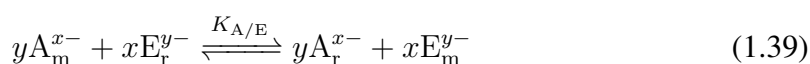
Az empirikus modellek a retenciós változások háttérben álló folyamatok leírására, elvi magyarázatára nem fordítanak hangsúlyt. Ezen modellek a retenciós tényező két adott mérési körülmény (pl.: mozgófázis pH, koncentráció) között történő megváltozásának módját vizsgálják. A modell megalkotása során szintén szükség van kísérleti adatok, jellemzően a mintakomponensek két ismert összetételű mozgófázis mellett mért retenciós tényezőjének rögzítésére. Ezt követően a retenciós viselkedés leírása különböző mozgófázis összetételekre interpolációs úton, valamilyen előre meghatározott egyenlet felhasználásával történik [41].

Fontos megjegyezni, hogy a retenciót leíró paraméterek elméleti modellnél bemutatott módon történő meghatározása egyfajta közelítés/becslés, mely bizonyos hibával terhelt. A különböző szerzők által publikált számítások eltérő eredményei nem feltétlenül jelentik az egyik vagy a másik módszer helyességét/helytelenségét, hiszen a retenciós tényezőt az egyes paraméterek egymáshoz való viszonya, azaz az adott módszer teljes paraméterkészlete határozza meg. Jellemző tehát, hogy az azonos mérési körülményekre meghatározott, de eltérő paraméterekkel a retenciós tényező értékére adott becslések megegyeznek.

A következőkben a dolgozat kísérleti részében tárgyaltakhoz kapcsolódó anioncsere-kromatográfiás elméleti modelleket ismertetem részletesebben.

1.3.2.1. Lineáris oldószererősségi modell

Az irodalomban legkorábban publikált és legegyszerűbb ioncsere-kromatográfiában használt elméleti modell a lineáris oldószererősségi modell [42–44], mely az állófázison kötött mintaion és a mozgófázisbeli ellenion közötti ioncsere-egyensúlyi folyamatot sztöchiometrikus egyenlet (1.39) formájában írja le.



ahol "r" index az állófázisban, míg "m" index a mozgófázisban tartózkodó ionformákat jelöli. Az ioncsere-reakció egyensúlyi állandója, mely az ionkromatográfiás gyakorlatban szelektivitási állandóként ($K_{A/E}$) ismert, az egyes ionformák moláris koncentrációjának ismeretében az (1.40) egyenlettel definiálható.

$$K_{A/E} = \frac{(A_r^{x-})^y (E_m^{y-})^x}{(A_m^{x-})^y (E_r^{y-})^x} \quad (1.40)$$

ahol x és y a mintaion illetve a mozgófázisbeli ellenion töltését jelöli. Az eluens ion állófázisbeli koncentrációja az oszlop ioncserekapacitásának (Q) ismeretében

$$(E_r^{y-}) = \frac{Q}{y} \quad (1.41)$$

alakban írható le. Az (1.40) és (1.41) összefüggések alapján, az (1.1) és (1.2) egyenletek felhasználásával a mintakomponens ioncsereelő oszlopon mutatott retenciós tényezője

logaritmizált formában az (1.42) összefüggés szerint számítható.

$$\lg k_A = \frac{1}{y} \lg K_{A/E} + \frac{x}{y} \lg \frac{Q}{y} + \lg \frac{V_s}{V_m} - \frac{x}{y} \lg E_m^{y-} \quad (1.42)$$

Mivel Q , V_s és V_m az oszlopot jellemző állandó paraméterek, $K_{A/E}$ pedig adott oszlop és mozgófázis esetén szintén állandónak tekinthető egy adott komponensre, ezért ezen paraméterek összevonhatóak (C_{iso}), így az (1.42) egyenlet az alábbi alakra egyszerűsödik.

$$\lg k_A = C_{iso} - \frac{x}{y} \lg E_m^{y-} \quad (1.43)$$

A lineáris oldószererősségi modell a mintakomponens retenciós tényezőjének mozgófázis koncentrációjától való függését, logaritmizált alakban lineáris kapcsolatként adja meg, ahol az (1.43) egyenlettel leírt egyenes meredeksége a minta- és a mozgófázis ionok töltéseinek negatív hányadosa.

A lineáris oldószererősségi modell közvetlenül csak olyan rendszerek esetén alkalmazható, ahol a mozgófázis egykomponensű (pl.: NaOH), azonban az ún. "uralkodó egyensúly elve" és az "effektív iontöltés elve" megközelítésekkel többkomponensű mozgófázisok (pl.: $\text{CO}_3^{2-} / \text{HCO}_3^- / \text{OH}^-$) esetére is kiterjeszhető [45].

Az *uralkodó egyensúly elve* megközelítés szerint a mintaion elúciójáért csak a mozgófázis legmagasabb töltéssel rendelkező ellenionja felelős függetlenül attól, hogy az eluens tartalmaz-e további, akár jelentős mennyiségben jelen lévő, alacsonyabb töltésű ionformákat vagy sem. Az *effektív iontöltés elve* megközelítésben a mintakomponensek visszatartása a mozgófázisban jelenlévő összes ellenion töltéssel súlyozott hatásának figyelembevételével kerül leírásra [46]. Fontos megjegyezni, hogy bár vizes oldatokról van szó, ez a megközelítés a protonálódni képes eluens ionok mellett jelenlévő hidroxid ionok hatását nem veszi figyelembe.

1.3.2.2. Hoover modell, kettős eluens modell és bővített kettős eluens modell

A lineáris oldószererősségi modellnél komplexebb leírást adó első modell a *Hoover modell* [47] volt, mely számos további retenciós modell alapját jelenti. A Hoover modell a mozgófázis összes ionjának hatását figyelembe veszi a mintaion retenciójának leírása során, hasonlóan az effektív iontöltés elvéhez, azonban attól eltérően az egyes ellenionokra vonatkozóan különböző, kísérletileg meghatározandó szelektivitási állandókat definiál. Fontos kiemelni, hogy ez az elmélet már a hidroxid ion hatását is figyelembe veszi a mintaionok retenciójának számításánál [46].

A *kettős eluens modellt* 1984-ben, a Hoover modell módosításával Jenke és Pagenkopf dolgozták ki [48–50]. Ezen elmélet a hidroxid ionok retencióra gyakorolt hatását nem veszi figyelembe azzal a magyarázattal, hogy ezen versengő ion mozgófázisbeli koncentrációja általában nagyon alacsony, valamint hajtóerejét tekintve igen gyenge ellenion az anioncsere-kromatográfiás rendszerben. A kettős eluens modell a kísérletileg meghatáro-

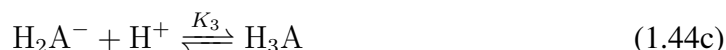
zandó paraméterek számát háromról kettőre csökkentve leegyszerűsíti a Hoover modellt, azonban a szelektivitási állandók értékének számításához továbbra is numerikus módszer, iteratív minimalizáció szükséges [46].

Szintén a Hoover modell alapján került levezetésre az ún. *Kuwamoto modell* (1989), melyben a szerzők elhanyagolva az ioncsere folyamatok szelektivitási állandóit, elúciós rendszerállandókat vezettek be, a hidroxidion minta anion elúciójára gyakorolt hatását szintén figyelmen kívül hagyva [51]. A modell hátránya, hogy a retenciós tényező számítása az elúciós rendszerállandók előzetes ismeretét igényli, melyhez specifikus kísérletso-rozat elvégzése szükséges.

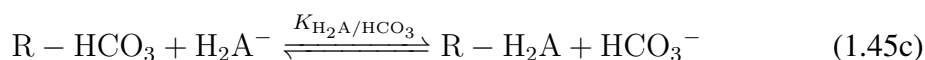
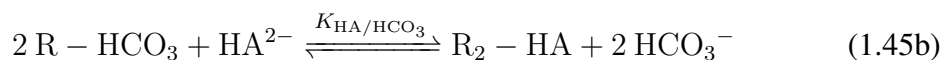
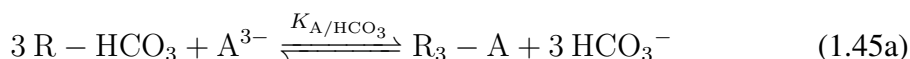
1.3.2.3. Többszörös eluens/minta modell

Hajós és munkatársai 1995-ben publikálták az ún. többszörös eluens/minta modellt [52], mely a legösszetettebb anioncsere-kromatográfiában alkalmazott elméleti modell. Ez a modell, bár matematikailag igen hasonló a Hoover modellhez, mégis jelentősen eltér attól, hiszen a mozgófázis mellett a mintakomponensek lehetséges protolízisét is figyelembe veszi a retenciós tényező számítása során, valamint a hidroxidion elúciós hatását sem hanyagolja el [46]. A modellt kísérletileg igazolva sikeresen alkalmazták komplex ionok [53] és karbonsavak elválasztása [54, 55], valamint amfoter tulajdonságú kationos mozgófázissal történt elúciók leírására [56].

Háromértékű minta anion esetén a protonálódási reakciók az (1.44a), (1.44b) és (1.44c) egyenletekkel



míg a különböző mértékben protonált mintaspecieszek ioncsere-egyensúlyi folyamatai az (1.45a), (1.45b) és (1.45c) összefüggésekkel írhatóak le.



A Hoover modell által bevezetett intereluens állandókat felhasználva a modell az alábbi formában (1.46a) adható meg.

$$k = \frac{V_s}{V_m} (K_{A/HCO_3} z^3 \Phi_0 + K_{HA/HCO_3} z^2 \Phi_1 + K_{H_2A/HCO_3} z \Phi_2) \quad (1.46a)$$

$$z = \frac{\sqrt{p^2 + q} - p}{4 K_{CO_3/HCO_3} [CO_3^{2-}]} \quad (1.46b)$$

$$p = [HCO_3^-] + K_{OH/HCO_3} [OH^-] \quad (1.46c)$$

$$q = 8 Q K_{CO_3/HCO_3} [CO_3^{2-}] \quad (1.46d)$$

ahol Φ_0 a protonálatlan, Φ_1 és Φ_2 pedig az egyszeresen illetve kétszeresen protonált mintaion formák mólarányait jelölik, melyekvaz egyes protonálódási állandók valamint a mozgófázis pH-jának függvényében számíthatók [52].

1.3.2.4. Latex modell

Latex-alapú pellikuláris anioncserélő állófázisokon lejátszódó retenciós folyamatok részletes leírását 2006-ban Horváth és Hajós publikálta [57]. Ezen modell, a lineáris oldószererősségi modellt alapul véve az általánosan ismert ioncsere mellett a szulfonált réteggel töltésegyensúlyban lévő anioncserélő helyeken lejátszódó ionpárképződési/disszociációs és ioncsere reakciókat is figyelembe veszi (1.47).

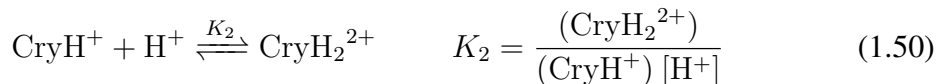
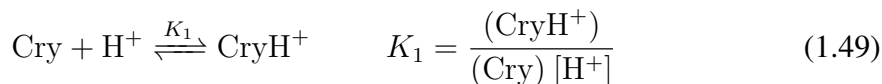
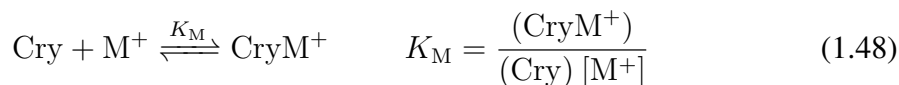
$$k_A = K_A \frac{V_s}{V_m} \left[\left(\frac{w Q_{tot}}{1 + K_{OH} [OH^-]} \right)^x + \left(\frac{(1-w) Q_{tot}}{K_{OH} [OH^-]} \right)^x \right] \quad (1.47)$$

A fenti egyenletben szereplő ún. *súlytényező* (w) a latex réteg és az alatta található szulfon réteg töltéssűrűségétől függő paraméter, melynek értéke különböző típusú ioncserélőkre eltérő lehet. Latex típusú töltetek esetén, az elválasztandó mintaion álló- és mozgófázis közötti megoszlása a két kötőhely típuson végbemenő egyensúlyi folyamatok összegeként írható fel [57].

1.3.2.5. Kriptand modell

Egyértékű minta anionok, makrociklus alapú anioncserélő állófázison történő retenciójának leírására Hajós és munkatársai 2007-ben publikálták az ún. kriptand modellt [58]. Ezen modell az állófázison lejátszódó komplexképződési, protonálódási és ioncsere-egyensúlyi folyamatokat együttesen veszi figyelembe az adott mintaion retenciós tényezőjének számítása során.

A makrociklikus gyűrűt tartalmazó, kriptand funkciós csoporttal rendelkező anioncserélő állófázison lejátszódó komplexálódási és protonálódási reakciók, illetve azok egyensúlyi állandói az alábbi (1.48), (1.49), (1.50) egyenletekkel írhatóak le.



ahol Cry az állófázison lévő szabad és ioncsere szempontjából inaktív kriptand csoportokat, M^+ a mozgófázis fémiont, míg () és [] az állófázison kötött illetve a mozgófázisban lévő szabad ionformákat jelölik.

A protonálódás vagy komplexálódás révén létrejött aktív anioncserélő helyeken lejátszódó ioncsere-egyensúlyi reakciók alapegyenletei az alábbiak.



A modell, tekintettel az anioncsere-kromatográfiában alkalmazott elúciós pH tartományra ($\text{pH} > 10$), nem számol a kriptand funkciós csoport kétszeresen protonált formájának jelenlétével. A kriptand modell, az állófázis ioncserekapacitásának (Q) leírására az alábbi (1.55)

$$Q = (\text{Cry}) + (\text{CryH}^+) + (\text{CryM}^+) + (\text{CryH}-\text{A}) + (\text{CryH}-\text{OH}) + (\text{CryM}-\text{A}) + (\text{CryM}-\text{OH}) \quad (1.55)$$

összefüggést adja, mely az inaktív, aktív de szabad, valamint protonált és komplexált, mintaiont illetve mozgófázis elleniont kötő formák összegeként definiálja az állófázis teljes ioncserekapacitását. A minta anion megoszlási hányadosának korábbi leírását adó (1.1) egyenlet a kriptand modellben az alábbiak (1.56) szerint módosul.

$$D_A = \frac{(\text{A}^-)}{[\text{A}^-]} = \frac{(\text{CryM}-\text{A}) + (\text{CryH}-\text{A})}{[\text{A}^-]} \quad (1.56)$$

Az (1.48–1.54) összefüggések ismeretében, (CryH–OH) tagot elhanyagolva az (1.55) egyenletet (Cry)-ra rendezve a mintaanion retenciós tényezője kriptand állófázison a

$$k = \frac{V_s}{V_m} Q \frac{K_M K_{M-A} [M^+] + K_1 K_{H-A} [H^+]}{1 + K_1 [H^+](1 + K_{H-A} [A^-]) + K_M [M^+](1 + K_{M-A} [A^-]) + K_{M-OH} [OH^-]} \quad (1.57)$$

összefüggéssel adható meg, ahol K_M , K_{M-A} , K_{H-A} és K_{M-OH} kísérletileg meghatározandó, a mozgófázis komplexálódó fémionjának minőségétől függő paraméterek, valamint $[M^+] = [OH^-]$ [58].

1.3.2.6. Retenció leírása gradiens ioncsere-kromatográfiában

Az előzőekben bemutatott modellek a vizsgált komponens retenciójának előrejelzésére izokratikus körülmények mellett használhatóak. Olyan esetekben, ahol nagyszámú, széles retenciós tartományban eluálódó komponens elválasztása a feladat, célszerű különböző gradiens programok alkalmazása. A mozgófázis hajtóerejének az elúció alatt történő növelésével jellemzően jobb felbontás, nagyobb csúcskapacitás (csúcskompresszió jelensége) és rövidebb analízisidő érhető el. A gradiens elválasztást leggyakrabban lineáris vagy lépcsős, ritkábban konvex vagy konkáv gradiens profil szerint valósítják meg. Mivel a kromatográfiás oszlop az adott mozgófázis összetételt előállító egységhez nem közvetlenül kapcsolódik, ezért ún. gradiens késési idővel kell számolni. Az új eluens összetétel oszlopra érkezéséhez szükséges idő alatt izokratikus körülmények uralkodnak, mely kis retenciójú komponensek esetén kihasználható azok megfelelő felbontására. A gradiens késés hatása szükség esetén, késleltetett injektálást alkalmazva kiküszöbölhető [59].

A komponensek gradiens körülményekre mutatott retenciójának leírására szolgáló legegyszerűbb modellt Rocklin és munkatársai (1987) dolgozták ki [60] a lineáris oldószer-erősségi modell (1.43) átalakításával. A gradiens elúciót leíró (1.58) összefüggés bal oldalán szereplő tag, mely izokratikus körülmények között megegyezik a retenciós tényezővel (k), figyelembe veszi, hogy gradiens elválasztás esetén a retenció az eluens koncentrációval folyamatosan változik.

$$\lg \frac{V_R - V_m}{V_m} = \lg C_g - \frac{x}{x + y} \lg R_g \quad (1.58)$$

A fenti egyenletben szereplő V_R és V_m a retenciós és holtterfogatot, R_g pedig a gradiens meredekségét, az adott elúciós térfogatra jutó koncentráció változást (mM/mL) írja le. C_g , x és y az (1.43) egyenletben ismertetett paraméterekkel analóg módon értelmezhető.

Az izokratikus illetve gradiens körülményekre vonatkozó, lineáris kapcsolatot leíró összefüggéseket közös alakra hozva az alábbi egyenleteket kapjuk.

$$\lg k_{\text{iso}} = a_{\text{iso}} - b_{\text{iso}} \lg[E] \quad (1.59)$$

$$\lg k_{\text{grad}} = a_{\text{grad}} - b_{\text{grad}} \lg R_g \quad (1.60)$$

ahol "iso" és "grad" indexek az izokratikus illetve gradiens körülményekre utalnak. Fontos megjegyezni, hogy a kezdeti eluens koncentrációt változtatva az a_{grad} és b_{grad} konstansok értéke is változik, mely jelentősen korlátozza a modell használatát [61].

1974-ben Jandera és Churáček [62] az alábbi leírását adta a gradiens retenciónak (1.61).

$$t_{R,g} = \frac{1}{u_0} \left[\frac{1}{B_g} \left[(z_g b_{\text{iso}} + 1) B_g a_{\text{iso}} t_0 u_0 + c_0^{(z_g b_{\text{iso}} + 1)/z_g} \right]^{1/(z_g b_{\text{iso}} + 1)} - \frac{c_0^{1/z_g}}{B_g} \right] + t_0 \quad (1.61)$$

$$B_g = \frac{R_g}{u_0}$$

ahol $t_{R,g}$ a komponens gradiens körülmények között mért retenció ideje, u_0 a mozgófázis áramlási sebessége, B_g a normalizált gradiens meredekség (mM/mL), z_g a gradiens profilt leíró paraméter (lineáris gradiens: $z_g = 1$), c_0 a kezdeti eluens koncentráció, t_0 a holtidő, a_{iso} és b_{iso} pedig az izokratikus körülményekre meghatározott paraméterek. Az elméletet normál-fázisú adszorpció, illetve ionkromatográfias gradiens elúcióra dolgozták ki. A modellt később Baba és munkatársai [63] sikeresen adaptálták polifoszfátok gradiens ionkromatográfias elválasztásának modellezésére.

Komplex, izokratikus és gradiens lépéseket egyaránt tartalmazó gradiens elválasztások leírására 2008-ban Shellie és munkatársai [61] dolgoztak ki elméleti modellt, melyben a teljes retenció időt az egyes lépcsőkre külön-külön számított retenció idők összegeként definiálták (1.62).

$$t_R = t_{r_n} + \sum_{1}^{n-1} t_{\text{step}_x} \quad (1.62)$$

ahol t_{r_n} az utolsó, n-edik gradiens szakasz, t_{step_x} pedig az azt megelőző, x-edik gradiens lépcső végén kialakuló retenció időt jelöli. Az egyes retenció idők az adott lépcső profiljától függően az (1.59) izokratikus vagy (1.61) gradiens egyenletek segítségével kerülnek kiszámításra. Adott gradiens szakaszra a kezdeti (t_{step_0}) érték minden esetben az azt megelőző lépcsőre számított retenció idő, a legelső szakasz esetén pedig a rendszer holtidő.

Bár gradiens elúcióval élesebb csúcsok érhetőek el, az elválasztás hatékonyságát meghatározó csúcshélesség modellezése jelentősen bonyolultabb, mint izokratikus esetben. A Snyder és munkatársai (1979) [64], valamint Jandera és Churáček (1974) [62] által leírt modellek jellemzően alábecsülik a gradiens körülményekre mért tényleges csúcshélessé-

séget. Előbbi egy a gradiens meredekséghez kötődő csúcskompressziós faktorról számol, míg utóbbi az izokratikus körülmények esetén mért tányérszámot és az oszlopból kilépő komponens retenciós idejét veszi alapul. Egy "univerzális", az izokratikus és gradiens elválasztásokban egyaránt alkalmazható összefüggést Shellie és munkatársai (2008) publikáltak, mellyel az elválasztás hatékonyságát meghatározó csúcshatárérték (1.63) összefüggés alapján egyszerűen számítható.

$$W = \frac{4 t_R}{\sqrt{N_{\text{init}}}} \left(\frac{t_R}{t_{R,\text{init}}} \right) \quad (1.63)$$

ahol t_R az adott elúciós profilnak megfelelően számított retenciós idő, $t_{R,\text{init}}$ és N_{init} pedig a kezdeti mozgófázis koncentrációjánál, izokratikus körülményekre mért retenciós idő illetve tányérszám. Az egyenlet első fele a csúcshatárértéket, második tagja pedig a csúcskompressziót fejezi ki. Izokratikus elválasztásokra vonatkozóan, ahol t_R és $t_{R,\text{init}}$ megegyezik, visszahozzuk az általánosan ismert (1.4) összefüggést [61].

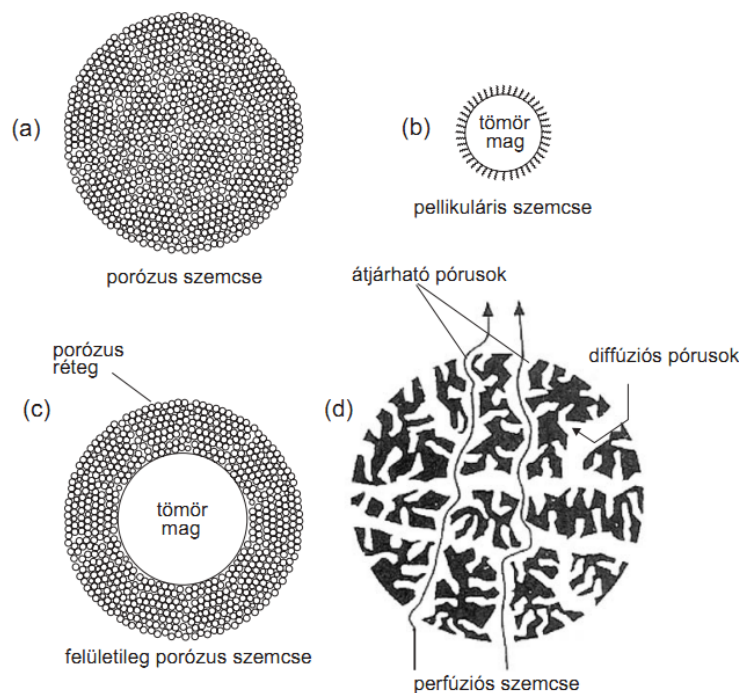
1.4. Folyadékkromatográfias kolonnák jellemzése

A vizsgálandó komponensek egymástól és a mintamátrixtól való elkülönítése a folyadékkromatográfias oszlopban történik. A mintaalkotók elválasztásának hatékonyságát elsősorban a kolonna geometriája (átmérő × hossz), valamint az oszloptöltet fizikai és kémiai tulajdonságai határozzák meg.

Az alábbiakban elsőként a folyadékkromatográfias töltetek legfontosabb fizikai és mechanikai tulajdonságait ismertetem, majd azt követően kitérek azok kémiai jellemzésére.

1.4.1. Folyadékkromatográfias oszloptöltetek fizikai szerkezete

A folyadékkromatográfias töltetek egy ún. *hordozóból* (merev váz), továbbá az annak felületén – valamilyen fizikai vagy kémiai módon – kialakított *állófázisból* állnak. A töltetanyag jellemzően szemcsés vagy monolit felépítésű. Előbbiek szabályos gömb alakú, vagy szabálytalan formájú szemcsékből állnak, míg utóbbiak esetében egybefüggő, jól átjárható "lyukacsos" közegről beszélünk. A szemcsék teljesen porózus, felületen porózus (= tömörmagvú / héjszerkezetű / szabályozott felületi porozitású), pellikuláris, valamint perfúziós szerkezetűek (1.4.1. ábra) lehetnek.



1.4.1. ábra. Különböző szerkezetű folyadékkromatográfias töltet szemcsék [4].

Legszélesebb körben a *teljesen porózus* töltetek ($d_p = 1,5-5 \mu\text{m}$) terjedtek el, melyek szerkezetükből adódóan nagy kapacitással rendelkeznek, továbbá a kiforrott gyártástechnológiának köszönhetően számos változatban elérhetőek.

A *pellikuláris töltetek* ($d_p = 1,5-2,5 \mu\text{m}$) tömör magból és azt körülvevő – az anyagátadásra nézve kedvező – vékony állófázis rétegből felépülő szemcséket tartalmaznak. Az alacsony fajlagos felület eredményeképpen (főleg makromolekulákra) hatékonyabb elválasztást, ezzel egyidejűleg azonban kis kapacitást biztosítanak, mely utóbbi következtében nyomnyi szennyezők vizsgálatára nem alkalmasak.

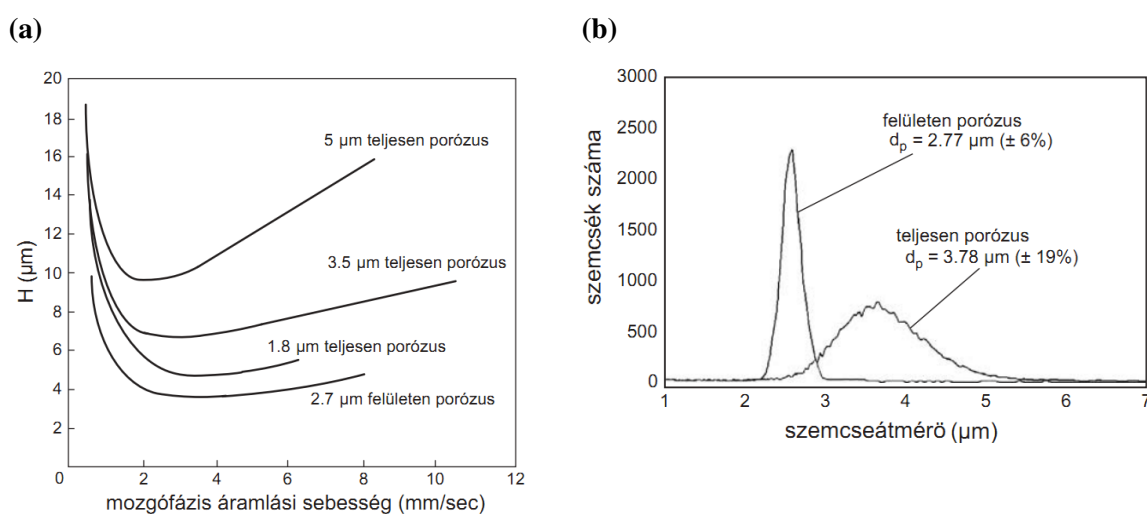
A *felületen porózus* töltetek esetében egy tömör mag és azt körülvevő porózus réteg ($0,25-0,5 \mu\text{m}$) alkotja a szemcsét ($2-5 \mu\text{m}$). Ezen töltetek használatával, a nagyobb fajlagos felületnek köszönhetően növekednek a retenciós idők, valamint az injektálható mintamennyiség is nagyobb mint pellikuláris töltetek esetén. A teljesen porózus szemcsékhez képest tapasztalható gyorsabb és hatékonyabb elválasztás a tömör mag kialakításával elérhető diffúziós úthossz csökkenés eredménye.

A leginkább makromolekulák preparatív elválasztásában használt *perfúziós töltetek* ($d_p = 10 \mu\text{m}$) jelentősen nagyobb pórusátmérőkkel jellemezhetők, mint a fent említett fázisok ($d_{\text{pore}} = 8-30 \text{ nm}$). A szemcse teljes átjárhatóságát biztosító (perfúziós) makropórusokban ($400-800 \text{ nm}$), valamint a nem átjárható, zsákutcaszerű (diffúziós) mezopórusokban ($30-100 \text{ nm}$) az állófázisbeli anyagátadást jelentősen elősegíti a mozgófázis nagyobb sebességgel való áramoltatása.

A fentiek alapján elmondható, hogy a töltet porozitása, a pórusok jellege és átmérője, valamint a szemcsék fajlagos felülete egyaránt meghatározza az adott oszlop – molekula-

méret és injektálható mintamennyiség tekintetében való – alkalmazhatóságát. Könnyen belátható, hogy a pórusok átmérőjének csökkenésével növekszik a mintakomponensek által elérhető fajlagos felület, azaz a fázisarány, mely a retenció és a kapacitás növekedését eredményezi. 8-12 nm átlagos pórusátmérővel rendelkező tölteteket (fajlagos felület: 150-400 m²/g) leggyakrabban a < 10 000 Da molekulaméretű komponensek esetén alkalmaznak. A > 10 000 Da molekulákra – a pórusdiffúziós gátlás és az ezzel összefüggésben lévő hatékonyságcsökkenés elkerülése érdekében – a 15-100 nm pórusátmérőjű (5-150 m²/g) szemcsékkel töltött oszlopok használata javasolt [4].

A folyadékkromatográfiai oszlop hatékonyságára a legjelentősebb hatást a töltétszemcsék átmérője, valamint a szemcseméret eloszlás gyakorolja (1.4.2. ábra).



1.4.2. ábra. Az oszlophatékonyság (a), valamint a szemcseméret eloszlás (b) alakulása különböző szerkezetű és átmérőjű töltétszemcsék esetén [4].

A szemcseméret eloszlás leírására jól alkalmazható a lognormális eloszlás, mely esetben a valószínűségi sűrűségfüggvény az (1.64a) és (1.64b) összefüggésekkel adható meg [65].

$$f_{r_p}(r_p; \mu_{r_p}, \sigma_{r_p}) = \frac{1}{r_p \sqrt{2\pi} s} \exp\left(-\frac{(\ln(r_p) - m)^2}{2s^2}\right) \quad (1.64a)$$

$$m = \ln\left(\frac{\mu_{r_p}^2}{\sqrt{\mu_{r_p}^2 + \sigma_{r_p}^2}}\right) \quad \text{és} \quad s = \sqrt{\ln\left(1 + \frac{\sigma_{r_p}^2}{\mu_{r_p}^2}\right)} \quad (1.64b)$$

ahol μ_{r_p} és $\sigma_{r_p}^2$ a lognormális eloszlás várható értékét és varianciáját jelöli.

A 2000-es évektől egyre inkább elterjedtek a 3 μm alatti szemcseátmérővel rendelkező teljesen porózus töltetek, melyekkel – a korábban használt 5 mikronos fázisokhoz képest – rövidebb analízisidő és kisebb csúcshélesedés vált elérhetővé. A 3 μm -nél kisebb töltétszemcsék adta lehetőségek hatékony kihasználása érdekében azonban a folyadékkromatográfiai rendszer fejlesztése is szükségessé vált, egyrészt a kolonnán kívüli sávszélesítő hatások csökkentése, másrészt a nagyobb nyomás biztosítása irányába [4].

Az elmúlt évtizedben megjelent $2\ \mu\text{m}$ alatti szemcseátmérőjű kolonnák használata jelentősen magasabb nyomásteljesítményű (1000-1300 bar) készülékeket igényel, mellyel összefüggésben ez a technika az ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfia (UHPLC = ultrahigh-performance liquid chromatography) elnevezést kapta [66]. Ezen rendszerek, a hagyományos készülékekhez képest 5-10-szer gyorsabb elválasztást tesznek lehetővé, melynek köszönhetően jelentősen csökken az oldószerfelhasználás, azonban magas piaci árak következtében széles körben egyelőre nem terjedtek el [67].

Az úgynevezett "fused-core" technológiával (Fused-Core[®] technology, Advanced Materials Technology, Inc.), felületükön porózus réteggel kialakított tömörmagvú töltetek 2006-ban jelentek meg. Kiemelkedő hatékonyságuknak, és a hagyományos HPLC rendszerek által biztosított nyomáson (300-400 bar) való alkalmazhatóságuknak köszönhetően használatuk igen elterjedt [68, 69].

A héjszerkezetű töltetek porózus fázisoknál jelentősen jobb hatékonyságát a különböző, sávszélesedést okozó folyamatok visszaszorítása eredményezi. A nagyobb szemcseátmérőnek köszönhetően homogénebb töltetanyag alakítható ki, melynek révén egyenletesebb, szinte örvénydiffúzió mentes áramlás jön létre a szemcsék között, így közel 40%-kal csökken ezen folyamat sávszélesedéshez való hozzájárulása [70, 71]. Mivel az összpórustér fogat kisebb mint teljesen porózus töltetek esetén, ezért a longitudinális diffúzió okozta sávszélesedés is csökken (közel 30%-al). Annak köszönhetően, hogy a mintamolekulák számára csak a tömör mag felületén kialakított vékony porózus réteg bejárható, a diffúziós úthosszak csökkenésével gyorsabb az állófázison történő anyagátadás, mely szintén meghatározó az oszlopban kialakuló sávszélesedés tekintetében [72, 73]. A tömörmagvú illetve a teljesen porózus töltetek esetében az anyagátadás sebességével kapcsolatban tapasztalható különbségek leginkább nagyméretű molekulák (pl.: proteinek), valamint nagy térfogatú alkalmazása esetén szembetűnőek [74].

Az első "fused-core" technológiával előállított szemcsékkel töltött oszlopok a Halo[®] (Advanced Materials Technology, Inc.) terméknevel kerültek forgalomba. Ezen, kismolekulák elválasztására fejlesztett töltetek ma már nagymolekulák (peptidek, proteinek, biomolekulák) elválasztására alkalmas pórusmérettel és különböző szemcsemérettel is elérhetőek [75–77]. A leginkább elterjedt, 2,6 mikronos tömörmagvú fázisok által biztosított elválasztási sebesség és hatékonyság a $< 2\ \mu\text{m}$ teljesen porózus töltetknél tapasztalhatóhoz hasonló, azonban azokkal ellentétben, az alacsony nyomásesés miatt előbbiek hagyományos HPLC rendszerekben (max. 300 bar) is használhatóak [72, 78, 79].

Jelenleg számos gyártó kínál $2\text{-}3\ \mu\text{m}$ alatti szemcseátmérőjű héjszerkezetű oszlopokat széles állófázis (C_{18} , C_8 , fenil-hexil, pentafluorofenil (PFP), bifenil és HILIC) választék mellett. A legismertebb termékcsaládok az Accucore (Thermo Fisher Scientific), Ascen-tis Express (Sigma Aldrich), Cortecs (Waters), Halo (Advanced Material Technologies), Kinetex (Phenomenex), és Poroshell (Agilent Technologies) [66]. 2013 óta már elérhetőek $1,3\ \mu\text{m}$ -es tömörmagvú szemcsékkel töltött, C_{18} -as állófázisú oszlopok is (Kinetex,

Phenomenex Inc.), melyek > 400 000 méterenkénti tányérszámot ígérnek. Az UHPLC rendszerek használata a kis szemcseátmérőjű töltetek (1,3-1,7 μm) esetén nemcsak a nagy nyomásesés, hanem a kolonna hatékonyságát esetlegesen csökkentő oszlopon kívüli sáv-szélesítő hatások elkerülése is indokolja.

1.4.2. Folyadékkromatográfias oszloptöltetek kémiai szerkezete

A mechanikai és fizikai tulajdonságok mellett a töltetek kémiai karakterisztikája is fontos szempont az adott feladatra alkalmas oszlop kiválasztásánál. A *hordozó* anyaga alapvetően a pH, nyomás és hőstabilitás szempontjából meghatározó, míg az *állófázis* kémiai szerkezete a kolonna szelektivitását, az elválasztható mintakomponensek körét adja meg.

Hordozók és állófázisok

Jelenleg a szilika vagy polimer alapú töltetek a leginkább elterjedtek, de léteznek szervesen hordozót tartalmazó oszlopok is.

A *szilika* hordozók között elkülöníthetünk tiszta szilika, szerves ill. szervesen hordozót tartalmazó szilika, valamint hidrid-szilika típusúakat [5]. A szilika alapú töltetek leginkább a HPLC technikákban terjedtek el. Mechanikai szilárdságuk mellett szerves oldószerekkel és vízzel is kompatibilisek, továbbá nem duzzadnak/zsugorodnak az oldószerváltás során. A felületükön kialakítható különböző állófázisok (C_8 , C_{18} , fenil, ciano stb.) révén szelektivitásuk igen változatos, továbbá más hordozókkal összehasonlítva elválasztási hatékonyságuk is jelentősen nagyobb. Kedvezőtlen tulajdonságuk, hogy csak 2-8 pH tartományban használhatóak megbízhatóan és hosszú élettartammal, valamint a bázikus komponensek elválasztására – a csúcsok "tailing"-esedése következtében – kevésbé alkalmasak. A pH stabilitás a szilika felületi polimerizálásával növelhető, a bázikus komponensek elválasztása pedig nagytisztaságú szilikák alkalmazásával javítható.

A *polimer* alapú töltetek fordított-fázisú, ioncsere- és méretkizárásos kromatográfiában egyaránt előfordulnak. Leginkább a kopolimerizált, sztirol-divinilbenzol hordozók használatosak, a szubsztituált metakrilátok, polivinil-alkoholok kevésbé gyakoriak. A polimer alapú hordozók, hasonlóan a szilikához szintén derivatizálhatóak RPC (reversed-phase chromatography) ligandumokkal, továbbá ioncserélő csoportokat ($-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NR}_3^+$) tartalmazó állófázisok is kialakíthatóak. A polimer hordozók nagy előnye azok széles (0-14) pH stabilitása, valamint a nagy ionerősségű mozgófázisokkal és az erősen bázikus mintákkal való kompatibilitás. Szilika fázisokkal szembeni fő hátrányuk az alacsonyabb hatékonyság, valamint a szerves oldószerek hatására bekövetkező duzzadási / zsugorodási tulajdonságuk. A szilika és polimer alapú hordozók mind a szemcsés, mind pedig a monolit típusú töltetek esetében használhatóak.

A *szervesen* hordozók jellemzően valamilyen fém-oxid (cirkónium, alumínium, titán) magból állnak, melynek felületén polimerizációt követően, kovalensen kötik meg a meg-

felelő ligandumokat. A szerves hordozók legfőbb előnye azok magas pH, hőmérséklet és nyomás ellenállósága, azonban teljesítményük jellemzően elmarad a szilika alapú töltetektől, utóbbiakhoz hasonló hatékonyság csak nagy koncentrációban alkalmazott, speciális mozgófázis adalékokkal érhető el. A szerves hordozók másik csoportját a grafitizált szén alapú töltetek jelentik, melyek fordított- és normál-fázisú elválasztásokban egyaránt alkalmazhatóak. Ezen töltetek pH (1-14) és hőstabilitása (< 200 °C) nagy, de mechanikai ellenállóságuk alacsony. Előbbieket fordított-fázisú folyadékkromatográfiában leginkább poláros komponensek elválasztására alkalmazzák, hatékonyságuk azonban kisebb mint a hagyományos töltetek esetében, további hátrányuk pedig, hogy szelektivitásuk nehezen előrejelezhető. A grafitizált szén alapú kolonnák azonban jól használhatók sztereo- és diasztereomerek, valamint helyzeti izomerek elválasztására [4].

A hordozó felületén – kémiai vagy mechanikai úton – kialakított állófázisok elsősorban a komponensek retencióját és az oszlop szelektivitását határozzák meg, de kiemelt szerepük van a stabilitás, reprodukálhatóság, csúcsalakok és hatékonyság tekintetében is. A legtöbb állófázis valamilyen szerves ligandum, míg a felületileg nem módosított hordozók esetében az állófázis maga a hordozó szemcse felülete (pl.: normál-fázisú kromatográfia, HILIC). A folyadékkromatográfias oszloptöltetek funkcionálására leggyakrabban C₈, C₁₈ és fenil, ritkábban perfluorofenil, ciano és amino ligandumokat alkalmaznak. Proteinek elválasztására leginkább C₃, karotinoidok esetén C₃₀, méretkizárásos kromatográfiában diol, ionos és ionizálható komponensek elválasztására pedig ioncserélő funkció csoportokkal rendelkező fázisok használatosak [4].

Ionkromatográfiában a funkcionizált vagy polimerizált szilika hordozók mellett aktív ligandumokkal szintetizált, felületileg funkcionizált, valamint agglomerált gyanták, továbbá szerves fém-oxidok és szilikátok használatosak. Hatékonysági és diffúziós szempontból előnyös felületi ioncserélők szintézisét és ionkromatográfias alkalmazását elsőként publikálta Hajós és Inczedy [80]. Funkcionizáltságukat tekintve kation- és anioncserélő, valamint amfoter és ikerionos ligandumokkal rendelkező fázisok állnak rendelkezésre. Az ioncserélő töltetek fő csoportjait a 1.1. táblázat mutatja be [5].

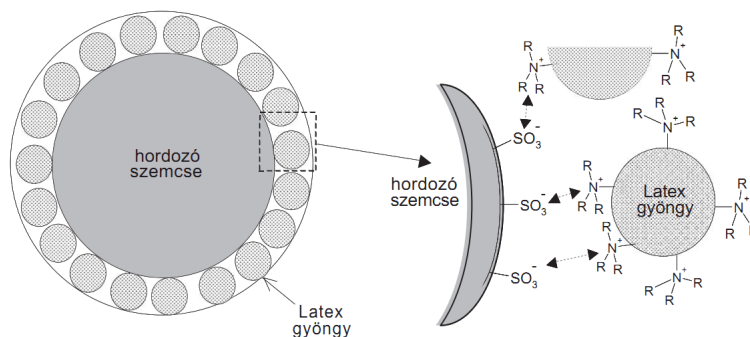
1.1. táblázat. Ioncserélő töltetek funkcionálására leggyakrabban alkalmazott ligandumok [5].

Kationcserélő			Anioncserélő		
Funkciós csoport	Típus		Funkciós csoport	Típus	
szulfonsav	-SO ₃ ⁻ H ⁺	erős	kvaterner amin	-N(CH ₃) ₃ ⁺ OH ⁻	erős
foszfonsav	-HPO ₃ ⁻ H ⁺	közepes	kvaterner amin	-N(CH ₃) ₂ (CH ₂ CH ₂ OH) ⁺ OH ⁻	közepes
karbonsav	-COO ⁻ H ⁺	gyenge	tercier amin	-NH(CH ₃) ₂ ⁺ OH ⁻	gyenge
foszfinsav	-HPO ₂ ⁻ H ⁺	gyenge	szekunder amin	-NH ₂ (CH ₃) ⁺ OH ⁻	gyenge
fenoxi-csoport	-C ₆ H ₄ - O ⁻ H ⁺	gyenge	primer amin	-NH ₃ ⁺ OH ⁻	gyenge
			szulfid	-SR ₂ ⁺ OH ⁻	gyenge

Kutatómunkám során latex-agglomerált, valamint komplexképző, makrociklikus ligandumot tartalmazó anioncserélő töltetekkel dolgoztam. Az alábbiakban ezen két speciális ioncserélő töltet szerkezetét mutatom be.

A polimer alapú fázisok HPLC területen való elterjedését alacsony mechanikai stabilitásuk és duzzadási / zsugorodási tulajdonságuk korlátozta. Az említett töltetek kedvezőtlen megítélése a latex-agglomerált polimerek megjelenésével azonban jelentősen javult. Ezen töltetek, nagyobb mechanikai szilárdsággal, kisebb duzzadási / zsugorodási hajlammal és ezek mellett kiemelkedő elválasztási hatékonysággal rendelkeznek. A latex alapú fázisok nyomásesése (3 000 - 4 000 psi) már megközelíti a hagyományos szilika alapú töltetekre jellemző értéket.

A latex-agglomerált töltetek ioncsere-kromatográfiában különösen jól alkalmazhatóak. Az ionos csoportokat tartalmazó belső magra (PS-DVB, 5-25 μm) vékony, monomolekuláris rétegben előbbivel ellentétes felületi töltésű latex szemcséket visznek fel. A latex gyöngyök (0,1 μm) felületén elhelyezkedő ionos csoportok kettős szerepe a szemcsék hordozóhoz való kötése, valamint ioncserélő helyek (0,03-0,1 mekv/g) biztosítása az elválasztandó mintakon számára [6]. Latex-alapú anioncserélők (1.4.3. ábra) esetében a polisztirol-divinilbenzol (PS-DVB) kopolimer hordozó szulfonált felülete és a teljesen aminált kvaterner csoportokat tartalmazó latex gyöngyök között kialakuló ionos kötés rendkívül stabil kémiai szerkezetet biztosít [45].

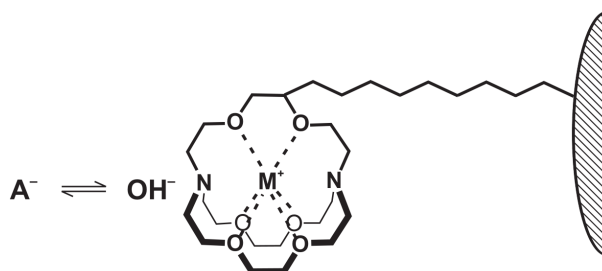


1.4.3. ábra. Latex-agglomerált anioncserélő állófázis szerkezete [5].

Ionos komponensek ciklikus poliéterekkel módosított, térhálósított polimeren való elválasztását elsőként Blasius és munkatársai [81] írták le. Előbbiek olyan töltéssel nem rendelkező makrociklikus molekulák, melyek legalább 9 atomból álló gyűrűje különböző donor atomok (O, N, S) révén szelektív komplexképző ligandumként működik. Ilyen, ioncsere-kromatográfiában is alkalmazható makrociklikus molekulák a planáris szerkezetű koronaéterek (pl.: 18-korona-6), valamint a térbeli elrendeződésű kriptandok (pl.: n-decil-2.2.2 kriptand).

Makrociklus alapú ioncserélő állófázisok a koronaéter vagy kriptand molekulák szilárd hordozón való adszorbeálásával, polimer gyanták kialakításával illetve az említett ligandumok polimer vagy szilika hordozóra kovalens kötéssel való rögzítésével állíthatók elő.

Amennyiben a ciklikus molekula kavitásába fémion komplexálódik, úgy pozitív töltésű, anioncserélőként funkcionáló ligandum jön létre (1.4.4. ábra).



1.4.4. ábra. n-decil-2.2.2-kriptand funkciós csoportot tartalmazó állófázison lejátszódó anioncsere mechanizmusa [82].

A szilárd polimer vagy szilika hordozó felületén immobilizált makrociklikus ligandumokat tartalmazó, mechanikailag stabil töltetek kationok és anionok elválasztását egyaránt lehetővé teszik. 1994-ben Lamb és munkatársai [83] olyan polisztirol gyanta alapú töltetek állítottak elő, melyekre n-decil-2.2.2 kriptand funkciós csoportokat adszorbeáltattak, azonban ezen anioncserélő állófázisok szerves oldószerekkel szemben mutatott kémiai stabilitása nem volt megfelelő. Erre a problémára Woodruff és munkatársai [84] adtak megoldást, kriptand-2.2.2 monomerek PS-DVB hordozóra történő kovalens rögzítésével, mely töltetek 2002-ben IonPac Cryptand A1 néven kerültek forgalomba.

Míg hagyományos ioncsere esetén a retenció elsősorban az ionerősségtől függ, addig makrociklus alapú anioncsere-kromatográfiában a komponensek visszatartását az ionerősség és az oszlop kapacitás együttesen határozza meg. A töltet ioncserekapacitását az aktív funkciós csoportok, makrociklus alapú fázisok esetén a felületen kötött, fémionnal komplexált ligandumok száma befolyásolja. Különböző fémionok esetén – az eltérő komplexképződési állandókkal összefüggésben – eltérő szelektivitás érhető el. A fémionok jellemzően nagyobb affinitást mutatnak kriptandokra mint koronaéterekre, melynek eredményeként a kriptand típusú töltetek nagyobb ioncserekapacitással rendelkeznek [85]. A komplexképzési hajlam növekedésével – mely szerves oldószerek jelenlétével erősíthető – az ioncserekapacitás növekedése révén jelentősen növekszik a komponensek visszatartása [85].

Anioncsere-kromatográfiás elválasztások során jellemzően alkáli-hidroxid eluensek használatosak. A makrociklikus ligandum-alkáli fémion komplexek stabilitási állandói $K^+ > Na^+ > Li^+$ irányban csökkennek. A mozgófázis fémionjának az elválasztás alatt történő lecserélésével ún. kapacitás gradiens érhető el, mely alkalmas nem polarizálható, és nagy retencióval rendelkező többértékű, valamint polarizálható anionok szimultán, hatékony elválasztására. Mivel kapacitás gradiens elúció esetén a mozgófázis koncentrációja állandó, az alapvonal torzulás, különösen szupresszor alkalmazása esetén minimális [6, 45].

2. Kísérleti rész

Alábbiakban a doktori munkám részét képező ionkromatográfiás vizsgálatok – mintaoldatbeli illetve állófázisbeli komplexképzés – során alkalmazott mérési körülményeket, eszközöket, anyagokat ismertetem.

2.1. Felhasznált eszközök, anyagok

2.1.1. Gadolinium-kelátok szerves és szervesetlen mátrixban való elválasztása latex-alapú anioncserélő állófázison

2.1.1.1. Alkalmazott berendezések, eszközök

A mérések egy Dionex DX 300 típusú ionkromatográfiás készüléken (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) történtek, amely SAGP gradiens pumpát, Dionex ACI interfészt, CHA-6 nagy nyomású kromatográfiás modult, SDM-II vezetőképességi detektort, Model 9125 injektáló egységet (Rheodyne, Rohnert Park, CA, USA), 50 μL térfogatú mintabeviteli hurkot, kémiai regenerálással (0,025 N H_2SO_4) működtetett AMMS-II (4 mm) mikromembrán szupresszort, valamint Dionex EDM eluens gáztalanító egységet tartalmazott.

A készülék vezérlése, az adatok rögzítése, továbbá a kromatogramok kiértékelése a Dionex PeakNet 5.21 kromatográfiás szoftverrel történt.

A mérések során használt mozgófázis, regeneráló és mintaoldatok elkészítéséhez szükséges ultranagy-tisztaságú (18,2 $\text{M}\Omega\text{cm}$) vizet egy 0,22 μm pórusátmérőjű, MilliPak-40 típusú szűrővel ellátott Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, MA, USA) víztisztító készülék biztosította. Az eluens oldatok levegőmentesítése ultrahangos fürdő (Sonorex RK 52, Bandelin) segítségével történt.

Az ionkromatográfiás elválasztások mellett kiegészítő ICP-OES mérésekre is sor került egy Spectroflame Modula E típusú készülék (SPECTRO Analytical Instruments Inc., Germany) segítségével, 303,284 nm detektálási hullámhossz alkalmazása mellett.

2.1.1.2. Alkalmazott oszlopok

Az elválasztások során használt Dionex IonPac AS4A-SC típusú kromatográfiás oszlop (4 \times 250 mm, $d_p = 13 \mu\text{m}$) egy alkanol kvaterner ammónium csoportokkal funkcionizált,

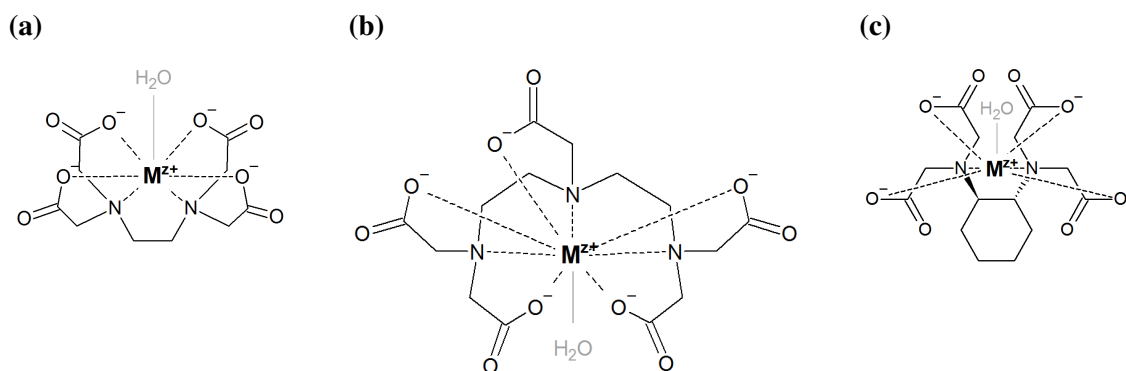
$Q = 20 \mu\text{ekv}$ összioncserekapacitású, közepes hidrofobicitású, latex agglomerált pellikuláris anioncserélő állófázist tartalmazó kolonna volt, melynek töltete 160 nm vastagságú anioncserélő latex réteggel rendelkezett.

A mintaelőkészítésként alkalmazott szilárd-fázisú extrakció Strata-SCX típusú SPE kolonnán (Phenomenex Inc.) történt, mely 200 mg, 1 mekv/g kapacitású, felületileg szulfonált erős kationcserélő töltetet tartalmazott.

2.1.1.3. Alkalmazott vegyszerek

A méréseket 3,0–4,5 mM összkoncentráció és 9,8–10,8 pH tartományokban végeztük a mozgófázisbeli karbonát (Na_2CO_3) / hidrogén-karbonát (NaHCO_3) arány megfelelő változtatásával, 1,2 mL/min térfogatáram (v) mellett. Az eluens oldatok elkészítése kristályos Na_2CO_3 és NaHCO_3 nagytisztaságú ioncserélt vízben történő oldásával történt. A szupresszor regenerálásához szükséges oldatot cc. kénsav (96 m/m% H_2SO_4) hígításával állítottuk elő.

A manuálisan injektálható minták törzsoldatai klorid (Cl^-), szulfát (SO_4^{2-}), bromid (Br^-), nitrát (NO_3^-) és foszfát (PO_4^{3-}) anionokra vonatkozóan ionkromatográfias standardokból (TraceCERT[®], Na-só 1 g/L koncentrációjú vizes oldata) készültek. A kelát-komplex mintaoldatokat kristályvizes gadolínium-klorid ($\text{GdCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$), dietilén-triamin-pentaecetsav (H_5DTPA), etilén-diamin-tetraecetsav ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$) és transz-1,2-diamin-ciklohexán-tetraecetsav ($\text{DCTA} \times \text{H}_2\text{O}$) sók felhasználásával állítottuk össze. A vizsgált fém-kelát komplexek általános szerkezete a 2.1.1. ábrán látható.



2.1.1. ábra. Különböző többfogú szerves ligandumok fém-kelát M-EDTA (a), M-DTPA (b) és M-DCTA (c) komplexeinek szerkezete. ^a

Laktát ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOLi}$), szukcinát ($\text{NaOOC}(\text{CH}_2)_2\text{COONa} \times 6 \text{H}_2\text{O}$) és maleát ($\text{NaOOCCH}=\text{CHCOONa}$) mintaoldatok elkészítése szintén sókból történt. Az eluens, a regenerálószer és a mintaoldatok alapanyagát jelentő vegyszerek egyaránt a Fluka cég termékei (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) voltak.

^aACD/ChemSketchTM 2.0 (ACD/Labs) szoftverrel készített ábrák.

2.1.2. Karboxilátok és szervesetlen anionok elválasztása makrociklus alapú anioncserélő állófázison

2.1.2.1. Alkalmazott berendezések, eszközök

A méréseket Dionex DX 500 típusú ionkromatográfias készüléken (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) végeztem, amely automata gáztalanító egységgel ellátott GP40 gradiens pumpát, termosztálható AS50 típusú automata mintaadagoló modult, 25 μL térfogatú mintabeviteli hurkot, AS50 típusú, a kolonna termosztálására alkalmas részegységet, valamint CD20 vezetőképességi detektort és 50 mA áramerősség mellett elektrolitikus regenerálással működtetett Dionex ASRS 300 (2 mm) mikromembrán szupresszort tartalmazott.

A készülék vezérlése, az adatok rögzítése és a kromatogramok feldolgozása során a Dionex PeakNet 5.21 kromatográfias szoftvert használtam.

Az eluens és mintaoldatok elkészítéséhez 0,22 μm pórusátmérőjű, MilliPak-40 típusú szűrővel ellátott Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, MA, USA) víztisztító készüléken előállított ultranagy-tisztaságú (18,2 $\text{M}\Omega\text{cm}$) vizet használtam. Az elválasztásokat 0,5 mL/min eluens térfogatáram mellett, a 3.4 fejezetben részletesen ismertetett, szisztematikusan változtatott kromatográfias körülmények között végeztem.

2.1.2.2. Alkalmazott oszlopok

Az elválasztásokat egy Dionex IonPac Cryptand A1 típusú (3×150 mm, $d_p = 5 \mu\text{m}$), n-decil-2.2.2-kriptand csoportokkal funkcionizált ($Q = 85 \mu\text{ekV}$), változtatható hidrofobicitású és ioncserekapacitású, makropórusos sztirol-divinilbenzol alapú állófázist tartalmazó kolonnán valósítottam meg.

2.1.2.3. Alkalmazott vegyszerek

Nátrium- (NaOH) illetve kálium-hidroxid (KOH) mozgófázissal történt mérések esetén kereskedelmi forgalomban kapható 0,1 M koncentrációjú ionkromatográfias eluens oldatokat használtam, míg lítium-hidroxid esetén sóból ($\text{LiOH} \times \text{H}_2\text{O}$) állítottam elő a 0,1 M töménységű mozgófázis törzsoldatot.

A vizsgálandó komponensek mindegyikére, 1 g/L-es koncentrációjú törzsoldat megfelelő mértékű hígításával készítettem el az injektálandó mintaoldatot. Szervesetlen anionok, valamint formiát és tartarát esetében ionkromatográfias standardokat (TraceCERT[®]), míg a többi karbonsav anion esetében saját, a rendelkezésre álló sókból illetve koncentrátumokból készített törzsoldatokat használtam.

Karboxilátokra vonatkozó méréseimet 0,7 mM (formiát, propionát), 0,5 mM (acetát), 0,4 mM (szukcinát, trifluoracetát (TFA), szalicilát), 0,3 mM (laktát, piruvát, oxalát, malonát, fumarát, maleát, adipát, pimelát, brómklóracetát (BCA), citrát) és 0,2 mM (tartarát, benzoát, ftalát) koncentrációjú mintaoldatokkal végeztem. Szervesetlen anionok ese-

tén 0,2 mM (NO_3^-), 0,1 mM (Cl^- , NO_2^- , Br^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}) és 0,02 mM (BrO_3^-) oldatokat injektáltam.

Az eluens és mintaoldatok készítéséhez használt vegyszerek a Sigma Aldrich (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, USA) illetve Fluka (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) cég termékei voltak.

2.2. Adatfeldolgozás, paraméterillesztés

A mérési adatok rögzítése, a kromatogramok kiértékelése és a szükséges számítások a Dionex PeakNet 5.21 (Dionex Corp.), PeakFit 4.12 és SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc.), Mathematica 9.0 (Wolfram Research Inc.), Python 3.2 (Anaconda, Inc.) és MS Office Excel (Microsoft Corp.) szoftverekkel történt.

A kromatográfias módszerrel elválasztani kívánt mintakomponensek oszlopon való retencióját befolyásoló egyensúlyi állandók meghatározására számos módszer áll rendelkezésre, melyek közül a legismertebbek az adszorpciós izotermák leírásán alapuló frontális analízis és inverz módszer. Előbbinél a nagy mintakoncentráció mellett mért elúciós térfogat, míg utóbbinál a tútelített csúcsalak szolgál az izoterma meghatározása [86].

Amennyiben ismert a mintakomponensek retenciós viselkedését leíró modell, valamint rendelkezésünkre áll egy megfelelően széles eluensösszetétel-tartomány mellett rögzített kísérleti adatbázis úgy az egyensúlyi paraméterek iterációs úton, többváltozós regressziós analízissel is meghatározhatóak.

Az iterációs analízishez szükséges, a mért retenciós adatok és a keresett paraméterek közötti kapcsolatot leíró függvény az alábbi formában írható fel.

$$y_i = f(x_i, p_1, p_2, \dots, p_j) + \delta_i \quad (2.1)$$

ahol y_i a mért retenciós tényezőt, x_i a független rendszerváltozót (eluens koncentráció, pH stb.), p_j az illesztendő egyensúlyi állandót míg δ_i a mérési bizonytalanságból adódó hibát jelöli. Munkám során a regressziós analízist a legkisebb négyzetek módszerével végeztem, mely módszer a mérési pontok és a keresett függvény közötti eltérések négyzetösszegének (2.2) minimalizálásán alapul.

$$\sum_{i=1}^n (y_i - h(x_i))^2 \quad (2.2)$$

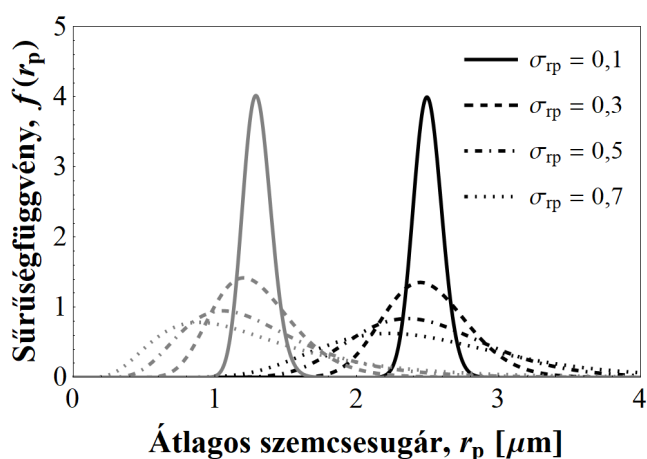
ahol $h(x_i)$ tag az illesztendő illetve az iterációs folyamat során változtatott paramétereket tartalmazó függvény. Munkám során az egyensúlyi állandók többváltozós nemlineáris regressziós analízissel történő meghatározására az Anaconda Python szoftver SciPy programcsomagját használtam. A számítások során a Levenberg-Marquardt algoritmust kezdeti értékek megadása mellett alkalmaztam.

3. Eredmények

Dolgozatom következő fejezeteiben a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias oszlopok szemcseszerkezetével (3.1.) és nyomásesésével (3.2.), valamint mintaoldatbeli (3.3.) és állófázisbeli (3.4.) komplexképződésen alapuló ioncsere-kromatográfias elválasztásokkal kapcsolatos elméleti és gyakorlati kutatómunkám eredményeit ismertetem.

3.1. Állófázis szemcseméret eloszlás hatásának vizsgálata a folyadékkromatográfias hatékonyságra

Munkám során a kromatográfia, 1.3.1.2. fejezetben részletesen ismertetett általános sebességi modelljét alkalmaztam, melynek (1.28a) alapegyenlete egyértelműen mutatja az elválasztás hatékonyságának oszloptöltet szemcsemérettől való függését. Számításaimban a valószínűségi sűrűségfüggvény (1.64a) és (1.64b) összefüggéseinek felhasználásával, a töltet szemcseméretének jellemzésére lognormális eloszlást használtam. A vizsgálni kívánt $5\ \mu\text{m}$ és $2,6\ \mu\text{m}$ átlagos szemcseátmérővel (d_p) rendelkező tölteteket az 3.1.1. ábrán látható szemcseméret eloszlással (PSD = particle size distribution) jellemeztem.



3.1.1. ábra. Szemcseméret eloszlás gyakorisága $2,5\ \mu\text{m}$ és $1,3\ \mu\text{m}$ átlagos szemcseátmérő (r_p) esetén különböző PSD szórások (σ_{r_p}) mellett.

A szemcseméret eloszlás elméleti tényérmagasságra, valamint az abból származtatható egyéb hatékonysági paraméterekre (tányérszám, felbontás, csúcskapacitás) gyakorolt ha-

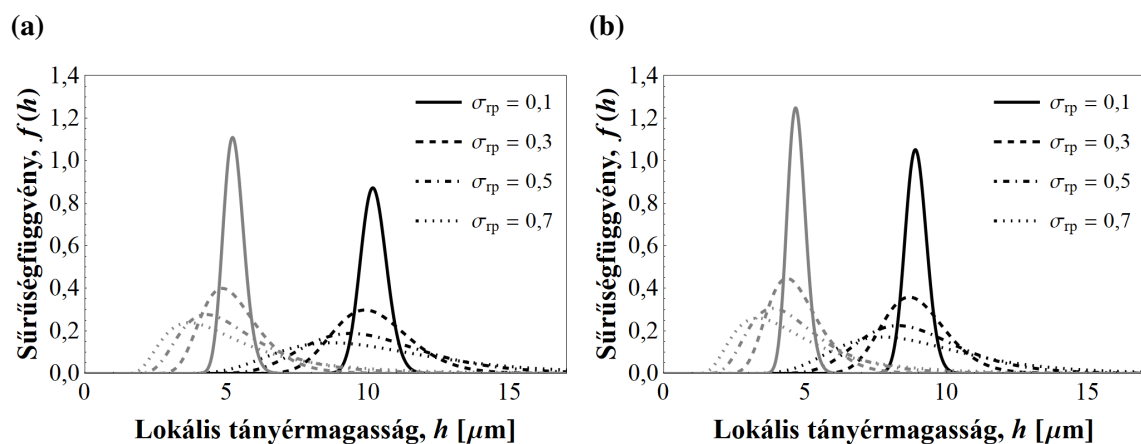
tását teljesen porózus illetve tömörmagvú szemcseszerkezetek, továbbá különböző molekulaméret tartományok (kismolekulák, közepes méretű peptidok, nagyméretű peptidok, proteinek) esetén vizsgáltam. Számításaimat az általános sebességi modell megoldásával, az (1.29a), (1.29b), (1.29c), (1.30a) és (1.30b) egyenletek felhasználásával, az 3.1. táblázatban szereplő paraméterbeállítások mellett végeztem.

3.1. táblázat. Számításhoz használt paraméterek és értékeik [25, 87].

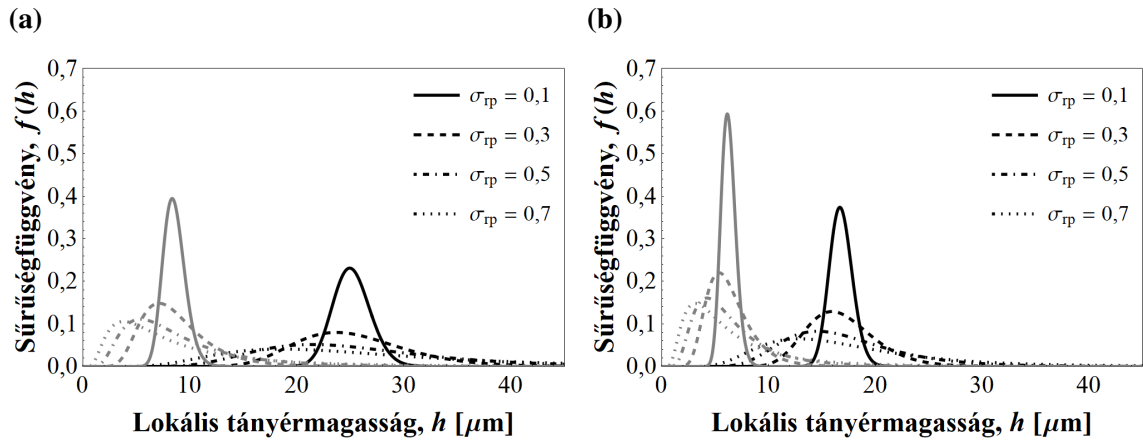
Paraméter	Kismolekulák	Közepes méretű peptidok	Nagyméretű peptidok	Proteinek
M (kDa)	$\lesssim 0,5$	$\lesssim 1,5$	$\simeq 5-10$	$\simeq 60-100$
D_m (cm ² /min)	6×10^{-4}	$1,2 \times 10^{-4}$	6×10^{-5}	$2,5 \times 10^{-5}$
γ_p	0,55	0,45	0,35	0,31
γ_e			0,6	
ϵ_p	0,4	0,28	0,13	0,05
ϵ_e			0,4	
ξ	0,08	0,21	0,32	0,69
K_a			3	
h_{eddy}			1,3	
L (cm)			15	

3.1.1. Lokális tányérmagasság eloszlás matematikai leírása

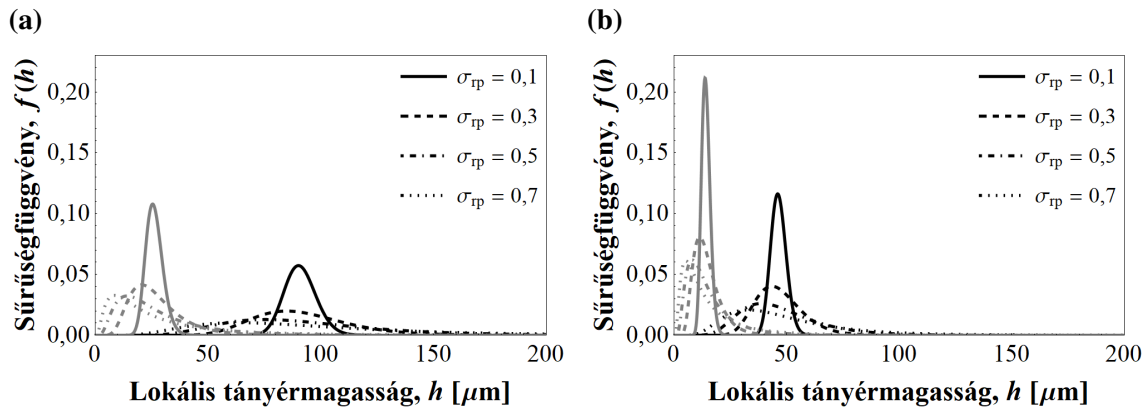
Könnyen belátható, hogy amennyiben a töltet szemcsemérete eloszlást mutat, abban az esetben a tányérmagasság is egyfajta eloszlással lesz jellemezhető. A lokális tányérmagasság (h) eloszlásokat a PSD-t leíró f_{r_p} függvényt $\mu_{r_p} = 2,5$ ill. $1,3$ várható értékek, valamint $\sigma_{r_p} = 0,1-0,7$ szórás értékek esetére megoldva, majd az általános sebességi modell r_p paraméterét az így kapott PSD függvénnyel helyettesítve számítottuk különböző molekulaméret tartományok és szemcseszerkezetek esetén (3.1.2. – 3.1.5. ábrák).



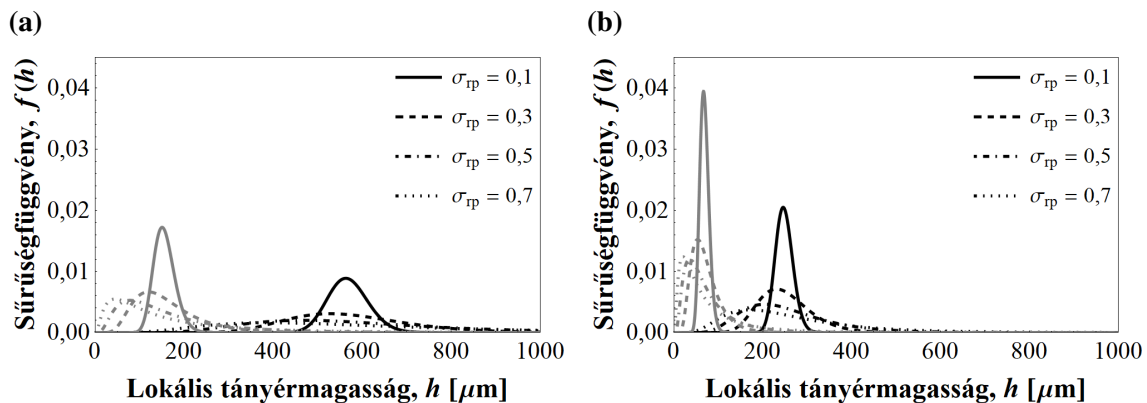
3.1.2. ábra. Lokális tányérmagasság eloszlás gyakorisága teljesen porózus (a) illetve tömörmagvú (b) töltetekre különböző PSD szórások (σ_{r_p}) mellett „kismolekulák” esetén (fekete: $d_p = 5 \mu\text{m}$, szürke: $d_p = 2,6 \mu\text{m}$, $u_0 = 20 \text{ cm/min}$, $\rho = 0,7$).



3.1.3. ábra. Lokális tányérmagasság eloszlás gyakorisága teljesen porózus (a) illetve törmörmagvú (b) töltetekre különböző PSD szórások (σ_{r_p}) mellett „közepes peptidek” esetén (fekete: $d_p = 5 \mu\text{m}$, szürke: $d_p = 2,6 \mu\text{m}$, $u_0 = 20 \text{ cm/min}$, $\rho = 0,7$).



3.1.4. ábra. Lokális tányérmagasság eloszlás gyakorisága teljesen porózus (a) illetve törmörmagvú (b) töltetekre különböző PSD szórások (σ_{r_p}) mellett „nagy peptidek” esetén (fekete: $d_p = 5 \mu\text{m}$, szürke: $d_p = 2,6 \mu\text{m}$, $u_0 = 20 \text{ cm/min}$, $\rho = 0,7$).



3.1.5. ábra. Lokális tányérmagasság eloszlás gyakorisága teljesen porózus (a) illetve törmörmagvú (b) töltetekre különböző PSD szórások (σ_{r_p}) mellett „proteinek” esetén (fekete: $d_p = 5 \mu\text{m}$, szürke: $d_p = 2,6 \mu\text{m}$, $u_0 = 20 \text{ cm/min}$, $\rho = 0,7$).

A számított görbék alapján megállapítható, hogy a lokális tányérmagasság várható értékének illetve szórásának alakulása a PSD-re jellemző változást követi. A vizsgált moleku-

lacsoportok esetén a tömörmagvú fázisok, a porózus töltetekkel összehasonlítva minden esetben szűkebb tányérmagasság eloszlást mutatnak. Előbbi azzal magyarázható, hogy a tömör mag arányának (ρ) növelése révén mind az axiális diszperziós, mind pedig a porusdiffúziós tag értéke csökken, melynek eredményeként a tányérmagasság eloszlás függvény (f_H) várható értéke és szórása is csökkenést mutat. Nagyobb átlagos szemcsemérettel rendelkező töltetek esetében ez a csökkenés jobban észrevehető.

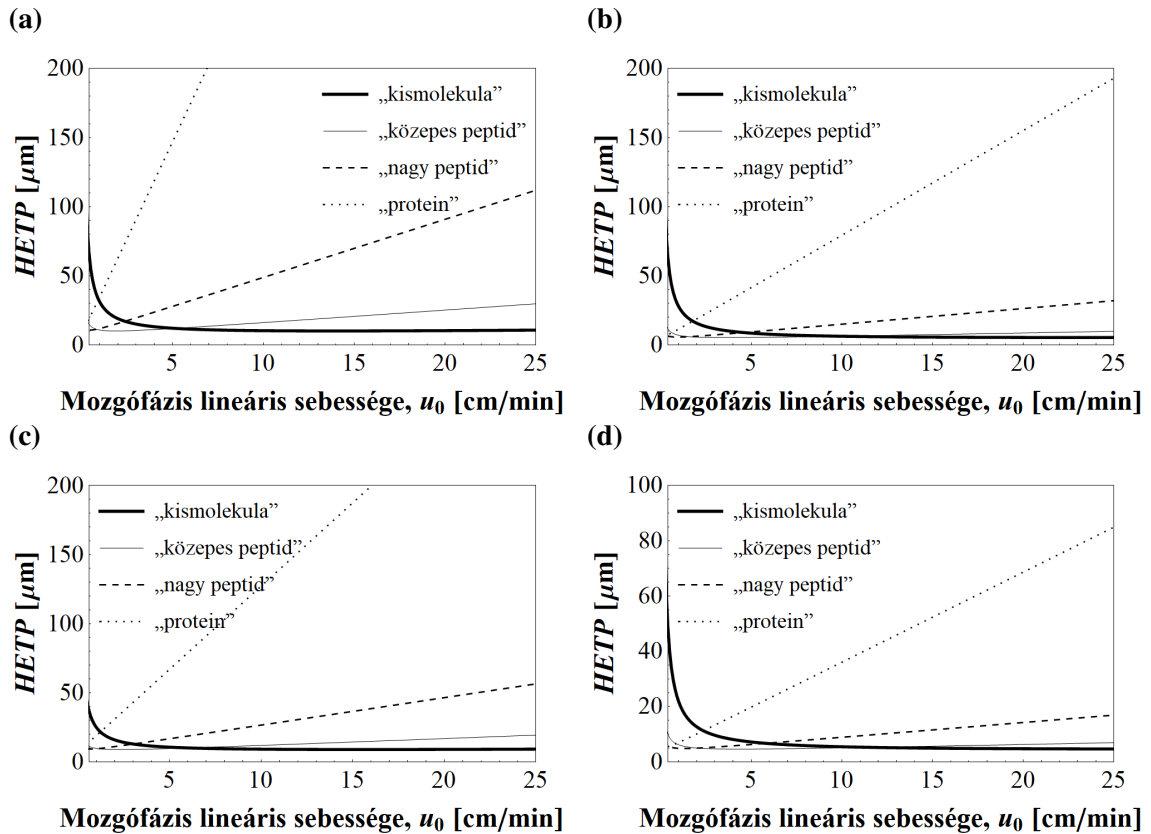
A vizsgálandó molekula méretének növekedése a molekula és az átlagos porusátmérő arányának (ξ) növekedése mellett, a molekuláris diffúziós tényező (D_m), a mezoporusok gátlási faktora (γ_p) és a szemcse porozitás (ϵ_p) csökkenését jelenti. Előbbiek, közvetlenül vagy közvetetten a külső anyagátadás (k_f) és a porusbeli diffúzió (D_p) csökkentése, valamint a zónavisszatartási tényező (k_1) növelése révén H értékének növekedését okozzák, míg ezekkel egyidőben az axiális diszperzió (D_L) csökkenése csökkenti H értékét. Látható tehát, hogy a lokális tányérmagasság eloszlás molekulamérettel összefüggő változása több folyamat komplex eredménye.

Egy kromatográfiai sáv oszlopbeli vándorlását elemi lépésekre osztva az egyes lépésekhez tartozó ún. *lokális tányérmagasságokat* összegezve megkapjuk az átlagos lokális tányérmagasságot (H_{col}), mely azonos az oszlopról eluálódó csúcsból meghatározható *elméleti tányérmagassággal* (HETP). Amennyiben a lokális tányérmagasságok folytonos eloszlással írhatóak le, úgy a mérhető elméleti tányérmagasság a lokális tányérmagasságok valószínűségi sűrűségfüggvényének (f_H) ismeretében a (3.1) alapján számítható.

$$H_{col} = \int_0^{\infty} H f_H dH \quad (3.1)$$

3.1.2. Szemcseméret eloszlás hatása az oszlop hatékonyságára

A mozgófázis lineáris áramlási sebességének (u_0) oszlopbeli sávszélesítő folyamatokra és ezáltal az elválasztási hatékonyságra gyakorolt hatása jól ismert. Míg az axiális diszperzió csökken, addig az anyagátadási folyamatok sávszélesítő hatása növekszik az áramlási sebesség növelésével. A mozgófázis áramlási sebességének az elválasztás hatékonyságára gyakorolt hatásának vizsgálata fontos és hasznos információt nyújt a kromatográfiai rendszer működéséről. Előbbieket figyelembe véve, a töltet szemcseméret eloszlásának hatásától eltekintve kiszámítottam az egyes molekulacsoportok van Deemter görbéit, melyeket a 3.1.6. ábrán ismertetek.



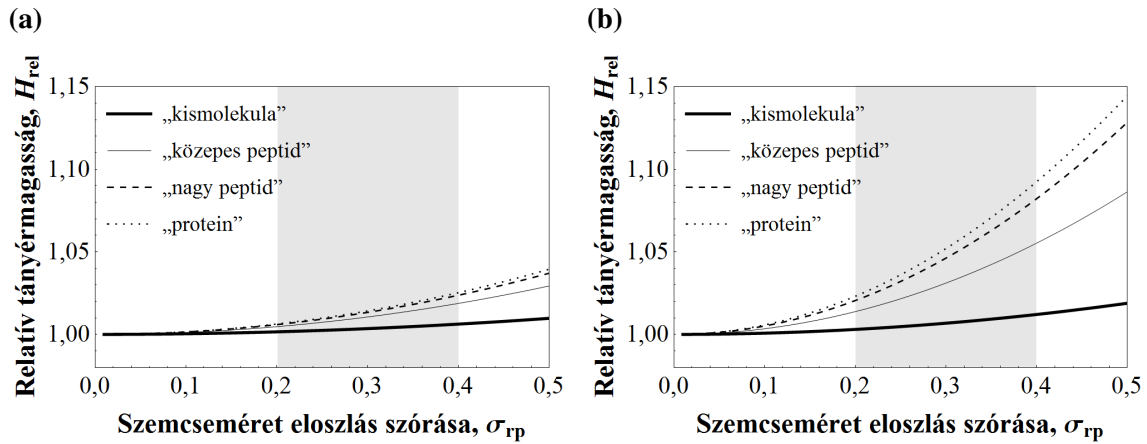
3.1.6. ábra. Eltérő molekulaméretű komponensekre számított van Deemter görbék teljesen porózus 5 μm (a) és 2,6 μm (b), valamint tömörmagvú 5 μm (c) és 2,6 μm (d) szemcseátmérőjű töltetek esetén ($\sigma_{r_p} = 0,1$).

A molekulaméret növekedésével az elméleti tányérmagasság értékek jelentős növekedését, az elválasztás hatékonyságának számottevő csökkenését tapasztaltam. A mozgófázis áramlási sebességének növelése kismolekulák esetében 0-5 cm/min tartományban kedvezően befolyásolta a HETP értékek alakulását, az áramlási sebesség további növelésének hatása elhanyagolható volt. Közepes méretű peptidok esetén a HETP értékek kismértékben növekedtek az áramlási sebesség növelésével, míg nagyméretű peptidok és proteinek esetében a mozgófázis áramlási sebességének emelése jelentős hatékonyságcsökkenést eredményezett. A HETP értékek emelkedése a tömör mag arányának növelésével illetve kisebb szemcseméret esetén kisebb mértékű volt. Egy nagyméretű peptid példáját véve, a szemcseátmérőt felére csökkentve a HETP közel negyedére, míg a tömör mag arányát nulláról 0,7-re emelve közel felére csökkenthető a HETP értéke.

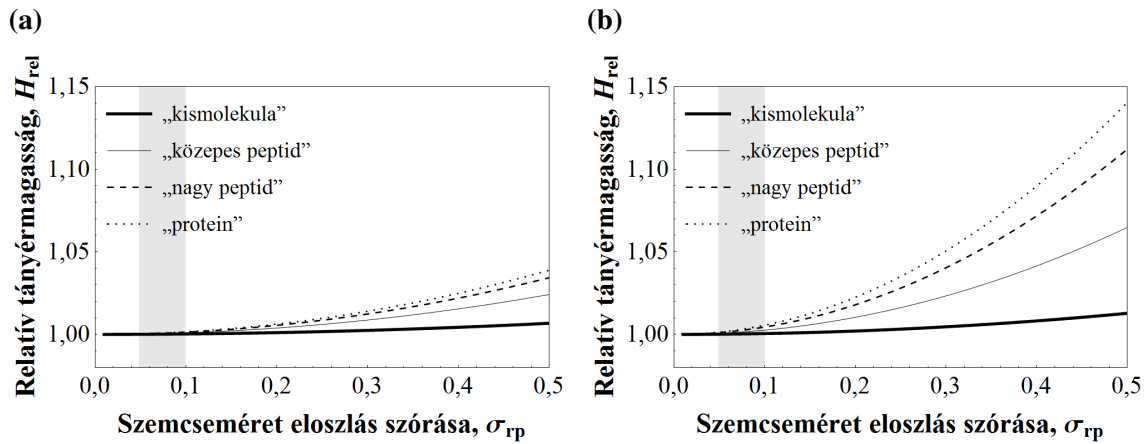
Az elméleti tányérmagasság szemcseméret eloszlástól függő alakulását, a könnyebb értelmezhetőség érdekében a relatív változás bemutatásával jellemzem. A HETP relatív értékét az adott σ^2 és $\sigma^2 = 0$ varianciájú eloszlásra számított HETP értékek hányadosaként (3.2) számítottam.

$$H_{\text{rel}} = \frac{H_{\sigma}}{H_0} \quad (3.2)$$

A szemcseméret eloszlás elválasztási hatékonyságra gyakorolt hatását $5\ \mu\text{m}$ és $2,6\ \mu\text{m}$ szemcseátmérők, porózus illetve tömörmagvú fázisok, valamint különböző PSD szórás és molekulaméret tartományokban vizsgáltam. Eredményeimet a porózus illetve tömörmagvú oszloptöltetekre jellemző gyakorlati szemcseméret szórásstartományok megjelölésével (szürke terület) a 3.1.7. és 3.1.8. ábrákon mutatom be.



3.1.7. ábra. Relatív HETP értékek alakulása a PSD szórásának függvényében $5\ \mu\text{m}$ (a) és $2,6\ \mu\text{m}$ (b) átlagos szemcseátmérőjű porózus töltetek esetén ($u_0 = 20\ \text{cm/min}$).



3.1.8. ábra. Relatív HETP értékek alakulása a PSD szórásának függvényében $5\ \mu\text{m}$ (a) és $2,6\ \mu\text{m}$ (b) átlagos szemcseátmérőjű tömörmagvú töltetek esetén ($u_0 = 20\ \text{cm/min}$).

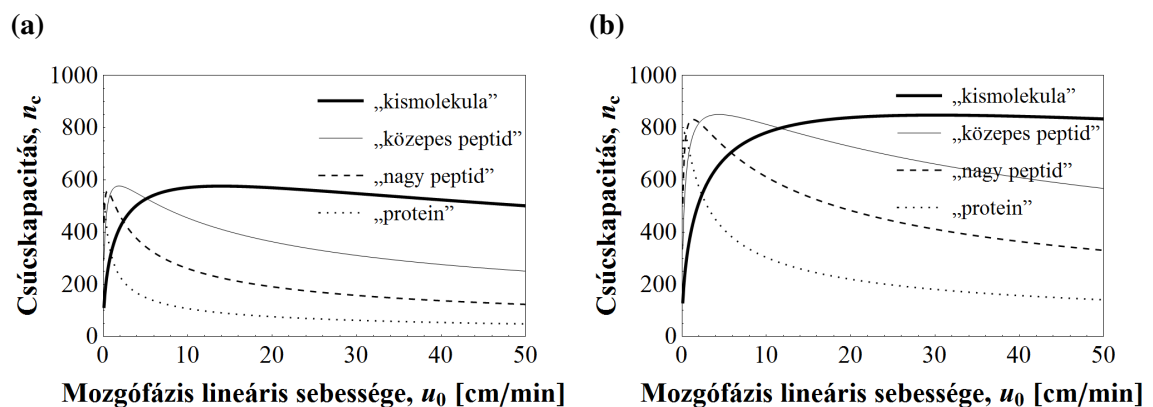
3.2. táblázat. Elméleti tányérmagasság értékek relatív változásának számszerű értéke ($\Delta\ \text{HETP}\ [\%]$) különböző molekulaméret tartományok esetén, amennyiben a PSD szórás $\sigma_{rp} = 0,0$ -ról $\sigma_{rp} = 0,7$ -re emelkedik ($u_0 = 20\ \text{cm/min}$).

Molekula csoport	$d_p = 5\ \mu\text{m}$		$d_p = 2,6\ \mu\text{m}$	
	Porózus	Tömörmagvú	Porózus	Tömörmagvú
kisméretű molekulák	1,94	1,35	3,73	2,53
közepes méretű peptidek	5,79	4,77	16,98	12,74
nagyméretű peptidek	7,30	6,76	25,23	22,03
proteinek	7,78	7,66	28,39	27,59

A 3.1.7. és 3.1.8. ábrákon látható, hogy szélesebb szemcseméret eloszlás esetén magasabb relatív HETP értékek mérhetők, mely növekedés a nagyobb molekulaméretű komponensek irányába egyre jelentősebb. Előbbi hatás az átlagos szemcseátmérő csökkenésével egyre hangsúlyosabb. A porózus és tömörmagvú fázisokat összehasonlítva a HETP értékek PSD szórás függvényében való relatív változásában nem figyelhető meg számottevő eltérés, azonban az említett töltetekre jellemző gyakorlati szórástartományok jelentősen eltérnek. Míg porózus töltetek esetében 20–40%, addig tömörmagvú fázisok esetében 5–10% szórásértékek jellemzik a töltet szemcseméret eloszlását. Előbbiket figyelembe véve a PSD hatékonyságra gyakorolt hatása tömörmagvú fázisok esetében elhanyagolható (< 1%), míg porózus töltetknél, nagyméretű molekulák esetében 10%-os relatív HETP növekedés is tapasztalható.

A PSD elválasztási hatékonyságra gyakorolt hatását a *felbontások* irányából vizsgálva előzőekhez hasonló eredményre jutunk. A teljesen porózus és tömörmagvú fázisokat összehasonlítva közel azonos tendenciát figyelhetünk meg, azonban megjegyzendő, hogy az említett szemcse szerkezetek esetén a gyakorlati szórástartományok jelentősen eltérnek (szürke sávok). Előbbit figyelembe véve a tömörmagvú töltetek használata, a gyakorlati tapasztalatokkal összhangban valóban előnyösebb. Az eredmények alapján az is megállapítható, hogy míg porózus töltetek tekintetében a szemcseméret eloszlás további csökkentése megfontolandó, addig tömörmagvú fázisok esetén azok szűk gyakorlati PSD értékére tekintettel nem érhető el számottevő hatékonyság növekedés.

Az adott analízisidő alatt elválasztható csúcsok száma, azaz a *csúcskapacitás* (n_c) egy további kromatográfiás elválasztást jellemző mérőszám (1.11), mely szintén függ a töltet szemcseméret eloszlásától. A mozgófázis áramlási sebességének csúcskapacitásra gyakorolt hatását vizsgálva, az egyes molekulacsoportokra kapott eredményeimet a 3.1.9. ábrán szemléltetem.

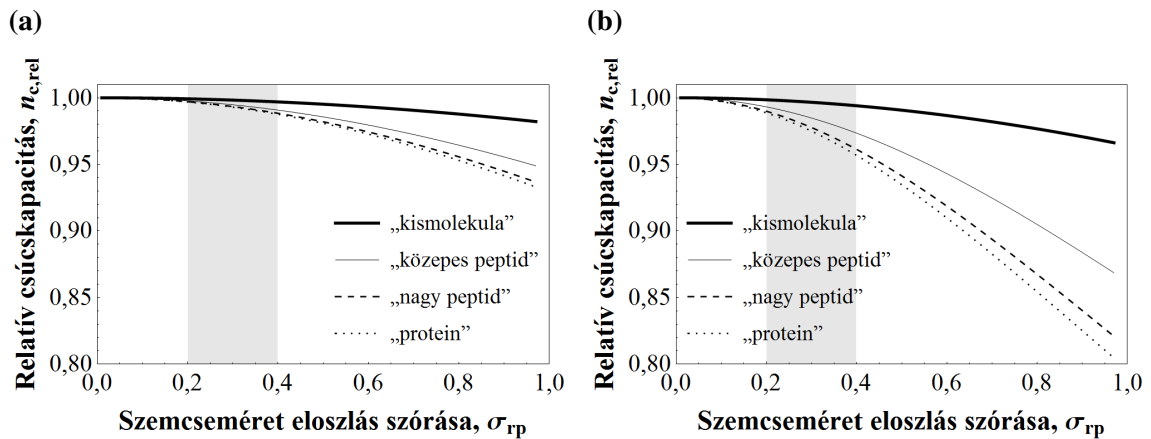


3.1.9. ábra. Abszolút csúcskapacitás értékek eltérő molekulaméretű komponensekre 5 μm porózus és 2,6 μm szemcseátmérőjű tömörmagvú töltetek esetén a mozgófázis áramlási sebessége függvényében ($L = 10 \text{ cm}$, $t_0 = 1$, $t_{\text{max}} = 10 \times t_0$).

Hasonlóan a HETP értékeknél tapasztaltakkal, a csúcskapacitás tekintetében is jelentős különbség van az egyes molekulaméret tartományba sorolható komponensek között.

Kisméretű molekulák esetén 1,5-szeres, közepes méretű peptidek és proteinek esetén 2-szeres, nagyméretű peptidek esetén közel 4-szeres csúskapacitás növekedés érhető el amennyiben 5 μm -es porózus töltet helyett 2,6 μm szemcseátmérőjű tömörmagvú töltetet alkalmazunk az elválasztás során.

Tekintettel a korábbi megállapításra, miszerint a PSD csökkentésének porózus töltetek esetén van létjogosultsága, a szemcseméret szórás hatását relatív ($n_{c,rel} = n_c(\sigma_{0,7})/n_c(\sigma_0)$) csúskapacitás tekintetében ezen töltettípus esetén mutatom be.



3.1.10. ábra. Relatív csúskapacitás a PSD szórásának függvényében 5 μm (a) és 2,6 μm (b) szemcseátmérőjű porózus töltetek esetén.

A 3.1.10. ábra alapján elmondható, hogy a töltet átlagos szemcseátmérőjének csökkenésével és a PSD szórás növekedésével egyre jelentősebb a csúskapacitás csökkenése, mely azt mutatja, hogy porózus fázisok esetén a PSD szűkítése elsősorban a kisebb szemcseméret tartományban vezethet eredményre.

Az általam alkalmazott modell paraméterkészlete lehetőséget ad további, a kromatográfias elválasztást befolyásoló tényezők (pl.: tömör mag/porózus héj arány) vizsgálatára, valamint a különböző, szemcsemérettől függő sávszélesítő hatások (pl.: axiális diszperzió, külső anyagátadási tényező) egymástól független meghatározására.

A fent bemutatott, a kromatográfias töltetek szemcseméret eloszlásának elválasztási hatékonyságra gyakorolt hatásának vizsgálatával kapcsolatos eredményeimet a [87] és [88] irodalmakban publikáltuk.

3.2. Oszlopbeli nyomásviszonyok retencióra és hatékonyságra gyakorolt hatásának vizsgálata

Az oszlopbeli nyomásviszonyok komponensek retenciójára gyakorolt hatása egyrészt a mozgófázis áramlási sebességének növekedéséhez (különösen UHPLC esetén), másrészt a komponensek adszorpció során bekövetkező moláris térfogatának megváltozásához köthető. Utóbbi jelenség elméleti (Gibbs-féle szabadentalpia, (1.33)) és gyakorlati szempontból is részletesen vizsgált és dokumentált.

Munkám során a fent említett nyomásindukálta sebesség gradiens, valamint adszorpció indukálta moláris térfogatváltozás retenciós tényezőre gyakorolt hatását az (1.37) összefüggés [1] felhasználásával tanulmányoztam. Előbbieket mellett a kromatográfias oszlop nyomásesésének elválasztási hatékonyságra gyakorolt hatását is vizsgáltam. Számításaim során a 3.3. táblázatban feltüntetett paramétereket használtam fel.

3.3. táblázat. Számítások során használt paraméterek és azok értékei.

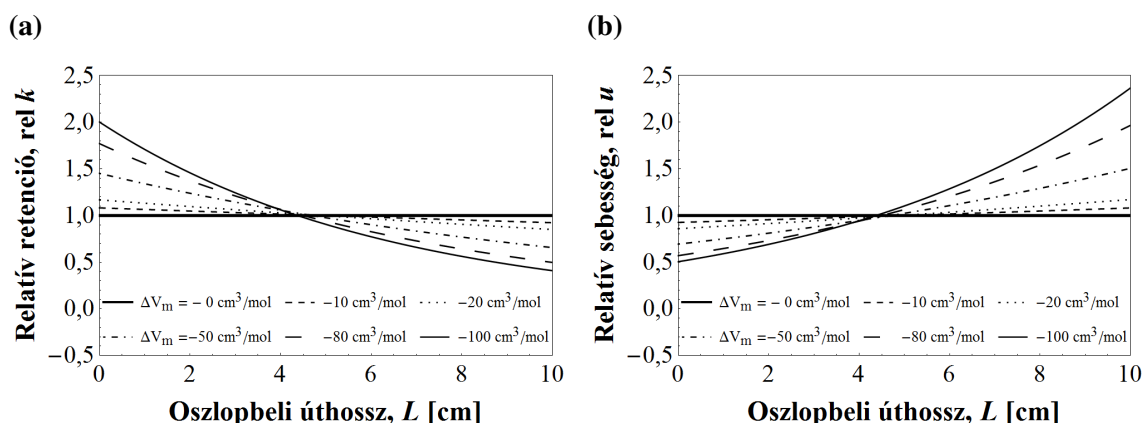
Állandó paraméter	Változó paraméter
$R = 8,314 \text{ J/mol K}$	$\Delta p = 400 - 1000 \text{ bar}$
$T = 303 \text{ K}$	$V_{inj} = 2 - 1000 \mu\text{L}$
$p_{in} = \Delta p + 2 \times 10^5$	$N = 100 - 1500$
$L = 10 \text{ cm}$	$-\Delta V_m = 0 - 100 \text{ cm}^3/\text{mol}$
$v = 1 \text{ cm}^3/\text{min}$	
$d = 2,1 \text{ mm}$	
$\epsilon = 65/100$	
$t_R = 10$	

3.2.1. A retenció alakulása az oszlopbeli nyomásesés függvényében

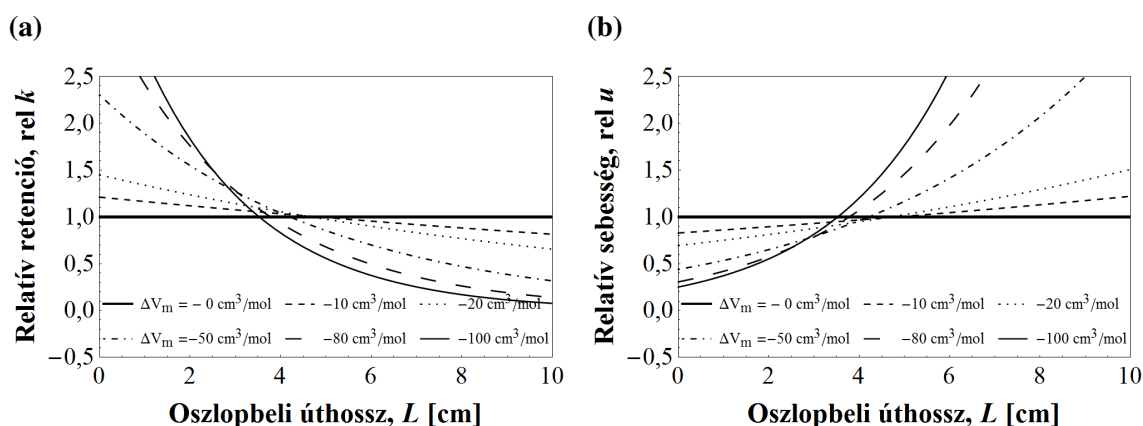
A komponens retenciója és vándorlási sebessége nyomásgradiens esetén az oszlop mentén folyamatosan változik. A retenciós tényező kezdeti, az oszlop belépési pontján jellemző értéke a (1.37) összefüggés átalakításával az alábbi formában írható fel.

$$k_0 = \left[\frac{\Delta p \Delta V_m}{R T} \right] \left[\frac{\exp\left(\frac{\Delta V_m p_{in}}{R T}\right)}{1 - \exp\left(\frac{\Delta V_m p_{in}}{R T}\right)} \right] \left[\frac{t_R u_0 - L}{L} \right] \quad (3.3)$$

Az (1.37) és (3.3) egyenletek felhasználásával meghatároztam az egyes komponensek retenciós tényezőjének és vándorlási sebességének oszlop menti alakulását. Eredményeimet a moláris adszorpció térfogatváltozást nem szenvedő komponenshez viszonyított relatív változások bemutatásával a 3.2.1. és 3.2.2. ábrákon ismertetem.



3.2.1. ábra. A komponens relatív retenció tényezőjének (a) és relatív vándorlási sebességének (b) alakulása az oszlop mentén 400 bar nyomásesés mellett különböző moláris adszorpciós térfogatváltozással (ΔV_m [cm³/mol]) jellemezhető komponensek esetén.



3.2.2. ábra. A komponens relatív retenció tényezőjének (a) és relatív vándorlási sebességének (b) alakulása az oszlop mentén 1000 bar nyomásesés mellett különböző moláris adszorpciós térfogatváltozással (ΔV_m [cm³/mol]) jellemezhető komponensek esetén.

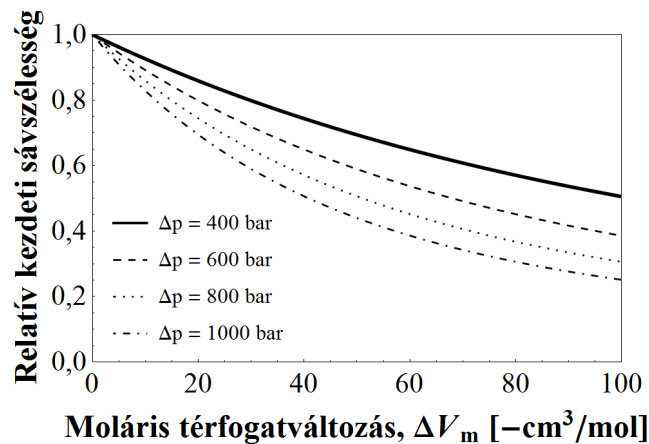
Adott komponens retenció tényezője és annak vándorlási sebessége egymással reciprok kapcsolatban áll, hiszen $u = 1/(1 + k)$, ennek megfelelően a görbék lefutása ellentétes irányú. Előbbi összefüggés szerint a vándorlási sebesség növekedésének relatív értéke kisebb, mint a retenció tényező relatív csökkenése, azonban az ábrákon ennek ellenkezőjét látjuk. Az elúciós iránynak megfelelően, az átjárandó töltetanyag térfogatának csökkenése révén kisebb lesz annak ellenállása, amely a nyomásesés mellett áramlási sebesség növekedést idéz elő. Előbbit figyelembe véve, a vándorlási sebesség növekedésének a retenció tényező csökkenését meghaladó mértéke, véleményem szerint a mozgófázis áramlási sebességének növekedésével hozható összefüggésbe. A retenció tényező oszlop menti csökkenése a komponens moláris adszorpciós térfogatváltozásának növekedésével egyre jelentősebb, az oszlopbeli nyomásesés növekedésével pedig még inkább számottevő. A számított eredmények – összhangban korábbi gyakorlati mérésekkel – azt mutatják, hogy különösen a nagyméretű molekulák (pl.: peptidok, proteinek) esetén az oszlopbeli nyomásgradiens jelentősen befolyásolja a komponensek retencióját, mely hatás az UHPLC rendszerek esetében már nem hagyható figyelmen kívül.

3.2.2. Elválasztási hatékonyság nyomásgradiens esetén

Gradiens elválasztások esetén – az általános sebességi modell kapcsán – korábban már tárgyalt (1.3.1.2. fejezet) sávszélesítő hatások mellett további tényezőkkel is számolni kell a sávprofilok (= koncentrációprofilok) alakulásának vizsgálata során. Az egyik fontos sávszélesedést okozó folyamat az injektálás. A kolonna elején kialakuló mintadugó szélessége a

$$\Delta z_{\text{inj}} = \Delta t_{\text{inj}} \frac{u_0}{1 + k_{\text{inj}}} \quad (3.4)$$

egyenlet alapján függ az injektálási időtől (Δt_{inj}), melyet az injektálandó mintatérfogat határoz meg, a mozgófázis lineáris áramlási sebességétől ($u_0 = L/t_0$), valamint a komponens kezdeti retenciós tényezőjétől (k_{inj}) [89]. A 3.2.1.b és 3.2.2.b ábrákon látható, hogy a komponens vándorlási sebessége a kolonna elején a legkisebb, melynek köszönhetően a sáv két szélé ezen a szakaszon kevésbé tud eltávolodni egymástól. Adott komponens-sáv kezdeti szélességét a moláris adszorpciós térfogatváltozást nem szenvedő ($\Delta V_m = 0$) komponenshez tartozó referencia értékhez ($\Delta z_{\text{inj}, \Delta V_m = 0}$) viszonyítva (3.2.3. ábra) látható, hogy a kezdeti sáv szélesség a nyomás és a moláris adszorpciós térfogatváltozás értékek növekedésével csökken.



3.2.3. ábra. A kolonna belépési pontján jellemző kezdeti sáv szélesség nyomás és moláris adszorpciós térfogatváltozással való kapcsolata.

Az oszlopbeli vándorlás során a koncentrációprofil alakulását a kolonna hatékonysága mellett meghatározza a mintazóna széleinek egymáshoz viszonyított haladási sebessége. Gradiens körülmények (pl.: oldószererősség, nyomás, hőmérséklet változás) esetén a sáv frontjához illetve végéhez tartozó retenciós tényezők eltérnek, ezáltal a sáv két szélé különböző sebességgel halad. Amennyiben a sávfront retenciós tényezője kisebb mint a sáv végéhez tartozó érték, úgy az izokratikus körülmények esetén jellemző kinetikai hatások által okozott sáv szélesedés további növekedése, fordított esetben pedig a sáv szélesedés csökkenése tapasztalható.

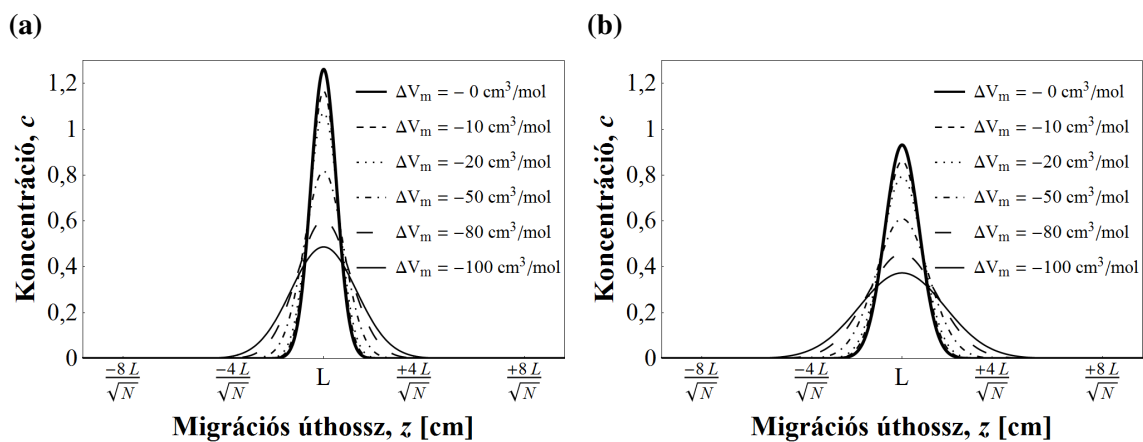
A mintazóna oszlopbeli szélesedésének modellezésére az egyensúlyi-diszperzív modellt,

a Martin-Synge algoritmus alkalmazásával oldottam meg, melynek során a látszólagos diszperziós tagot nullának (az anyagátadást végtelenül gyorsnak) tekintve, a (3.5) közönséges differenciál egyenletet minden egyes elméleti tányérra megoldva [89] számítottam az adott koncentráció profilokat.

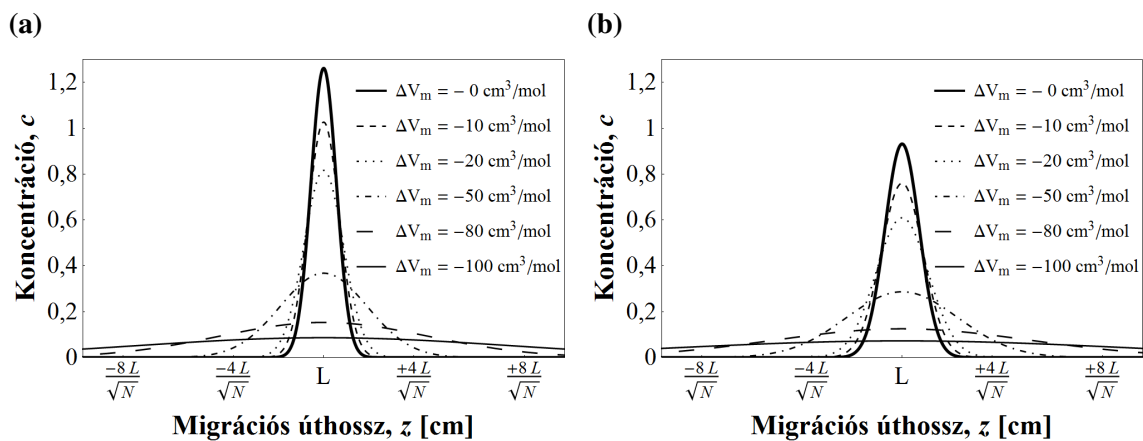
$$(1 + k) \frac{dc[t]}{dt} + u_0 \frac{c_n - c_{n-1}}{\Delta z} = 0 \quad (3.5)$$

ahol n a tányér sorszáma, c_0 pedig az injektálási profil.

A különböző nyomásesés és injektálási térfogat értékek esetén kapott sávprofilok a 3.2.4. és 3.2.5. ábrákon láthatóak.

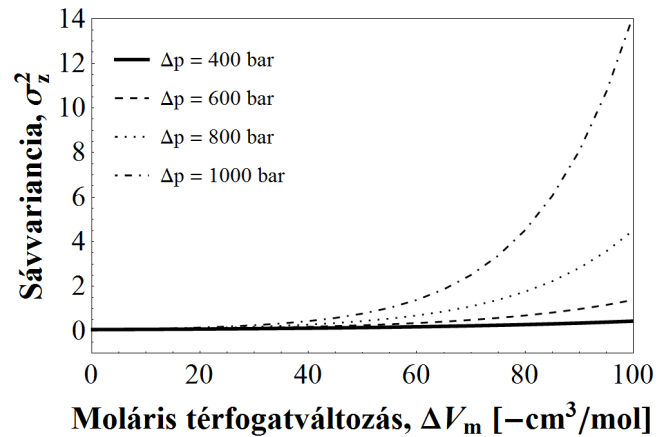


3.2.4. ábra. Koncentráció profil (c) alakulása az oszlop mentén (z) 400 bar nyomásesés esetén $2 \mu\text{L}$ (a) és $1000 \mu\text{L}$ (b) injektálási térfogatok mellett ($N = 1000$).



3.2.5. ábra. Koncentráció profil (c) alakulása az oszlop mentén (z) 1000 bar nyomásesés esetén $2 \mu\text{L}$ (a) és $1000 \mu\text{L}$ (b) injektálási térfogatok mellett ($N = 1000$).

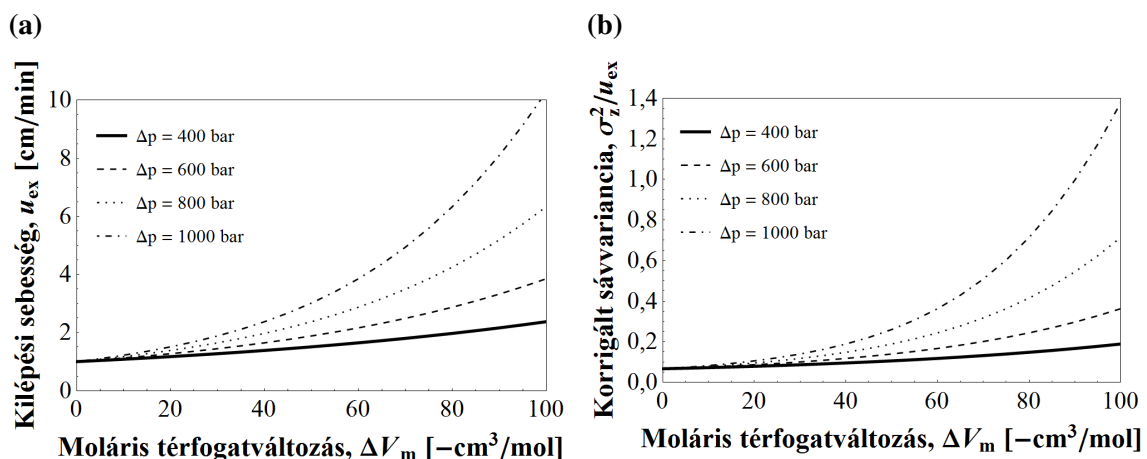
A komponenssávok oszlop menti koncentráció profilját jellemző variancia értékeket a moláris adszorpciós térfogatváltozás függvényében, különböző nyomásértékek esetén a 3.2.6. ábrán tüntettem fel.



3.2.6. ábra. Komponenssáv variancia értékének alakulása különböző nyomás és moláris adszorpciós térfogatváltozás értékek esetén.

A 3.2.4. és 3.2.5. ábrák alapján megállapítható, hogy az injektálási térfogat növekedésével növekszik a sávok hosszirányú varianciája, különösen a nagyméretű molekulák irányába. A 3.2.6. ábrán látható továbbá, hogy a nyomás növekedésével, a $-50 \text{ cm}^3/\text{mol}$ vagy annál nagyobb moláris adszorpciós térfogatváltozással jellemezhető komponensek esetén a sávok hosszirányú varianciájának növekedése már igencsak számottevő.

Fontos azonban figyelembe venni, hogy a mintasávok vándorlási sebessége a töltetágy ellenállásának csökkenése révén az oszlop vége felé egyre növekszik. A komponensek injektálási térfogattól független kilépési sebesség értékeit az $u_{\text{ex}} = u_0/(1 + k_{\text{ex}})$ összefüggés alapján számítva a 3.2.7.a ábrán látható eredményeket kaptam.



3.2.7. ábra. Kilépési sebesség (a) és sáv szélesség kilépési sebességgel korrigált értéke (b) különböző nyomás és moláris adszorpciós térfogatváltozás értékek esetén.

Bár a nyomás és a molekulaméret emelkedése jelentős növekedést okoz a sáv szélességben (3.2.6. ábra), figyelembe véve az adott körülmények között számított kilépési sebesség értékek növekedését (3.2.7.a ábra) látható, hogy a komponens sávok szélessége a kilépés során jelentősen csökken (3.2.7.b ábra). A kilépési sebesség növekedése tehát egyfajta sávkompressziós hatásként értelmezhető, mely részben vagy akár teljes mértékben kom-

penzálhatja a korábban már említett oszlopbeli sávszélesedést. Fontosnak tartom tehát kiemelni, hogy a fent vizsgált tényezők együttesen alakítják ki a kromatogramon megjelenő csúcsok alakját és bázisszélességét, tehát a mérhető hatékonyság a korábban szeparáltan vizsgált paraméterek és folyamatok komplex eredménye.

Az elválasztás hatékonyságára vonatkozóan, a komponensek oszlopról való elúcióját követően a kromatogramon megjelenő csúcsok elemzésével kaphatunk információt. A kromatogramon megjelenő csúcscsökkentést (Δt_{out}) az oszlopon belül kialakuló sávszélesség és a komponenssávok oszlopból való kilépésének sebessége a (3.6) összefüggés [89] szerint határozza meg.

$$\Delta t_{\text{out}} = \Delta z_{\text{out}} \frac{1 + k_{\text{out}}}{u_0} \quad (3.6)$$

ahol Δz_{out} és k_{out} az oszlopból kilépő komponenssáv szélessége és retenciós tényezője.

Munkám során az egyensúlyi-diszperzív modell felhasználásával számított elúciós koncentráció profilokból (c_n) momentumanalízissel, a (3.7) összefüggések

$$\mu_0 = \int_0^\infty c_{\text{inj}} dt \quad (3.7a)$$

$$t_R = \mu_1 = \frac{\int_0^\infty c_{\text{inj}} t dt}{\mu_0} \quad (3.7b)$$

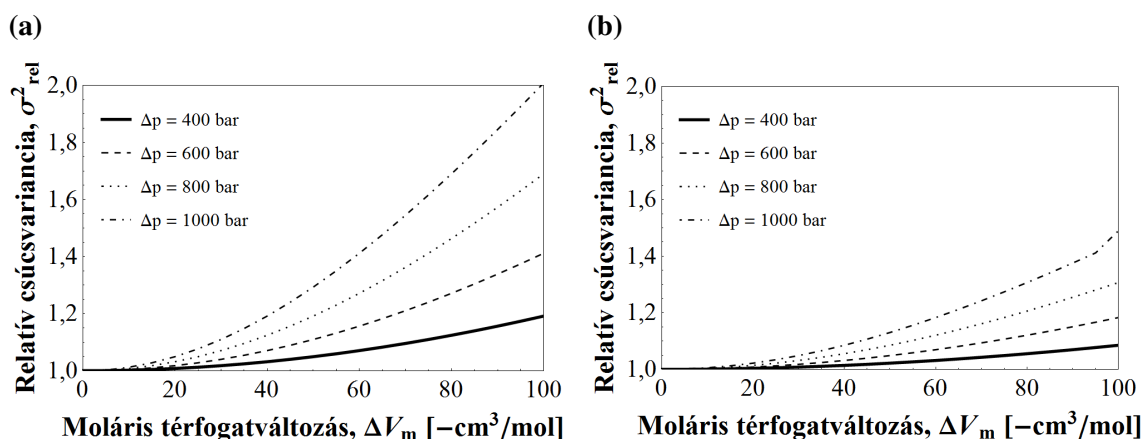
$$\sigma^2 = \mu_2 = \frac{\int_0^\infty (t - \mu_1)^2 c_{\text{inj}} dt}{\mu_0} \quad (3.7c)$$

$$\sigma_z^2 = \mu_2 u_{\text{out}} = \frac{\mu_2 u_0^2}{(1 + k_{\text{out}})^2} \quad (3.7d)$$

$$A_S = \mu_3 = \frac{\int_0^\infty (t - \mu_1)^3 c_{\text{inj}} dt}{\mu_0} \quad (3.7e)$$

$$N = \frac{\mu_1^2}{\mu_2} \quad (3.7f)$$

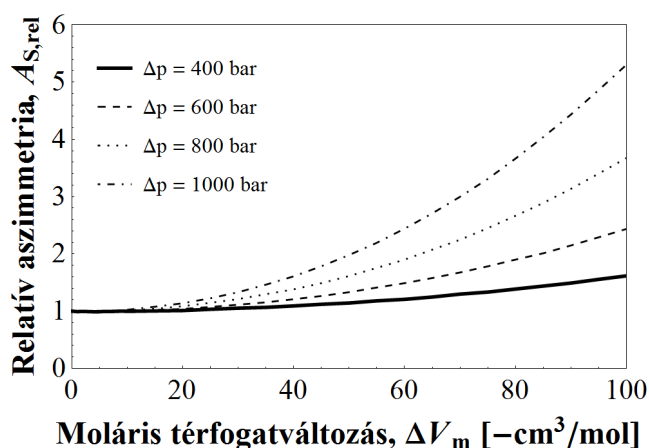
felhasználásával meghatároztam a várható retenciós idő (t_R), továbbá az elválasztás hatékonyságát jellemző időbeli (σ^2) és hosszirányú variancia (σ_z^2), az aszimmetria tényező (A_S), valamint a tányérszám (N) nyomásgradiens esetén várható értékét.



3.2.8. ábra. Relatív csúcsvariancia alakulása a moláris adszorpciós térfogatváltozás függvényében különböző nyomásesések, valamint 2 μL (a) és 1000 μL (b) injektálási térfogatok esetén ($N = 1500$).

A relatív csúcsvariancia ($\sigma_{rel}^2 = \sigma_i^2 / \sigma_{\Delta V_m=0}^2$) értékek mind a nyomás mind pedig a moláris adszorpciós térfogatváltozás emelkedésével növekedést mutatnak, míg az injektált mintamennyiség növelésével csökken a változás mértéke (3.2.8. ábra). Látható tehát, hogy a megfelelő injektálási térfogat megválasztása, különösen a nagyobb molekulaméret és nyomás tartományban egy további fontos paraméter az elválasztási hatékonyság szempontjából.

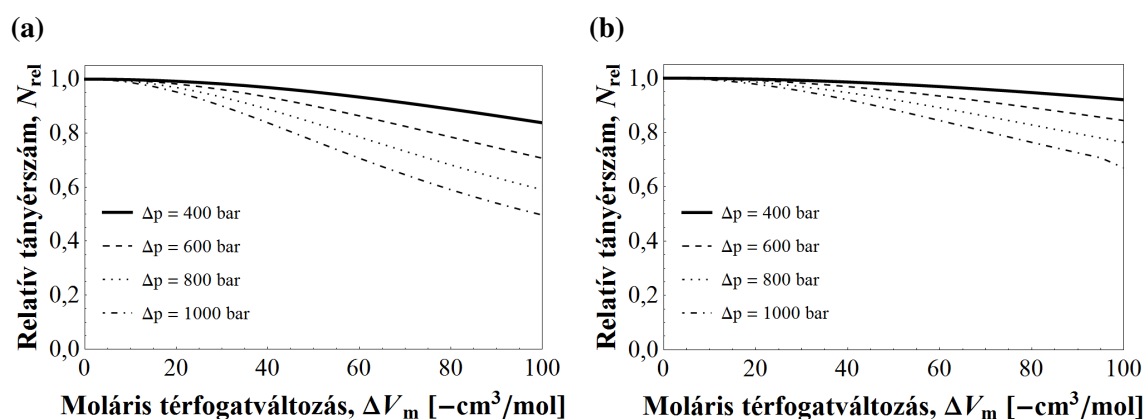
Hasonló körülmények között vizsgálva a kromatográfias csúcsok várható aszimmetria értékeit a 3.2.9. ábrán látható eredményeket kaptam.



3.2.9. ábra. Várható aszimmetria értékek relatív alakulása az oszlopnomás és a moláris adszorpciós térfogatváltozás függvényében 1500 N elérendő tányérszám esetén ($V_{inj} = 2 \mu\text{L}$).

A nyomás és moláris adszorpciós térfogatváltozás emelkedésével a csúcsaszimmetria esetében is növekedést tapasztaltam, mely nagyméretű molekulák és magas nyomásesés értékek esetén elérte a közel 6-szoros relatív értéket. Az injektálási térfogat változtatásának hatása ez esetben elhanyagolható volt.

A fentieket figyelembe véve megállapítható, hogy a nyomás és az azzal szoros kapcsolatban álló moláris adszorpciós térfogatváltozás növekedése, továbbá az injektálási térfogat növelése egyaránt meghatározó a kromatográfiás csúcsszélesedés szempontjából. Az elválasztás hatékonyságának nyomásesés, moláris adszorpciós térfogatváltozás és injektálási térfogat függvényében való változását az elérhető tányérszámok relatív értékén keresztül az alábbiakban ismertetem.



3.2.10. ábra. Relatív tányérszám értékek alakulása az oszlopbeli nyomásesés és a moláris adszorpciós térfogatváltozás függvényében $2 \mu\text{L}$ (a) és $1000 \mu\text{L}$ (b) injektálási térfogatok mellett $N = 1500$ elméleti tányérszám esetén.

A 3.2.10.a és 3.2.10.b ábrák alapján megállapítható, hogy kis injektálási térfogatok mellett az elérhető tányérszám értékét alapvetően a nyomás és a moláris adszorpciós térfogatváltozás határozza meg. V_{inj} értékét növelve a nyomás és a moláris adszorpciós térfogatváltozás hatása csökken. Ez összhangban van a korábban bemutatott csúcsszélesség értékek változásával, ahol a nagyobb injektálási térfogat mellett szintén kisebb mértékű változás volt tapasztalható. Utóbbi arra enged következtetni, hogy növelve az injektált mintamennyiséget, az oszlop elején kialakuló mintadugó szélességéhez képest adott körülmények között a többi sávszélesítő hatás hozzájárulása egyre inkább háttérbe szorul.

Eredményeimet a kromatográfiás elválasztások gyakorlatára vonatkoztatva megállapítható, hogy fehérjék és egyéb makromolekulák esetén az oszlopbeli nyomásgradiens jelentősen befolyásolja az említett komponensek retencióját és elválasztásuk hatékonyságát. Fontos következtetés továbbá, hogy a kisebb nyomásesésű kolonnák, szemben a nagyobb nyomáseséssel jellemezhetőekkel, különösen nagyméretű molekulák esetén nagyobb elválasztási hatékonyságot biztosítanak.

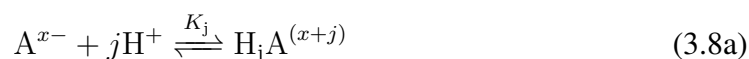
A fent ismertetett kutatómunkám alapelve és felépítése megegyezik a [89] irodalmi hivatkozásban megjelölt publikációmban közöltekkel, azon eredmények kiterjesztésének tekinthető.

3.3. Mintaoldatbeli komplexképződésen alapuló anioncsere- kromatográfiás elválasztások vizsgálata gadolínium- kelátok példáján

Doktori munkámban gadolínium komplexek anioncsere-kromatográfiás meghatározásának lehetőségeit vizsgáltam különböző kelátképző ligandumok használata mellett. Kutatásaimban EDTA, DTPA és DCTA poliamino-karbonsavakat alkalmaztam komplexképzőként.

3.3.1. Protonálódási és komplexképződési egyensúlyi folyamatok leírása

Adott anion protonálódásának egyensúlyi reakcióit, valamint a kapcsolódó egyensúlyi állandókat és az egyes specieszek mólarányát leíró összefüggéseket az alábbi általános formában adtam meg.



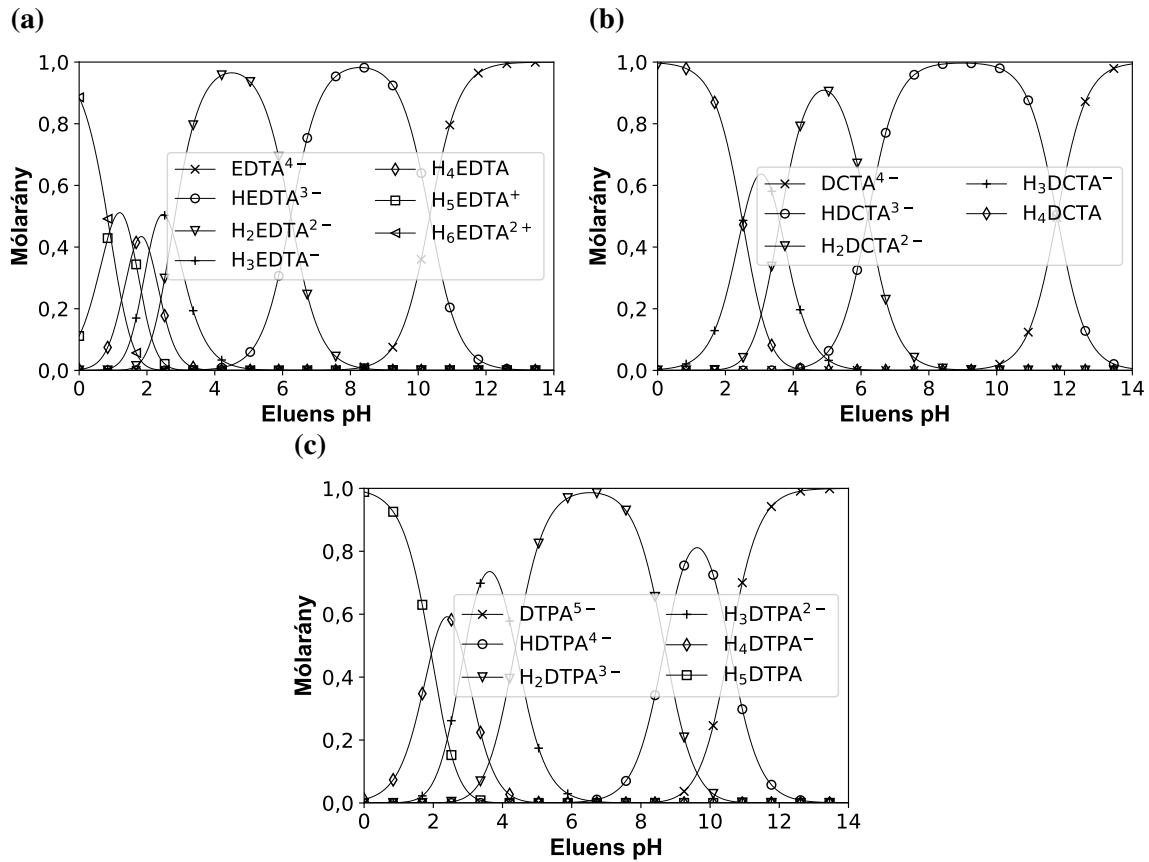
$$K_j = \frac{[H_jA^{(x+j)}]}{\prod_{i=0}^{j-1} K_i [A^{x-}] [H^+]^j} \quad (3.8b)$$

$$\Phi_j = \frac{H_jA^{(x+j)}}{\sum_{j=0}^x [H_jA^{(x+j)}]} \quad (3.8c)$$

ahol A^{x-} az x értékű aniont (minta-, ligandum-, eluens- vagy mátrixanion), j a protonáltsági fokot, K_j a protonálódási reakció egyensúlyi állandóját, Φ_j pedig az adott j -szeresen protonált speciesz mólarányát jelenti.

A (3.8a), (3.8b) és (3.8c) összefüggéseket felhasználva, a protonálódási egyensúlyi állandók (Függelék: 2. táblázat) ismeretében kiszámítottam a fent említett szerves ligandumok különböző specieszeinek móltörteloszlás görbéit a pH függvényében (3.3.1. ábra).

3.3. MINTAOLDATBELI KOMPLEXKÉPZŐDÉSEN ALAPULÓ
ANIONCSERE-KROMATOGRÁFIÁS ELVÁLASZTÁSOK VIZSGÁLATA
GADOLÍNIUM-KELÁTOK PÉLDÁJÁN

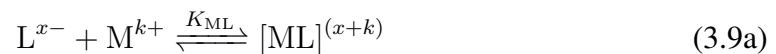


3.3.1. ábra. A vizsgált kelátképző EDTA (a), DCTA (b) és DTPA (c) ligandumok protonált formáinak móltörteloszlása a pH függvényében.

Az eredmények alapján megállapítottam, hogy mindhárom kelátképző (EDTA, DTPA, DCTA) szabad anionos formában van jelen az általam alkalmazni kívánt elúciós (pH = 10-11) és detektálási (pH = 7-8) pH-tartományban, azaz anioncsere-kromatográfias módszerrel elválaszthatóak és detektálhatóak.

Az egyes poliamino-karboxilát ligandumok, gadolínium fémionra vonatkozó komplexstabilitási állandóinak (Függelék: 3. táblázat) felhasználásával, vizsgáltam a ligandum / fémion koncentráció arányok komplexkialakulásra gyakorolt hatását.

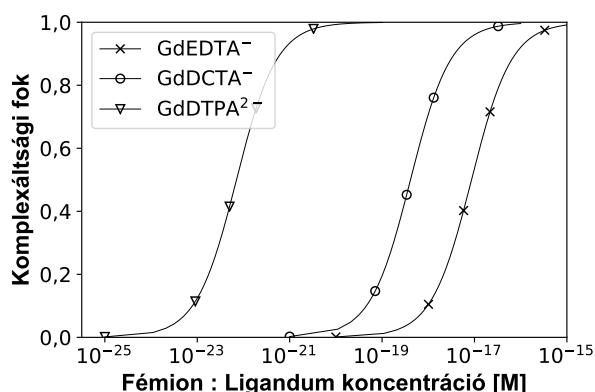
L (kelátképző-, karbonát-, hidroxó- vagy egyéb mátrix-) ligandum M fémionnal való komplexálódása során lejátszódó reakciót, valamint a komplexképződés egyensúlyi állandóját illetve az egyes specieszek mólarányát leíró összefüggéseket az alábbi általános formában adtam meg (3.3.1).



$$K_{ML} = \frac{[ML]^{(x+k)}}{[L^{x-}] [M^{k+}]} \quad (3.9b)$$

$$\Phi_X = \frac{[X]}{[L] + [M^{k+}] + [ML]^{(x+k)}} \quad (3.9c)$$

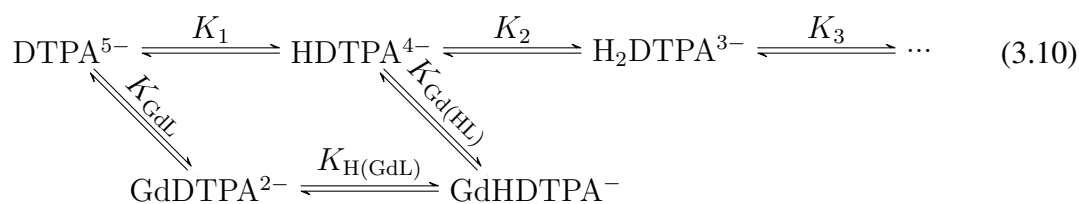
ahol X: L^{x-} , M^{k+} vagy $ML^{(x+k)}$. A (3.3.1) és (3.3.1) összefüggések felhasználásával vizsgáltam a Gd^{3+} fémion komplexáltságát különböző fémion : ligandum koncentrációk esetében (3.3.2. ábra).



3.3.2. ábra. Gd^{3+} fémion komplexáltsági fokának alakulása a fémion : ligandum koncentrációarány függvényében.

A képződési állandók értékének megfelelően DTPA kelátképző esetén tapasztaltam a legalacsonyabb, a komplex kialakulásához szükséges fém és ligandum koncentrációkat. A vizsgált EDTA, DCTA és DTPA ligandumok esetén 10^{-15} , 10^{-17} illetve 10^{-20} mol/L-nek adódtak a teljes komplexáltsághoz szükséges fémion és ligandum koncentrációk.

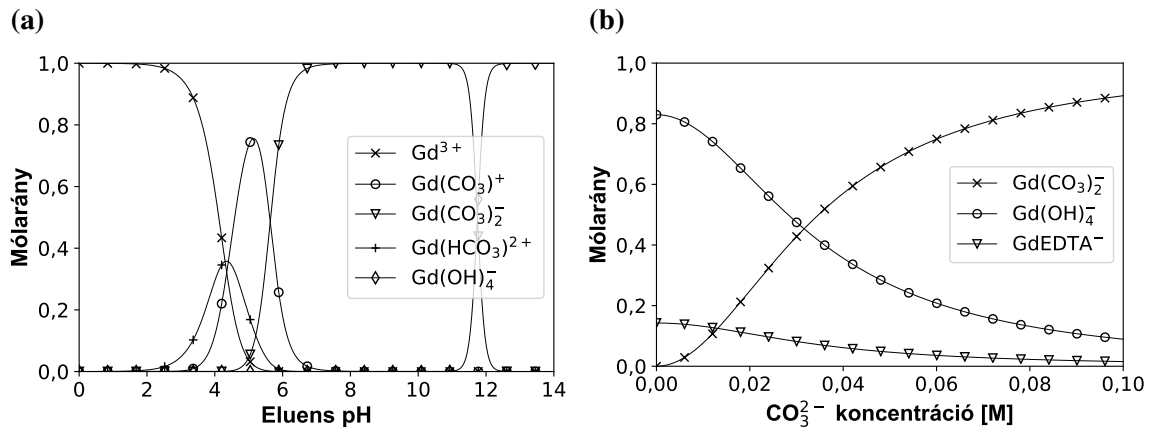
A protonálódás és a komplexálódás egyaránt pH függő egyensúlyi folyamatok, melyek egymás jelenlétében is végbemehetnek, azaz a fémion protonált ligandumhoz való komplexálódása és/vagy a fém-ligandum komplex protonálódása is lejátszódhat (3.10).



ahol K_1 , K_2 és K_3 protonálódási állandók, K_{GdL} a komplexképződési állandó, $K_{H(GdL)}$ és $K_{Gd(HL)}$ pedig a kelátkomplex protonálódási illetve a protonált ligandum komplexálódási állandói.

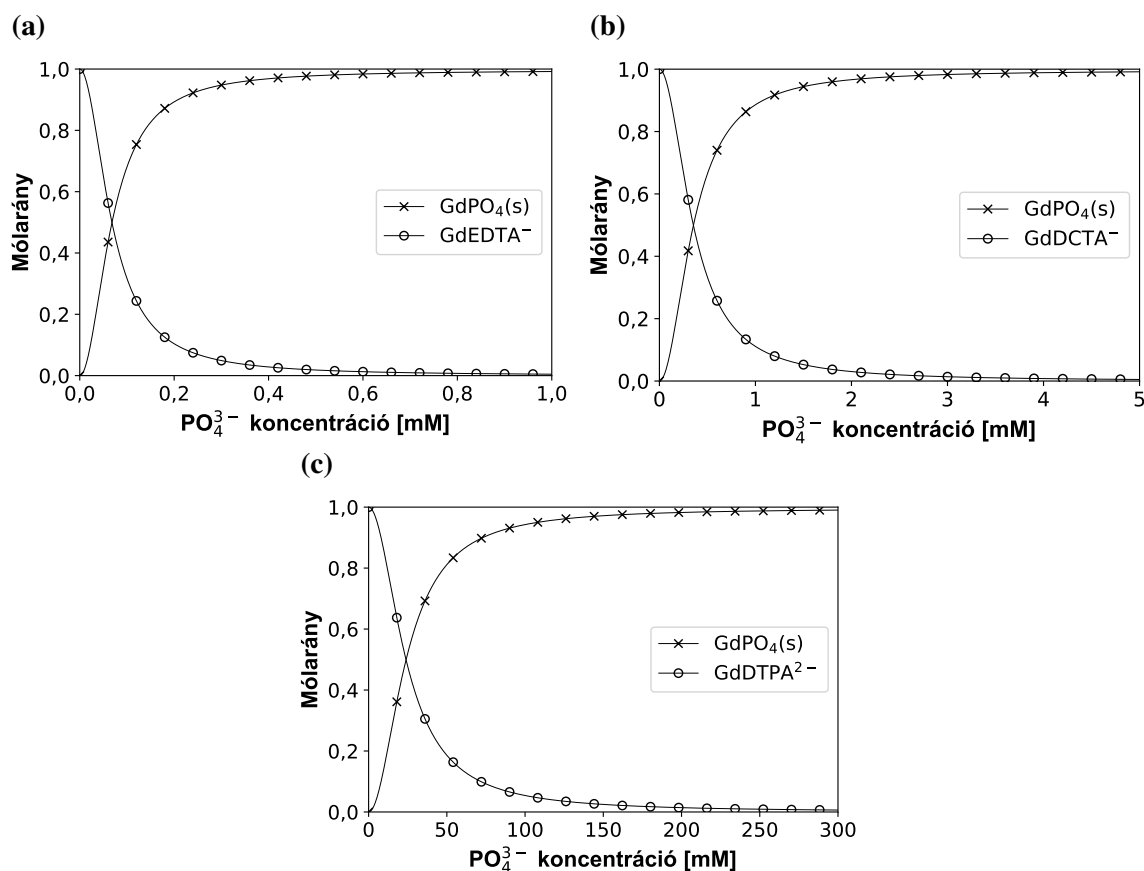
Előzetes vizsgálataim alapján úgy találtam, hogy a tervezett mérési körülmények között mindhárom ligandum (EDTA, DCTA, DTPA) alkalmazható a gadolínium fémion negatív töltésű, stabil kelát-komplexének kialakítására, a kialakuló kelát-komplex anionok anioncsere-kromatográfiás módszerrel vizsgálhatók. A komponensek retenciójának alakulását a mozgófázis ionerőssége és annak pH-ja függvényében is vizsgálni kívántam, ezért a lúgos elúciót karbonát pufferreluens alkalmazásával valósítottam meg. A mérési körülményekre tekintettel, a Függelék: 5. táblázatban szereplő adatok felhasználásával és a (3.9a), (3.9b) és (3.9c) összefüggések segítségével vizsgáltam gadolínium karbonát- illetve hidroxokomplexek kialakulásának lehetőségét. Megállapítottam, hogy bár az alkal-

mazni kívánt elúciós és detektálási pH tartományban a Gd^{3+} fémion $Gd(CO_3)_2^-$ karbonát komplexe egy potenciális speciesz (3.3.3.a ábra), a vizsgált poliamino-karboxilát ligandumok (EDTA, DCTA, DTPA) mellett Gd-karbonát komplexek jelenlétével csak a karbonát ion és kelát-komplex koncentráció ≥ 2 nagyságrendi eltérése esetén kellene számolnunk (3.3.3.b ábra). Utóbbi, esetünkben nem teljesül, így Gd-karbonát komplexek képződésétől eltekinthetünk. Gadolínium-hidroxid, elsősorban $Gd(OH)_4^-$ komplex kialakulásával $pH > 11$ esetén kell számolnunk.



3.3.3. ábra. Gadolínium-karbonát és -hidroxó komplexek kialakulásának pH függése (a), valamint a mozgófázis karbonát tartalmának hatása Gd-EDTA kelát komplex molarányának alakulására (b) ($Gd^{3+} = 10^{-8}$ M, $[EDTA^{4-}] = 10^{-8}$ M, $pH = 11$).

Tekintettel arra, hogy valós minták esetén a jellemzően nyomnyi mennyiségben lévő célion(ok) mellett számottevő lehet a mátrixionok koncentrációja, vizsgáltam a leggyakrabban előforduló szerves (Cl⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻) és néhány szerves anion (karboxilátok) gadolínium fémionnal való komplexálódásának lehetőségét is. A mátrix ligandumok komplexképzési állandóinak (Függelék: 4. és 5. táblázat) ismeretében megállapítottam, hogy azok kelát komplex kialakulását befolyásoló hatása jellemzően elhanyagolható. A potenciális mátrixionok közül legmagasabb komplexképzési állandóval a foszfát ligandum rendelkezik, így ennek a mátrixionnak Gd-EDTA, Gd-DCTA és Gd-DTPA kelátok kialakulására gyakorolt esetleges zavaró hatását részletesebben is vizsgáltam.



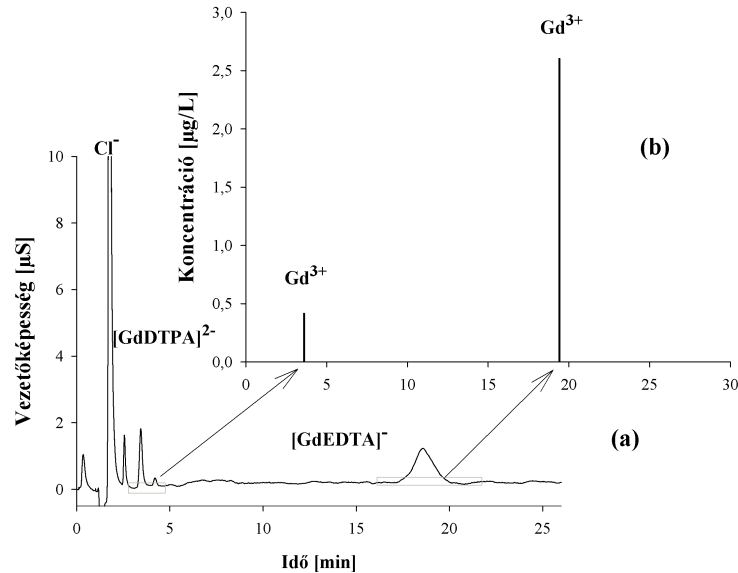
3.3.4. ábra. Mintamátrix foszfát tartalmának hatása Gd-EDTA (a), Gd-DCTA (b) és Gd-DTPA (c) kelát komplex molarányának alakulására (b) ($Gd^{3+} = 10^{-5} M$, ligandum = $10^{-5} M$, pH = 8–11).

A 3.3.4.a, 3.3.4.b és 3.3.4.c ábrákon bemutatott móltörteloszlás görbék alapján megállapítható, hogy foszfát ion magas mintamátrixbeli koncentrációja mellett esetlegesen Gd-foszfát csapadék képződésével is számolnunk kell. pH = 8–11 kémhatású mintaoldatban, Gd-EDTA, Gd-DCTA és Gd-DTPA komplexek kialakulása 50:1, 250:1 illetve 20 000:1 foszfát:kelát koncentrációviszonyok esetén jelentősen visszaszorul. Ezen eredményeket figyelembe véve, Gd^{3+} fémion kelát formában, foszfát (vagy hasonlóan erős komplexképző) mátrixból történő anioncsere-kromatográfiás meghatározása esetén szükségesnek tartom olyan mintaelőkészítési eljárás alkalmazását (pl.: szilárd-fázisú extrakció), mely biztosítja ezen mátrixkomponensek hatékony eltávolítását.

3.3.2. A kromatográfiás módszer jellemzése, retenciós adatbázis felvétele

Kutatómunkám során jellemzően standard oldatokkal dolgoztam. Elsőként egy Gd-EDTA-DTPA komplex tesztoldatot állítottam össze, ezen komponensek ionkromatográfiás elválasztásának eredménye az alábbi kromatogramon (3.3.5. ábra) látható. Az egyes, kelát komplexként azonosított csúcsokból frakciókat gyűjtöttem, melyek Gd^{3+} fémion tartalmának igazolása off-line ICP-OES technikával történt. Az eredmények alapján az

anioncsere-kromatográfiás módszert alkalmasnak ítéltük gadolínium kelát komplexek analitikai elválasztására.



3.3.5. ábra. Ionkromatográfiás módszerrel elválasztott gadolínium kelát komplexek Gd^{3+} tartalmának igazolása ICP-OES^a technikával frakciógyűjtést követően. (Mozgófázis: 3,5 mM karbonát/hidrogén-karbonát puffer, pH = 10,2, $v = 1,2$ mL/min, mintaoldat: $[GdDTPA^{2-}] = 0,01$ mM, $[GdEDTA^{-}] = 0,1$ mM)

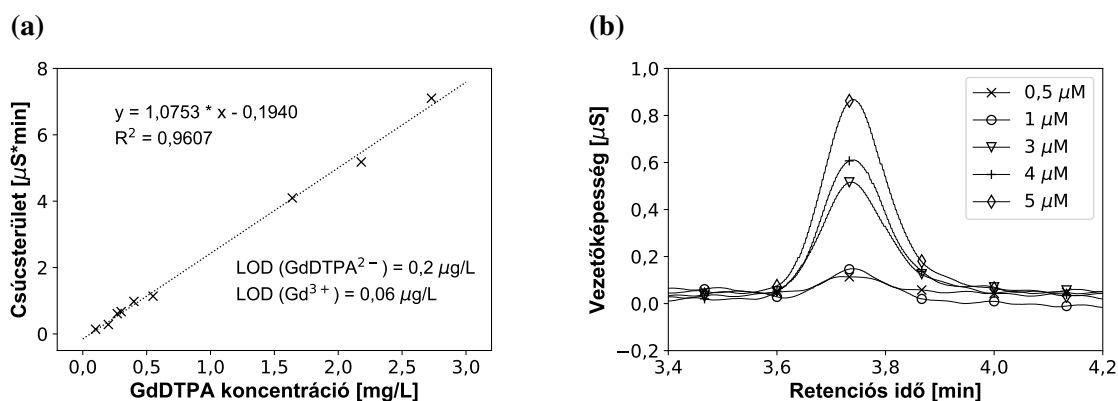
Ezt követően, a magas komplexstabilitási állandóra és a gyakorlati alkalmazásra tekintettel DTPA ligandum mellett vizsgáltam a detektálás érzékenységét. Gd-DTPA törzsoldatából hígítási oldatsort állítottam össze, és külső standard módszerrel elkészíttem az említett komponens analitikai mérőgörbéjét (3.3.6.a ábra). A görbe paramétereit felhasználva, az Amerikai Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala (EPA) által [90] ajánlott RMSE (root mean square error) módszert (3.11) alkalmazva számítottam a kimutatási határkoncentrációt ($LOD = \text{limit of detection}$).

$$LOD = \frac{3 RMSE}{m} = \frac{3}{m} \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n E_j^2}{n-2}} \quad (3.11)$$

ahol m a kalibrációs mérőgörbe meredeksége, E az egyes koncentrációk esetén mért illetve számított detektorjelek közötti abszolút hiba, n pedig a mérési pontok száma. A módszer kimutatási határa $[GdDTPA]^{2-}$ komplex anionra vonatkozóan $0,2 \mu\text{g/L}$ -nek ($0,365$ nM), Gd^{3+} fémionra átszámítva $0,06 \mu\text{g/L}$ -nek ($0,382$ nM) adódott, mely megközelíti egyes, az irodalomban korábban publikált [91] csatolt analitikai módszerek érzékenységét.

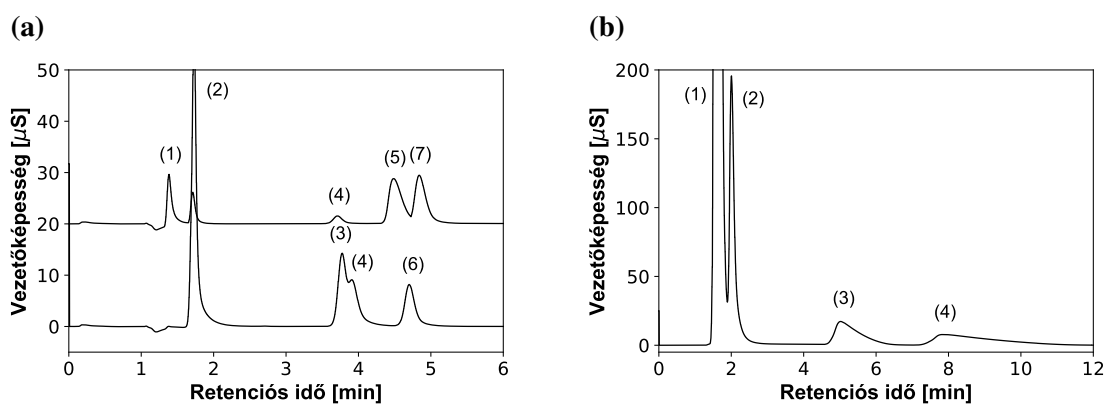
^aAz ICP-OES mérésekért köszönet Dr. Halmos Pál[†] Tanár Úrnak.

3.3. MINTAOLDATBELI KOMPLEXKÉPZŐDÉSEN ALAPULÓ
ANIONCSERE-KROMATOGRÁFIÁS ELVÁLASZTÁSOK VIZSGÁLATA
GADOLÍNIUM-KELÁTOK PÉLDÁJÁN



3.3.6. ábra. GdDTPA²⁻ komplex anion mennyiségi meghatározására felvett kalibrációs görbe (a) és a felhasznált hígítási sor kromatogramjai (b).

A detektálás érzékenységének meghatározását követően különböző összetételű modell oldatokkal teszt méréseket végeztem annak érdekében, hogy előzetes információt szerezzek a módszer szelektivitásáról. A vizsgált elúciós körülmények mellett PO₄³⁻ és Gd-DTPA ionok esetében nem volt megfelelő felbontás az elválasztás (3.3.7.a ábra). Gd-DCTA ionra a magas mozgófázis ionerősség ellenére meglehetősen elnyúló csúcsalakot tapasztaltam (3.3.7.b ábra), így ennek a komplex anionnak a további vizsgálatát elvettem.



3.3.7. ábra. [GdDTPA]²⁻ kelát komplex elválasztása szerves (a), valamint egyéb Gd-kelátok jelenlétében (b). (Mérési körülmények: 3,6 mM (a) ill. 7,2 mM (b) karbonát/hidrogén-karbonát puffer, pH = 10,2, v = 1,2 mL/min.)

(a) felső kromatogram: 1–laktát, 2–Cl⁻, 4–[GdDTPA]²⁻, 5–szukcinát, 7–maleát
alsó kromatogram: 2–Cl⁻, 3–[GdDTPA]²⁻, 4–PO₄³⁻, 6–SO₄²⁻
(b) 1–Cl⁻, 2–[GdDTPA]²⁻, 3–[GdEDTA]⁻, 4–[GdDCTA]⁻ (1–1–1–1 mM)

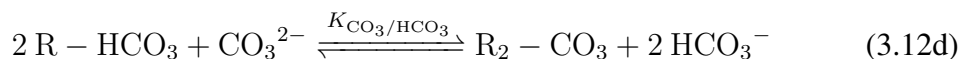
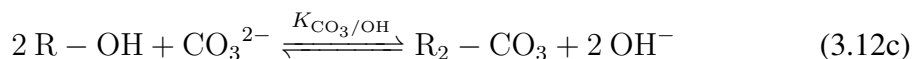
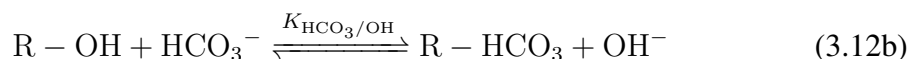
A fenti eredmények alapján szükségesnek láttuk a módszer optimalizálását. A hatékony módszerfejlesztés érdekében szisztematikusan vizsgáltuk szerves anionok, valamint Gd-DTPA és Gd-EDTA komplex anionok retenciós viselkedését. Az egyes mintaionok mozgófázis pH és koncentráció függvényében rögzített retenciós tényező értékeit a 3.4. táblázat tartalmazza.

3.4. táblázat. Szervetlen és gadolínium kelát komplex anionok mért retenciós tényező értékei különböző mozgófázis pH és koncentráció esetén.

Koncentráció	pH	Retenciós tényező						RSD% átlag
		Cl ⁻	NO ₃ ⁻	[GdDTPA] ²⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻	[GdEDTA] ⁻	
3,0 mM	9,9	0,41	1,20	2,71	2,77	3,80	19,39	0,94
	10,2	0,34	0,99	1,91	2,08	2,65	15,22	0,27
	10,5	0,30	0,90	1,48	1,77	2,05	12,52	0,56
	10,8	0,28	0,84	1,28	1,79	1,76	11,11	0,44
3,5 mM	9,9	0,39	1,16	2,29	2,27	3,12	17,08	0,59
	10,2	0,32	0,92	1,56	1,63	2,17	12,98	0,60
	10,5	0,29	0,86	1,29	1,50	1,76	11,20	0,83
	10,8	0,26	0,79	1,11	1,50	1,53	9,85	0,37
4,0 mM	9,9	0,34	1,02	1,87	1,86	2,57	14,45	0,61
	10,2	0,28	0,83	1,32	1,39	1,80	11,07	0,27
	10,5	0,26	0,80	1,05	1,23	1,44	9,20	0,39
	10,8	0,23	0,71	0,88	1,18	1,20	7,77	0,42
4,5 mM	9,9	0,33	0,98	1,69	1,65	2,31	13,30	0,50
	10,2	0,26	0,82	1,20	1,24	1,65	10,14	1,07
	10,5	0,23	0,71	0,94	1,06	1,29	8,20	1,07
	10,8	0,22	0,69	0,79	1,08	1,09	7,00	0,36

3.3.3. Mintakomponensek és mátrixonok retencióját leíró modell levezetése, alkalmazása

A megfelelő szelektivitást és felbontást biztosító elúciós körülmények megtalálása érdekében részletesen vizsgáltuk az elválasztás során lejátszódó ioncsere-egyensúlyi folyamatokat.



$$K_{X_1/X_2} = \frac{(X_1^{m-})^n [X_2^{n-}]^m}{(X_2^{n-})^m [X_1^{m-}]^n} \quad (3.12e)$$

ahol X_1^{m-} és X_2^{n-} az állófázis ioncsereelő helyeiért versengő m és n töltésű anionok, K_{X_1/X_2} a reakció egyensúlyi állandója, $()$ és $[\]$ zárójelek pedig az állófázisbeli illetve mozgófázisbeli koncentrációkat jelölik. Korábban már bizonyításra került [82], hogy az általunk használt oszlop esetén a latex réteg és az alatta található szulfon réteg töltéssűrűségét leíró súlytényező paraméter értéke $w = 1$. Ennek megfelelően munkánk során egyszerű anioncsere folyamatokkal számoltunk. Az alkalmazott teljes elúciós pH tartományban a $[GdEDTA]^-$ és $[GdDTPA]^{2-}$ stabil kelát komplexként van jelen, így a retenció

vizsgálatánál a komplexstabilitás pH függése illetve a komplexek protonálódása elhanyagolható.

A komponensek retenciójának leírására egy a Hoover illetve a Hajós-féle többszörös minta/eluens (1.46a) elméletekkel analóg modellt alkalmaztunk, de azokkal ellentétben a HCO_3^- helyett OH^- referencia ionnal számoltunk. Az említett modell a részletes levezetéstől eltekintve az alábbi formában írható fel.

$$k = \frac{V_s}{V_m} \sum_{j=0}^{x-1} \left[\Phi_{j, \text{H}_j\text{A}} K_{\text{H}_j\text{A}/\text{OH}} \left(\frac{\sqrt{p^2 + 2Q} q - p}{q} \right)^{(x-j)} \right] \quad (3.13a)$$

$$p = K_{\text{HCO}_3/\text{OH}} [\text{HCO}_3^-] + [\text{OH}^-] \quad (3.13b)$$

$$q = 4 K_{\text{CO}_3/\text{OH}} [\text{CO}_3^{2-}] \quad (3.13c)$$

ahol $[\text{CO}_3^{2-}] = c \Phi_0$ és $[\text{HCO}_3^-] = c \Phi_1$, valamint $[\text{OH}^-] = 10^{pH-14}$, j pedig a mintaion protonáltsági fokát jelöli.

A korábbi elméletek matematikai átdolgozásának alapötlete az volt, hogy a hidroxid ion minden vizes oldatban jelen van, így előbbi választva referencia ionnak a modell átalakítás nélkül használható magasabb pH tartományokban ($\text{pH} > 12$) is, ahol a karbonát specicszek helyett már a hidroxid ion a domináns ellenion.

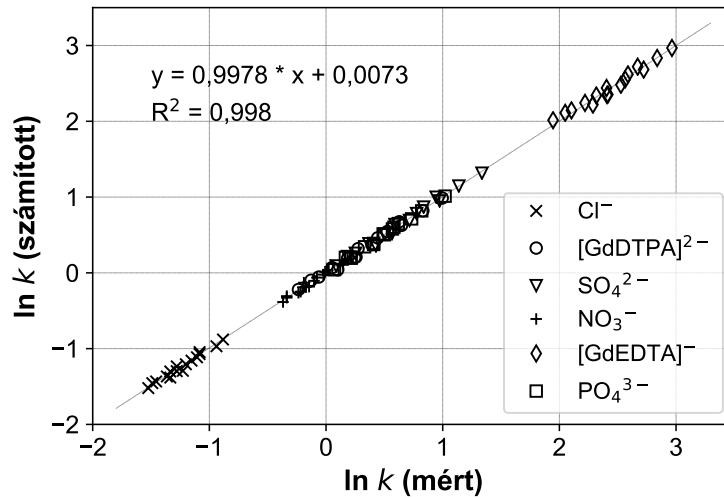
A fent bemutatott modellt és a kísérleti adatokat felhasználva görbeillesztéssel meghatároztam az egyes ioncsere-egyensúlyi és intereluens állandókat, melyek számszerű értékeit a 3.5. táblázatban tüntettem fel. Bár az ioncsere-kromatográfiás modellekben elfogadott az egyes ionok elméleti töltésének használata, az illesztések során a mintaion töltését is számítottam. Ez a *látszólagos töltés* (x') a mintaion értékűsége mellett egyéb retenciót befolyásoló tulajdonságokat is magába foglal. A fent említett paraméterek illesztése során első lépésben az elméleti töltés megadása mellett számítottam $K_{\text{A}/\text{OH}}$, valamint $K_{\text{CO}_3/\text{OH}}$ és $K_{\text{HCO}_3/\text{OH}}$ állandókat, majd utóbbiak egyes komponensekre számított értékeinek átlagát véve újraillesztettem $K_{\text{A}/\text{OH}}$ és x' paramétereket.

3.5. táblázat. Szervetlen és gadolínium kelát komplex anionokra meghatározott ioncsere egyensúlyi állandó és látszólagos töltés értékek, valamint a számított intereluens állandók.

Egyensúlyi állandó	Cl^-	NO_3^-	$[\text{GdDTPA}]^{2-}$	PO_4^{3-}	SO_4^{2-}	$[\text{GdEDTA}]^-$
$K_{\text{A}/\text{OH}}$	0,324	0,969	1,637	13,10	2,256	13,25
x'_A	1,12	0,99	2,10	3,34	2,13	1,66
$K_{\text{HA}/\text{OH}}$	-	-	-	1,366	-	-
x'_HA	-	-	-	2,27	-	-
$K_{\text{CO}_3/\text{OH}}$	3,128					
$K_{\text{HCO}_3/\text{OH}}$	0,365					

A számított retenció tényező értékeit a mérési adatokkal összevetve megfelelő egyezést kaptam (3.3.8. ábra). Előbbiek alapján megállapítottam, hogy a modell alkalmas

különböző elúciós körülmények között a komponensek retenciójának előrejelzésére.



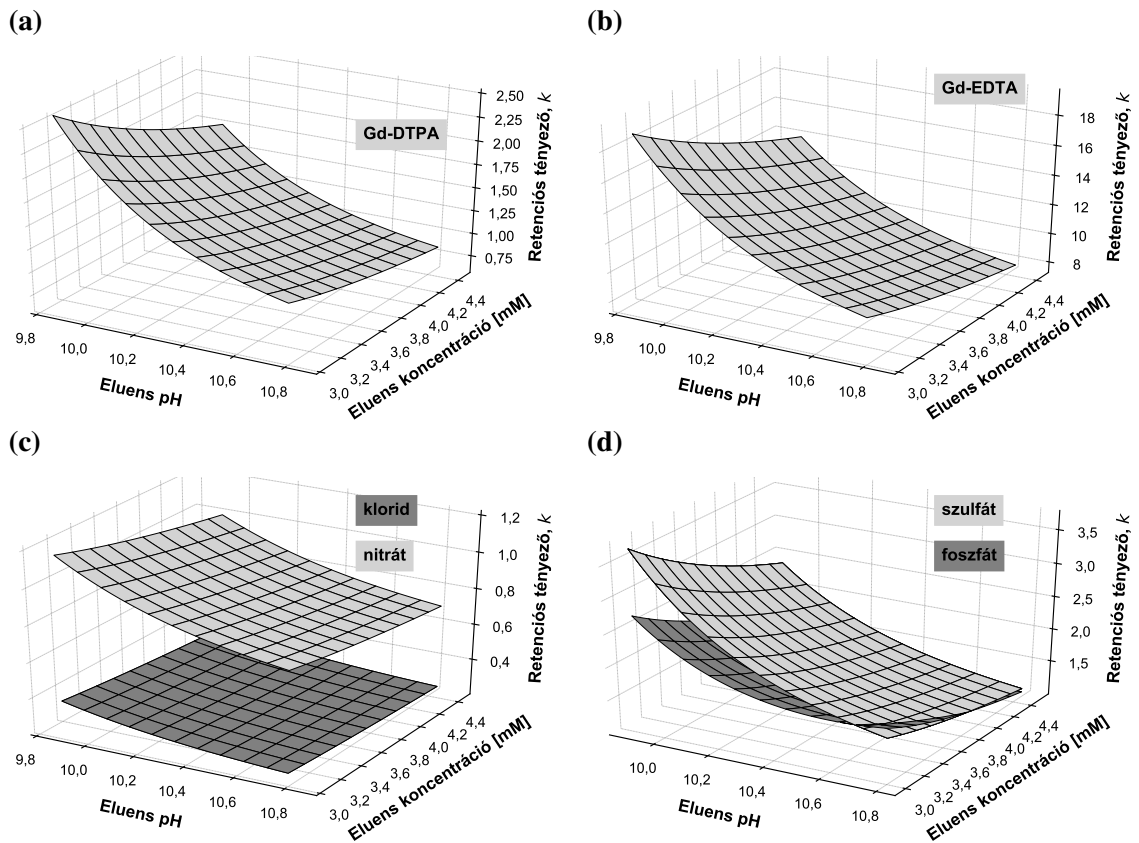
3.3.8. ábra. Szervetlen anionok és Gd-kelát komplex anionok változó mozgófázis pH és koncentráció esetén mért és számított retenciós tényező értékei közötti korreláció.

A 3.5. táblázatban szereplő paraméterek ismeretében, karbonát pufferrel végzett lúgos elúció során, bármely mozgófázis koncentráció és pH esetén előrejelezhető az adott komponens retenciós tényezője, amely jelentős segítséget nyújt a módszerfejlesztésben.

A 3.3.9. ábrán bemutatott, számított retenciós felületek alapján látható, hogy a mozgófázis koncentrációjának illetve pH-jának növelése jellemzően csökkenést okoz a komponensek retenciójában. Előbbiek közül az ionerősség növelésének retenciósökkentő hatása jól ismert. A pH növelése mellett tapasztalható retenciós csökkenés a teljesen protonálatlan CO₃²⁻ eluens ion túlsúlyba kerülésével magyarázható. Utóbbi ellenion hajtóereje ugyanis értékűségéből adódóan nagyobb.

Bár PO₄³⁻ ion tekintetében a protonálatlan illetve egyszeresen protonált specieszek a gyors átalakulás miatt egy csúcsban eluálódnak, szükséges mindkét forma jelenlétével számolni. A többi komponenssel ellentétben PO₄³⁻ esetén, a mozgófázis pH-jának emelése mellett a retenciós kismértékű növekedése figyelhető meg, mely a háromszorosan negatív töltésű, erősebben kötődő forma túlsúlyba kerülésével magyarázható.

3.3. MINTAOLDATBELI KOMPLEXKÉPZŐDÉSEN ALAPULÓ
ANIONCSERE-KROMATOGRÁFIÁS ELVÁLASZTÁSOK VIZSGÁLATA
GADOLÍNIUM-KELÁTOK PÉLDÁJÁN



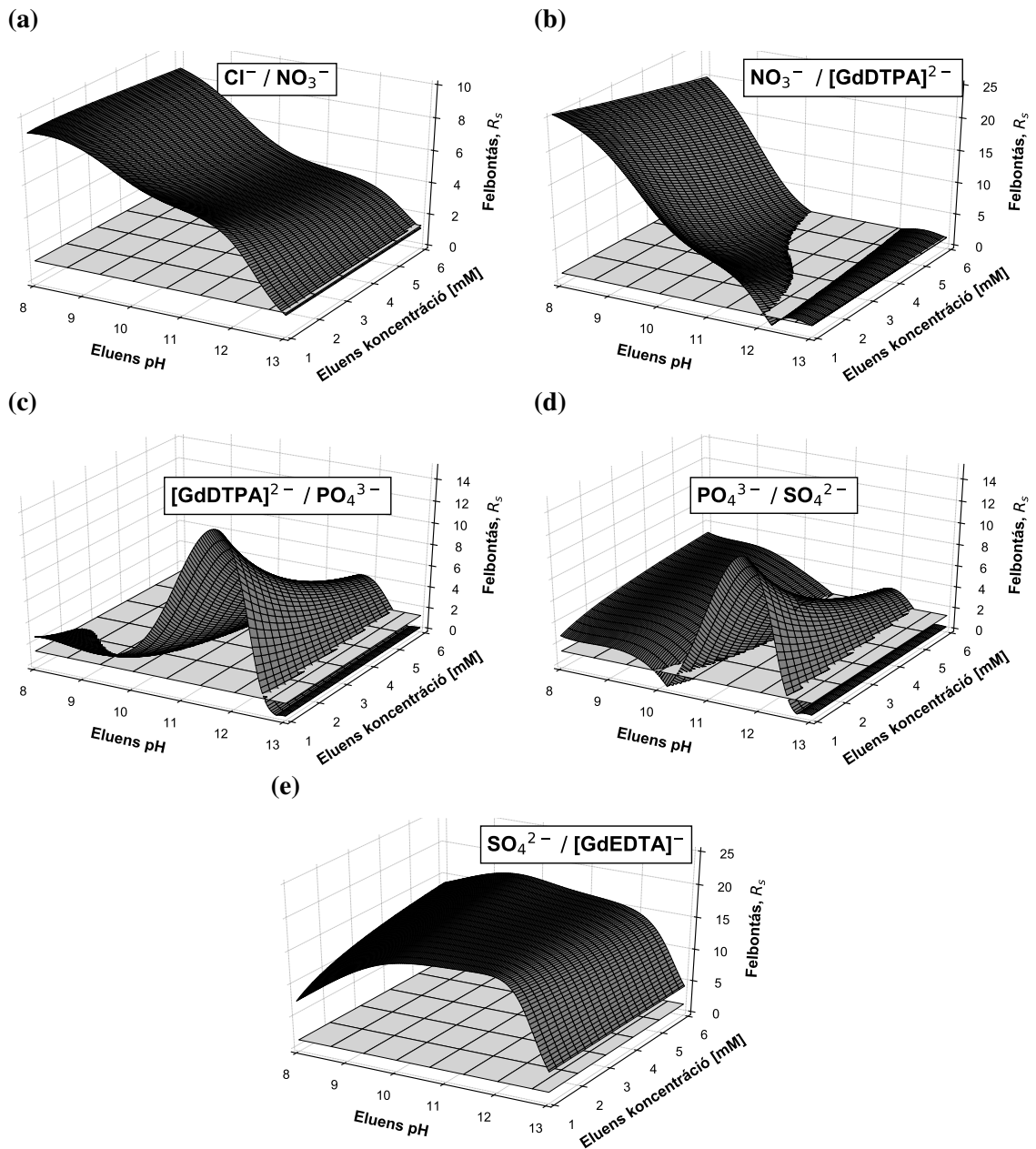
3.3.9. ábra. GdDTPA²⁻ (a) és GdEDTA⁻ (b) kelát komplex, valamint klorid-nitrát (c) és szulfát-foszfát (d) szeretlen anionokhoz tartozó retenciós felületek alakulása a mozgófázis koncentráció és pH függvényében (CO₃²⁻ / HCO₃⁻ puffer eluens).

A fent bemutatott retenciós modellt (3.13a) a felbontás számítására szolgáló egyik alapösszefüggéssel (3.14)

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{1 + k} \right) \quad (3.14)$$

kombinálva meghatároztam az egyes komponens párok felbontásának alakulását a mozgófázis pH és koncentráció függvényében. Eredményeimet a 3.3.10.a, 3.3.10.b, 3.3.10.c, 3.3.10.d és 3.3.10.e ábrákon szemléltetem. A számított felbontás felületek mellett a gyakorlatban általánosan elfogadott $R_s = 1,3$ referencia értékhez tartozó felbontás felületet is feltüntettem (világosszürke sík). Az egymást követően eluálódó komponensek közötti felbontás felületeken látható töréspontok azt a mozgófázis összetételt jelzik, melynél a két komponens retenciója megegyezik.

3.3. MINTAOLDATBELI KOMPLEXKÉPZŐDÉSEN ALAPULÓ ANIONCSERE-KROMATOGRÁFIÁS ELVÁLASZTÁSOK VIZSGÁLATA GADOLÍNIUM-KELÁTOK PÉLDÁJÁN



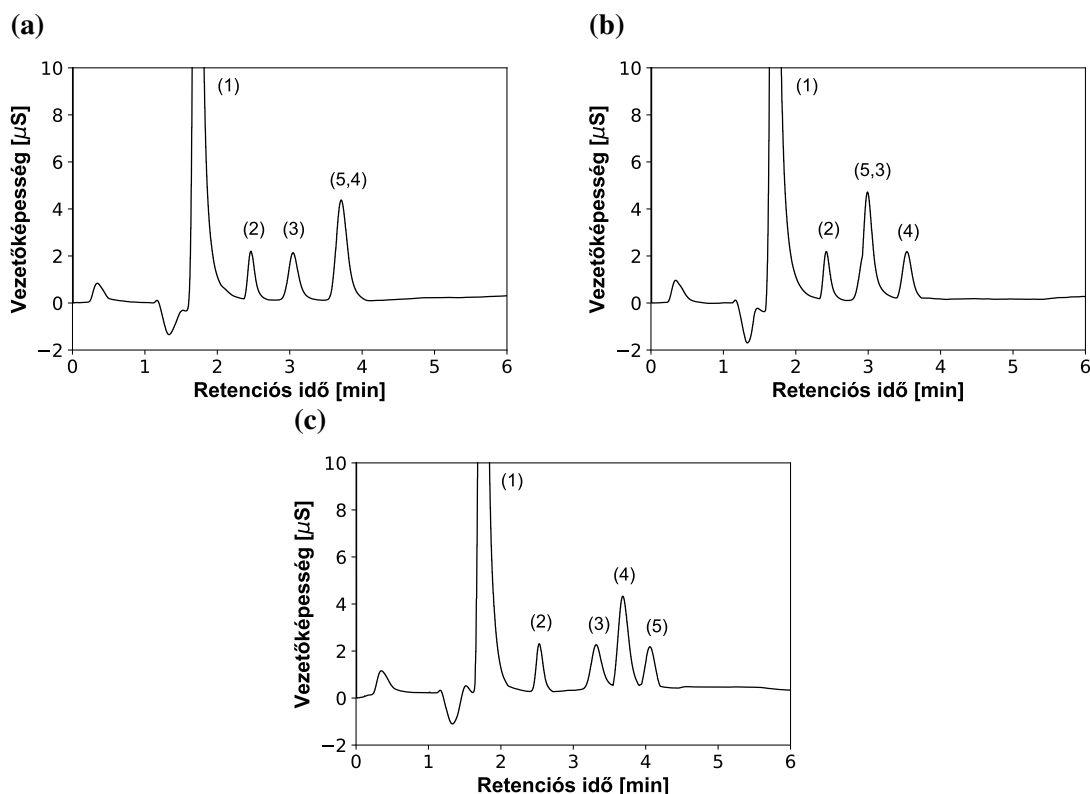
3.3.10. ábra. Egymás után eluálódó komponensekre számított felbontás felületek alakulása a mozgófázis koncentráció és pH függvényében ($N_{\text{elmleti}} = 3000$).

Az ábrák alapján megállapítható, hogy az alkalmazott elúciós körülmények elsősorban $[\text{GdTPA}]^{2-}$, PO_4^{3-} és SO_4^{2-} ionok esetében kritikusak. Utóbbiak esetén a $\text{pH} = 11-12$ tartományban történő elúcióval érhető el megfelelő felbontás. Ezen pH tartományban a Cl^- , NO_3^- , valamint $[\text{GdEDTA}]^-$ ionok elválasztása is megvalósítható.

A retenciós és felbontás felületeket együttesen értékelve azonban meghatározható a vizsgált komponensek megfelelő felbontású, szelektív elválasztását biztosító mozgófázis összetétel. Az alábbi ábrákon néhány gyakorlati példát kívánok ismertetni.

A 3.3.11.a kromatogramon látható, hogy 3 mM koncentrációjú, 10,8-as pH -jú karbonát puffer mozgófázis esetén a SO_4^{2-} és PO_4^{3-} ionok koelúciója okoz problémát, míg

4,5 mM / 10,2 pH összetételű eluens esetén a $[\text{GdDTPA}]^{2-}$ és PO_4^{3-} ionok elválasztása nem megfelelő (3.3.11.b ábra). A retenciós modell alkalmazásával azonban meghatározhatóak az elválasztás szempontjából optimális elúciós körülmények, melyre példa a 3.3.11.c kromatogramon látható.



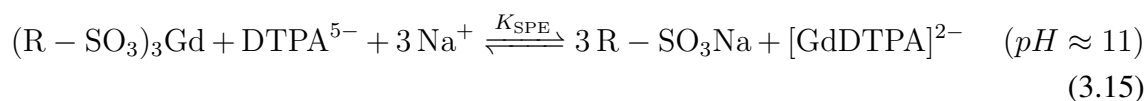
3.3.11. ábra. $[\text{GdDTPA}]^{2-}$ komplex anion elválasztása szervesetlen ionok jelenlétében. (Mérési körülmények: 3,0 mM / 10,8 pH (a), 4,5 mM / 10,2 pH (b), 3,0 mM / 10,5 pH (c) karbonát puffer, $v = 1,2$ mL/min.)
1– Cl^- , 2– NO_3^- , 3– $[\text{GdDTPA}]^{2-}$, 4– SO_4^{2-} , 5– PO_4^{3-} (0,1–0,02–0,01–0,01–0,05 mM)

3.3.4. Mátrixhatások csökkentésére szolgáló mintaelőkészítési eljárás kidolgozása és minősítése

Az elválasztás hatékonysága és a detektálás érzékenysége megfelelő mintaelőkészítéssel jelentősen javítható, így az előzőekkel párhuzamosan olyan mintaelőkészítési módszer kidolgozását tűztük ki célul, mely a mátrixalkotók hatékony eltávolítása mellett lehetővé teszi nyomnyi mennyiségben jelen lévő Gd-kelátok minőségi és mennyiségi meghatározását.

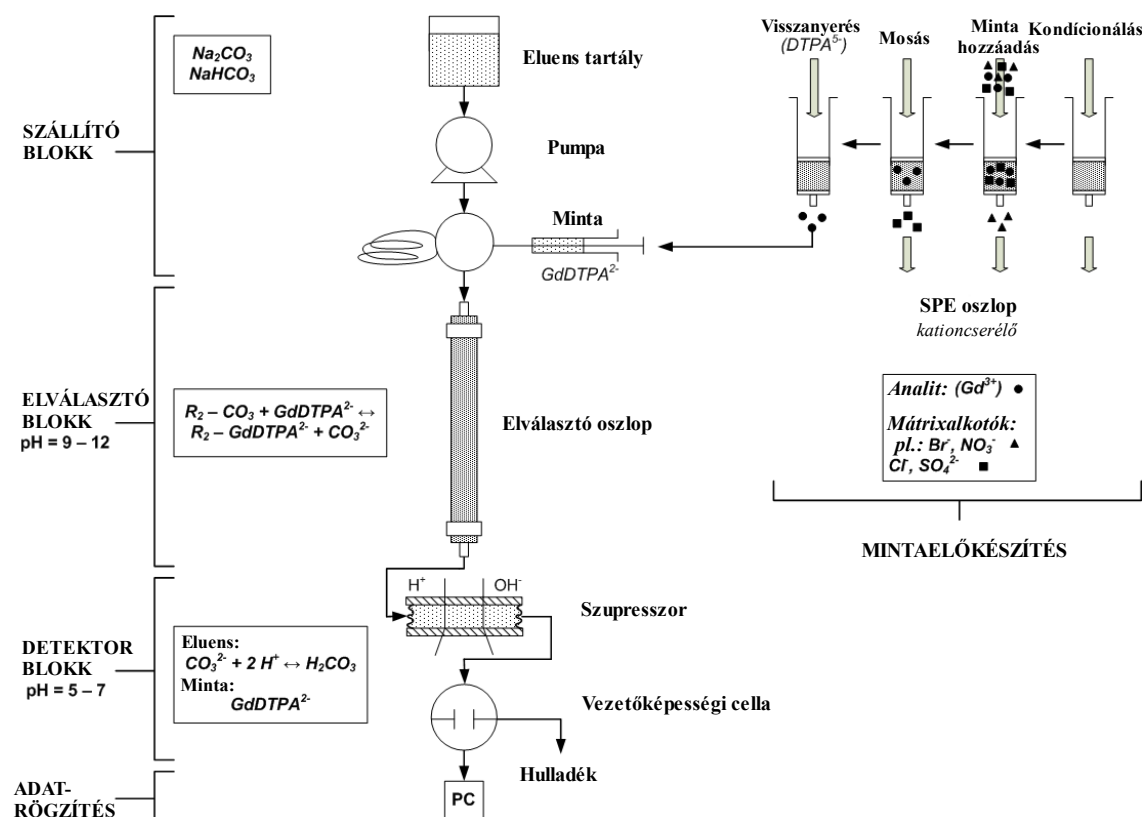
A Gd^{3+} fémion mintamátrixból való szeparálásához kationcserélő szilárd fázisú extrakciós (SPE) töltetet választottunk, melyről a megfelelő lépéseket követően DTPA^{5-}

komplekképző ligandummal a fémion az alábbi reakcióegyenlet szerint eluálható.



Látható, hogy az elúció komplexképződési és anioncsere-reakciók együttes eredménye. A nátrium anioncsere révén az állófázis szulfoncsoportjáról eltávolítja a gadolínium fémiont, mely a DTPA ligandummal komplexet képez. Mivel a kialakult kelát komplex anionként van jelen, ezért retenciót nem szenvedve eltávolítható a töltetről, majd anioncsere-kromatográfiás módszerrel vizsgálható.

A kidolgozott, nyomnyi mennyiségű Gd-DTPA illetve közvetett módon Gd^{3+} fémion meghatározására alkalmas analitikai módszer lépéseit a 3.3.12. ábrán ismertetem.

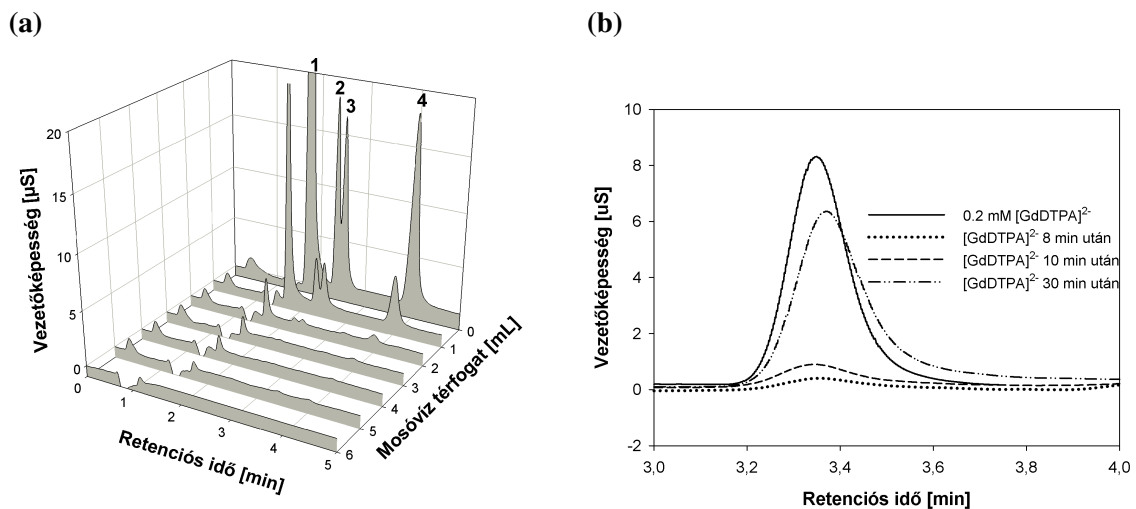


3.3.12. ábra. Gadolínium fémion közvetett elemzésére kidolgozott mintaelőkészítéssel kombinált analitikai módszer vázlatja.

Munkánk során a mintaelőkészítés minden lépését részletesen kidolgoztuk és minősítettük. Első lépésben savas körülmények között kondicionáltuk az SPE töltetet, ezzel biztosítva a Gd^{3+} fémion hatékony visszatartását és a mátrix anionok retenciójának elkerülését. Ezt követően egy ismert összetételű, mátrix anionokat (Cl^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-}) és Gd^{3+} fémiont tartalmazó modell oldatot (1 mL) vittünk fel a töltetre. Az effluenshez DTPA komplexképzőt adagolva, anioncsere-kromatográfiás módszerrel ellenőriztük a gadolínium visszatartásának hatékonyságát. Eredményeink alapján a töltet a mintaoldatbeli Gd^{3+} teljes mennyiségét megkötötte.

A mintaelőkészítés harmadik lépéséhez kapcsolódóan a mátrixkomponensek eltávolításához szükséges mosóoldat mennyiségét vizsgáltuk. Az SPE töltet többszöri, 1-1 mL térfogatú nagy tisztaságú vízzel való mosása során az egyes részleteket külön gyűjtve off-line IC technikával követtük nyomon a mátrix anionok eltávolítási hatékonyságát (3.3.13.a ábra). Úgy találtuk, hogy az említett zavaró ionok töltetről való megfelelő eltávolításához 6 mL mosóoldat térfogat szükséges.

A mintaelőkészítés utolsó lépéseként elvégeztük a Gd^{3+} fémion visszanyerését, melyhez DTPA kelátképző ligandum nátrium sójának oldatát (1 mL, 0,2 mM Na_2DTPA) alkalmaztuk. Az elúciót lúgos körülmények között ($pH \approx 11$) végeztük. Bár a reakció egyensúlyi állandója magas ($K_{SPE} > 10^{18}$), és ezáltal a Gd-kelát komplex energetikailag stabilabb, mint a Gd-szulfoncsoport ionpár, a reakció kinetikája is meghatározó. Előbbi ismeretében vizsgáltuk a komplexialakulás időigényét, melynek eredménye a 3.3.13.b ábrán látható. Megállapítottuk, hogy az "áztatási" idő növelésével növekszik az SPE töltetről eluálható komplex mennyisége. 30 perces kontaktidő alatt $\sim 91\%$ -os visszanyerést értünk el. Előbbi értéket az oldatok anioncsere-kromatográfiás analízisével, 3 párhuzamos mintára kapott eredmény átlagából határoztuk meg.



3.3.13. ábra. Szervetlen mátrixionok eltávolítása a mosási térfogat függvényében (a), valamint a Gd^{3+} fémion DTPA-kelát komplex formájában való visszanyerése különböző áztatási idők mellett (b) szilárdfázisú extrakciós (SPE) töltetről.

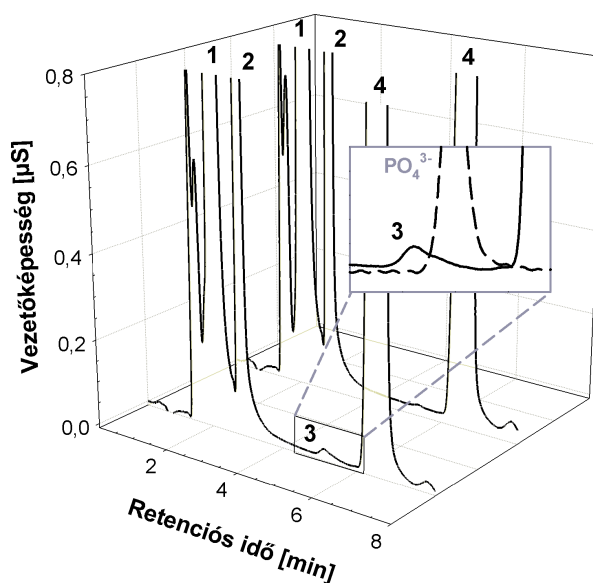
1— Cl^- , 2— Br^- , 3— NO_3^- , 4— SO_4^{2-} (1—0,1—0,1—0,01 mM)

A fent bemutatott analitikai módszer gyakorlati alkalmazhatóságára az alábbiakban adok példát. A 3.3.14. ábrán közönséges csapvíz, valamint $[GdDTPA]^{2-}$ komplex anionnal ($0,33 \mu M$) addicionált csapvíz injektálását követően rögzített kromatogramok szerepelnek. Látható, hogy az említett komponens, nagy mennyiségben jelen lévő mátrix ionok mellett is szelektíven és érzékenyen detektálható. Az eljárás ("spike") ellenőrzése céljából $[GdDTPA]^{2-}$ komplex anionra a (3.16) összefüggés alapján határoztam meg a visszanye-

rés hatékonyságát (%*RC*).

$$\%RC = 100 \times \left(\frac{SPS - S}{SP} \right) \quad (3.16)$$

ahol *S* és *SPS* a vizsgált komponens mintabeli, illetve addíciónált mintabeli mennyiségét, *SP* pedig az addíciónált mennyiséget jelöli. Az általánosan elfogadott tartomány %*RC* = 90–110%, így az általam meghatározott %*RC* ([GdDTPA]²⁻) = 96,8% visszanyerési érték megfelelőnek tekinthető.



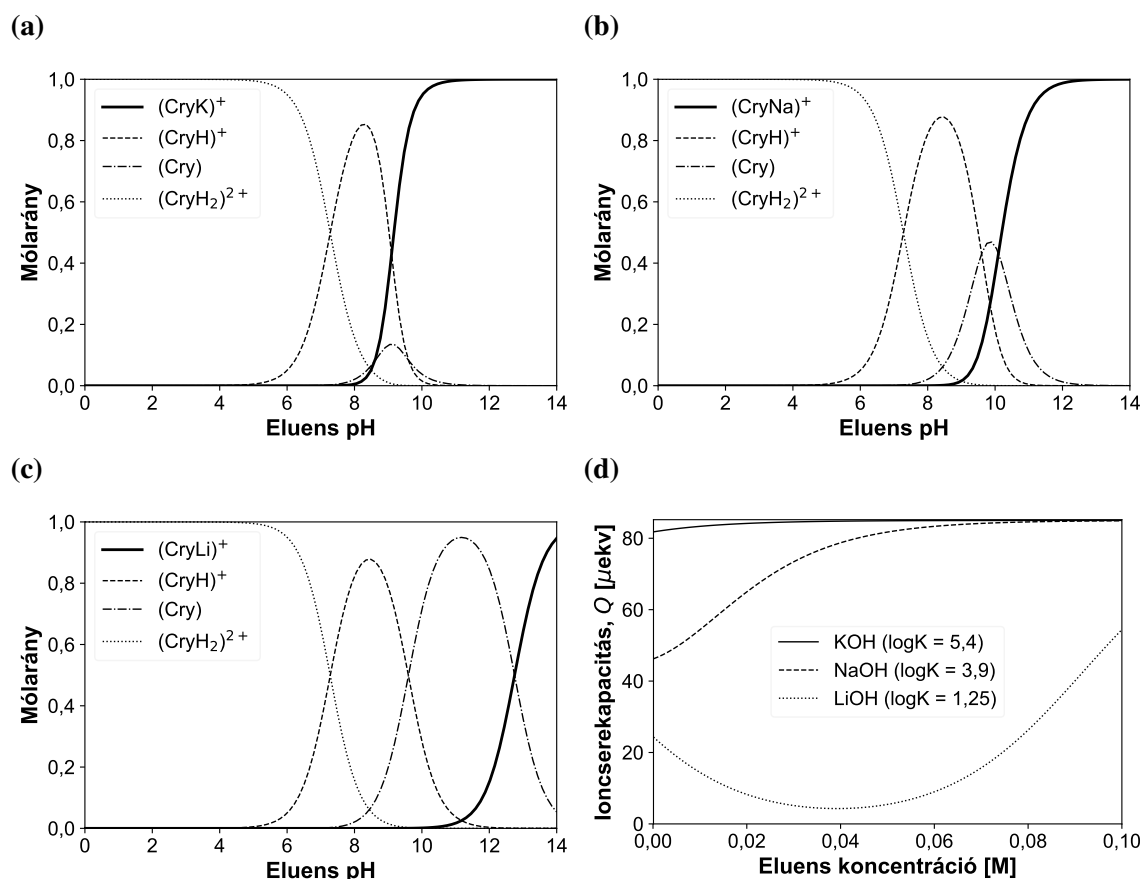
3.3.14. ábra. Gd-DTPA komplex anion (0,33 µM) elválasztása ivóvíz mintában spikeolást követően. (Mozgófázis: 2,0 mM karbonát puffer, pH = 10,2, *v* = 1,2 mL/min, szűrés: 0,45 µm.)

1–Cl⁻, 2–NO₃⁻, 3–[GdDTPA]²⁻, 4–SO₄²⁻

A fent bemutatott, Gd-kelát komplexek, valamint szerves és szervetlen mátrixionok ionkromatográfiás elválasztásával kapcsolatban született eredmények 2016-ban [92] kerültek publikálásra.

3.4. Állófázisbeli komplexképződésen alapuló anioncsere- kromatográfias karbonsav elválasztások kriptand- funkcionalizált tölteteken

Vizsgálataim során egy n-decil-2.2.2 kriptand ligandumokkal funkcionizált állófázist alkalmaztam, melyen az egyes komponensek elválasztását alkáli-hidroxiidos elúcióval valósítottam meg. Kísérleti munkámban kálium-, nátrium- és lítium-hidroxid mozgófázisokat használtam. Az egyes alkáli-hidroxid eluensek kémhatásának és fémion koncentrációjának függvényében, a függelékben szereplő 6. táblázat adatait felhasználva, meghatároztam az egyes kriptand formák molarányának, valamint az oszlop ioncserekapacitásának változását, melyet a 3.4.1. ábrán szemléltetek.



3.4.1. ábra. Az állófázison lévő kriptand molekulák komplexált, protonált és szabad formáinak molaránya a pH függvényében KOH (a), NaOH (b) és LiOH (c) mozgófázisok esetén, valamint az állófázis ioncserekapacitásának alakulása a fémion koncentráció függvényében (d).

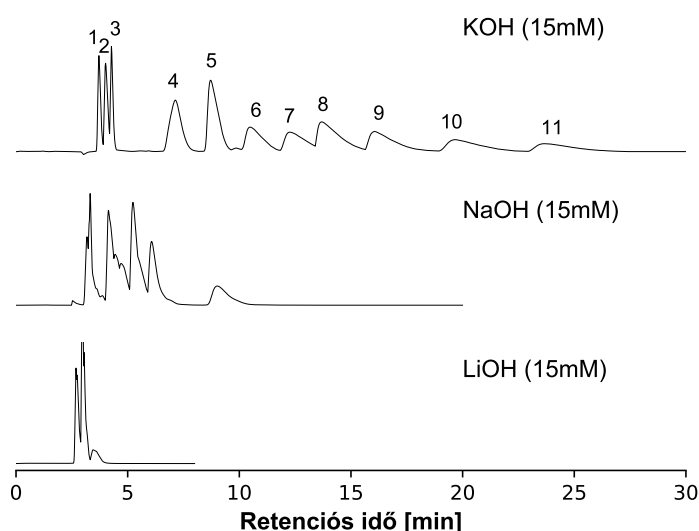
A töltet teljes ioncserekapacitása (Q) az ioncsereben részt nem vevő szabad kriptand molekulák, valamint a protonált és komplexált állapotban lévő kriptand specieszek mól-arányainak ismeretében adható meg (3.17a, 3.17b, 3.17c). A kapcsolódó protonálódási, komplexálódási és ioncsere-egyensúlyi folyamatokat a (1.48-1.54) összefüggések írják le.

$$Q = Q_0 + Q_H + Q_M \quad (3.17a)$$

$$Q_0 = \Phi_{\text{Cry}} Q \quad \text{és} \quad Q_H = (\Phi_{\text{CryH}} + \Phi_{\text{CryH}_2}) Q \quad (3.17b)$$

$$Q_M = \Phi_{\text{CryM}} Q = \frac{K_M [M]}{1 + K_1 [H] + K_2 K_1 [H]^2 + K_M [M]} Q \quad (3.17c)$$

ahol Q_0 a teljes ioncserekapacitás ioncsereben részt nem vevő szabad kriptand specieszek formájában való része, Q_H a protonált kriptand molekulák, Q_M pedig a komplexált kriptand molekulák biztosította ioncserekapacitás. Kriptand állófázisok esetén a mozgófázis hajtóereje és az oszlop ioncserekapacitása egymással szoros kapcsolatban van, hiszen előbbi az ellenion, utóbbit pedig a fémion koncentrációja határozza meg, mely alkáli-hidroxid oldatok esetében azonos. Erős bázisokról lévén szó, a mozgófázis pH-ja könnyen számítható. Méréseimet $\text{pH} \geq 10,7$ tartományban ($c = 0,5-100 \text{ mM}$) végeztem, ahol mint az a 3.4.1.a, 3.4.1.b és 3.4.1.c ábrákon is látható, a komplexált és szabad kriptand specieszek túlsúlya jellemző, az egyszerűen protonált forma csak Li^+ fémion esetén jelenik meg, míg a kétszeresen protonált ligandum jelenlétével nem kell számolni. A komplexált forma mólarányát és ezáltal az oszlop hasznos ioncserekapacitását a fém-ligandum komplex stabilitási állandója (K_M) és a fémion koncentrációja határozza meg (3.4.1.d ábra). A mozgófázis fémionjának változtatásával jelentős szelektivitásbeli változás érhető el.



3.4.2. ábra. Retencióbeli különbségek azonos koncentrációjú, de eltérő alkálifém iont tartalmazó hidroxid eluensek esetén.

1–acetát, 2–propionát, 3–piruvát, 4–tartarát, 5–oxalát, 6–adipát, 7–pimelát, 8–TFA, 9–BCA, 10–ftalát, 11–benzoát

A 3.4.2. ábrán bemutatott kromatogramok azonos koncentrációjú, de eltérő alkálifém ion tartalmú mozgófázisok mellett kerültek rögzítésre. Látható, hogy különösen KOH eluens esetén a kromatográfiás csúcsok meglehetősen aszimmetrikusak, melynek oka a retenciós / elúciós folyamatok összetettsége. Ionkromatográfiás elválasztások esetében az állófázis funkciós csoportjai és a komponensek között kialakuló ionos kötések erős kémiai kötésnek tekinthetők, melynek következtében jellemzően nagyobb visszatartás és csúcsszélesség tapasztalható, összehasonlítva az adszorpción alapuló HPLC technikákkal. Bizonyos komponensek az ioncserélő állófázison további, nemionos adszorpciósi folyamatok révén is kötődhetnek. Amennyiben többféle retenciós mechanizmus is zajlik az elválasztás során és ezen folyamatok eltérő mértékben befolyásolják az adott komponens retencióját úgy "tailing"-esedés tapasztalható.

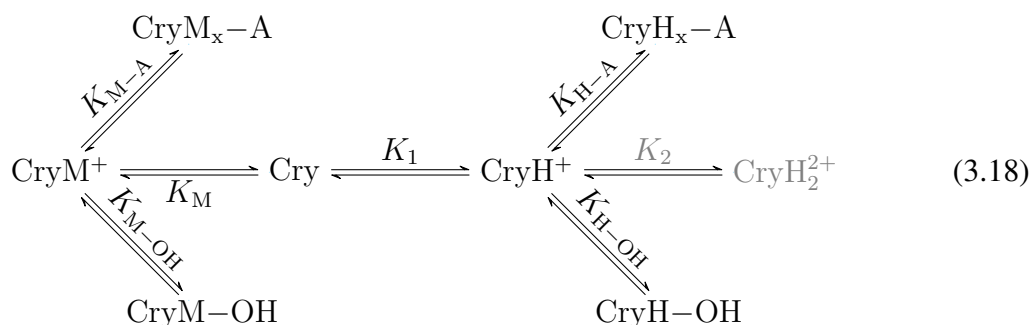
Kriptand állófázis esetében nemcsak annak funkciós csoportja és az elválasztandó anion, hanem a kriptand gyűrű és a mozgófázis fémionja között is ioncsere zajlik. Ez a „kétlépcsős” retenciós mechanizmus már alapvetően a csúcsok szélességének és aszimmetriájának növekedését eredményezi. A fémion kötődési hajlamának növekedésével a fémion-kriptand ioncsere-egyensúly retencióra gyakorolt hatása növekszik, melynek eredményeként $\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+$ irányban egyre jelentősebb a csúcsok „tailing”-esedése. Ezen kevésbé előnyös tulajdonságuk mellett a kriptand állófázisok esetében több módszerfejlesztési lehetőség áll rendelkezésre mint hagyományos anioncserélők alkalmazása mellett. A fent bemutatott kromatogramok jól szemléltetik a fémion megválasztásának jelentőségét, hiszen az egyes alkáli-hidroxidokkal jelentősen eltérő az elválasztás szelektivitása. A kriptand fázisok ezen tulajdonsága ún. kapacitásgradiens alkalmazását teszi lehetővé, melyről a 3.4.3.2 fejezetben értekezem részletesebben.

3.4.1. Komponensek retenciójának leírása kriptand típusú állófázis esetén

3.4.1.1. Bővített kriptand retenciós modell levezetése

Makrociklus alapú ioncserélők esetében az eluens koncentráció és a retenciós faktorok közötti kapcsolat nem írható le lineáris összefüggéssel. Előbbi azzal magyarázható, hogy a kriptand típusú állófázison történő elválasztás a hagyományos ioncserélőkkel összehasonlítva jelentősen komplexebb folyamatok eredménye. Előbbiek esetében az állófázison szimultán zajlanak protonálódási, komplexképződési és anioncsere-egyensúlyi folyamatok. Korábban az irodalmi összefoglalóban (1.3.2.5) részletesen ismertetett részfolyama-

tokat az alábbi egyenletrendszer segítségével kívánom összefoglalni.

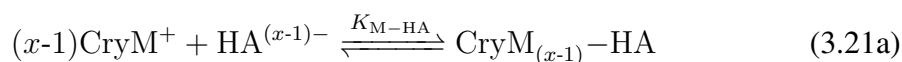


ahol K_1 , K_2 és K_M a kriptand molekula protonálódási illetve komplexképződési állandói, K_{M-OH} és K_{H-OH} pedig az eluens anion komplexált illetve protonált kriptand funkció csoporttal kialakított kötési állandói. Ezen paramétereket a korábban leírt összefüggéseknek (1.48-1.51, 1.53) megfelelően használtam fel. A kétszeresen protonált kriptand forma jelenlétével a lúgos elúcióra ($\text{pH} \geq 10$) tekintettel nem számoltam. A *bővített kriptand retenciós modell* kidolgozása során a korábbi modellt kiterjesztettem többszörös töltéssel (x) rendelkező mintaanionok esetére, melynek során a mintaanion komplexált (K_{M-A}) illetve protonált (K_{H-A}) kriptand molekulához kötődését a következő egyensúlyi állandókkal jellemeztem.

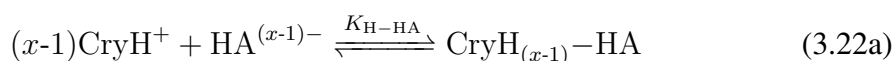
$$K_{M-A} = \frac{(\text{CryM}_x\text{-A})}{(\text{CryM}^+)^x [\text{A}^{x-}]} \quad (3.19)$$

$$K_{H-A} = \frac{(\text{CryH}_x\text{-A})}{(\text{CryH}^+)^x [\text{A}^{x-}]} \quad (3.20)$$

Az elúciós körülmények között protonálódni képes mintaanion esetén a protonált forma állófázison való kötődését az alábbi egyenletekkel írtam le.



$$K_{M-HA} = \frac{(\text{CryM}_{(x-1)}\text{-HA})}{(\text{CryM}^+)^{(x-1)} [\text{HA}^{(x-1)-}]} \quad (3.21b)$$



$$K_{H-HA} = \frac{(\text{CryH}_{(x-1)}\text{-HA})}{(\text{CryH}^+)^{(x-1)} [\text{HA}^{(x-1)-}]} \quad (3.22b)$$

A fentieknek megfelelően a töltet ioncserekapacitásának (Q) számítására szolgáló összefüggést az alábbiak szerint módosítottam.

$$\begin{aligned}
 Q = & (\text{Cry}) + (\text{CryH}^+) + (\text{CryM}^+) + (\text{CryH-OH}) + (\text{CryM-OH}) + \\
 & + (\text{CryH}_x\text{-A}) + (\text{CryH}_{(x-1)}\text{-HA}) + (\text{CryM}_x\text{-A}) + (\text{CryM}_{(x-1)}\text{-HA})
 \end{aligned} \quad (3.23)$$

A komponens álló- és mozgófázis közötti egyensúlyát leíró megoszlási hányadost az aláb-

bi összefüggés szerint számítottam.

$$D_A = \frac{(A)}{[A]} = \frac{(\text{CryM}_x - A) + (\text{CryM}_{(x-1)} - \text{HA}) + (\text{CryH}_x - A) + (\text{CryH}_{(x-1)} - \text{HA})}{[A^{x-}] + [\text{HA}^{(x-1)-}]} \quad (3.24a)$$

$$[A^{x-}] = \Phi_0 [A] \quad (3.24b)$$

$$[\text{HA}^{(x-1)-}] = \Phi_1 [A] \quad (3.24c)$$

ahol (A) és [A] a mintaanion állófázisbeli illetve mozgófázisbeli összkoncentrációját, Φ_0 és Φ_1 pedig a protonátlan és az egyszeresen protonált anionos formák molarányát jelöli. Mivel az alkalmazott elúciós körülmények között a többszörösen protonált specicszek kialakulása nem jellemző, ezért a modell levezetése során csak egyszeresen protonált forma jelenlétével számoltam, azonban szükség esetén a modell tovább bővíthető.

A fent bemutatott összefüggéseket felhasználva többértékű, protonálódni képes mintaanionok kriptand állófázison való retenciójának leírására az alábbi modellt vezettem le.

$$k = D_A \frac{V_s}{V_m} = \left[\frac{\Phi_0 [A] \text{Cry}^x [K_{\text{H-A}} (K_1 [\text{H}^+])^x + K_{\text{M-A}} (K_M [\text{M}^+])^x]}{\Phi_0 [A] + \Phi_1 [A]} + \frac{\Phi_1 [A] \text{Cry}^{(x-1)} [K_{\text{H-HA}} (K_1 [\text{H}^+])^{(x-1)} + K_{\text{M-HA}} (K_M [\text{M}^+])^{(x-1)}]}{\Phi_0 [A] + \Phi_1 [A]} \right] \quad (3.25)$$

A retenciós modellben (3.25) szereplő Cry tagot az alábbi összefüggéssel definiáltam.

$$\text{Cry} = \frac{Q}{1 + K_1 [\text{H}^+] + K_M [\text{M}^+] + \Phi_0 [A] (p_1) + \Phi_1 [A] (p_2) + [\text{OH}^-] (q)} \quad (3.26a)$$

$$p_1 = (K_{\text{H-A}} K_1 [\text{H}^+]^x + K_{\text{M-A}} K_M [\text{M}^+]^x) \quad (3.26b)$$

$$p_2 = (K_{\text{H-HA}} K_1 [\text{H}^+]^{(x-1)} + K_{\text{M-HA}} K_M [\text{M}^+]^{(x-1)}) \quad (3.26c)$$

$$q = (K_{\text{M-OH}} K_M [\text{M}^+] + K_{\text{H-OH}} K_1 [\text{H}^+]) \quad (3.26d)$$

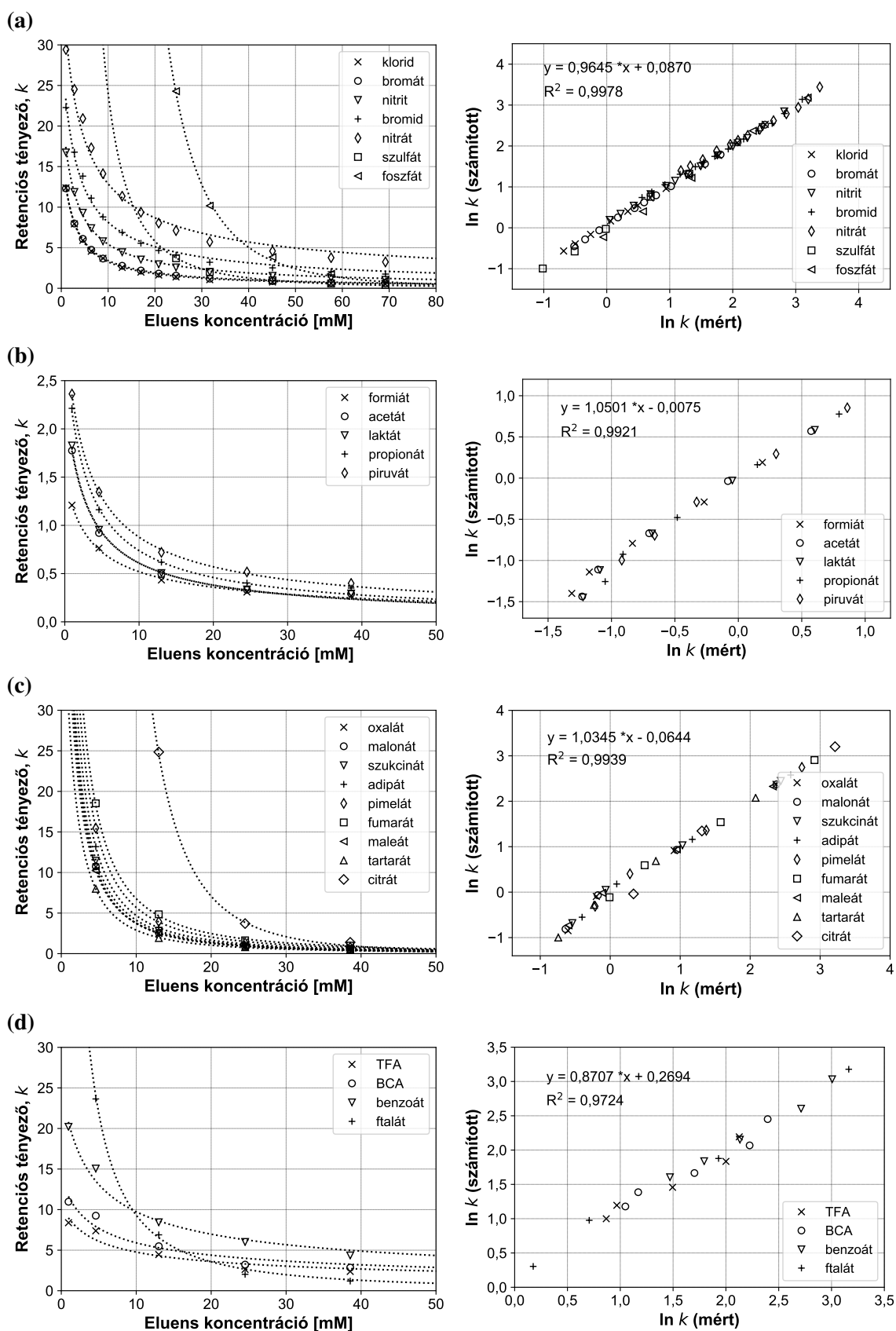
3.4.1.2. Bővített kriptand retenciós modell alkalmazása

Munkám során különböző kémiai szerkezetű analitok, szisztematikusan változtatott eluens összetételek esetén megvalósítható anioncsere-kromatográfiás elválasztását kutattam. Szervetlen Cl^- , BrO_3^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} és PO_4^{3-} anionok mellett szerves, egy- és többértékű, alifás és aromás, valamint halogénezett karbonsav anionok retenciós tulajdonságait vizsgáltam. Karboxilátok közül formiát, acetát, laktát, propionát, piruvát, oxalát, malonát, szukcinát, adipát, pimelát, fumarát, maleát, tartarát, citrát, TFA, BCA, benzoát, ftalát és szalicilát anionok retenciós adatait rögzítettem. Az említett komponensek közül foszfát és szalicilát anionok esetében a teljesen disszociált forma mellett egyszeresen protonált specicsz jelenlétével is számoltam.

Az egyes vizsgálandó komponenseket külön-külön injektáltam annak érdekében, hogy az esetleges analit-analit interakciók retenciót befolyásoló hatását kiküszöböljem, továbbá hogy a közel azonos retenciójú komponensekről is adatot gyűjthessek. A retenciós tényező értékeket jellemzően három párhuzamos mérés átlagából számítottam. A különböző mozgófázis összetételeknél rögzített retenciós adatokat a függelékben szereplő 8., 9., 10., 11., 12. táblázatokban tüntettem fel.

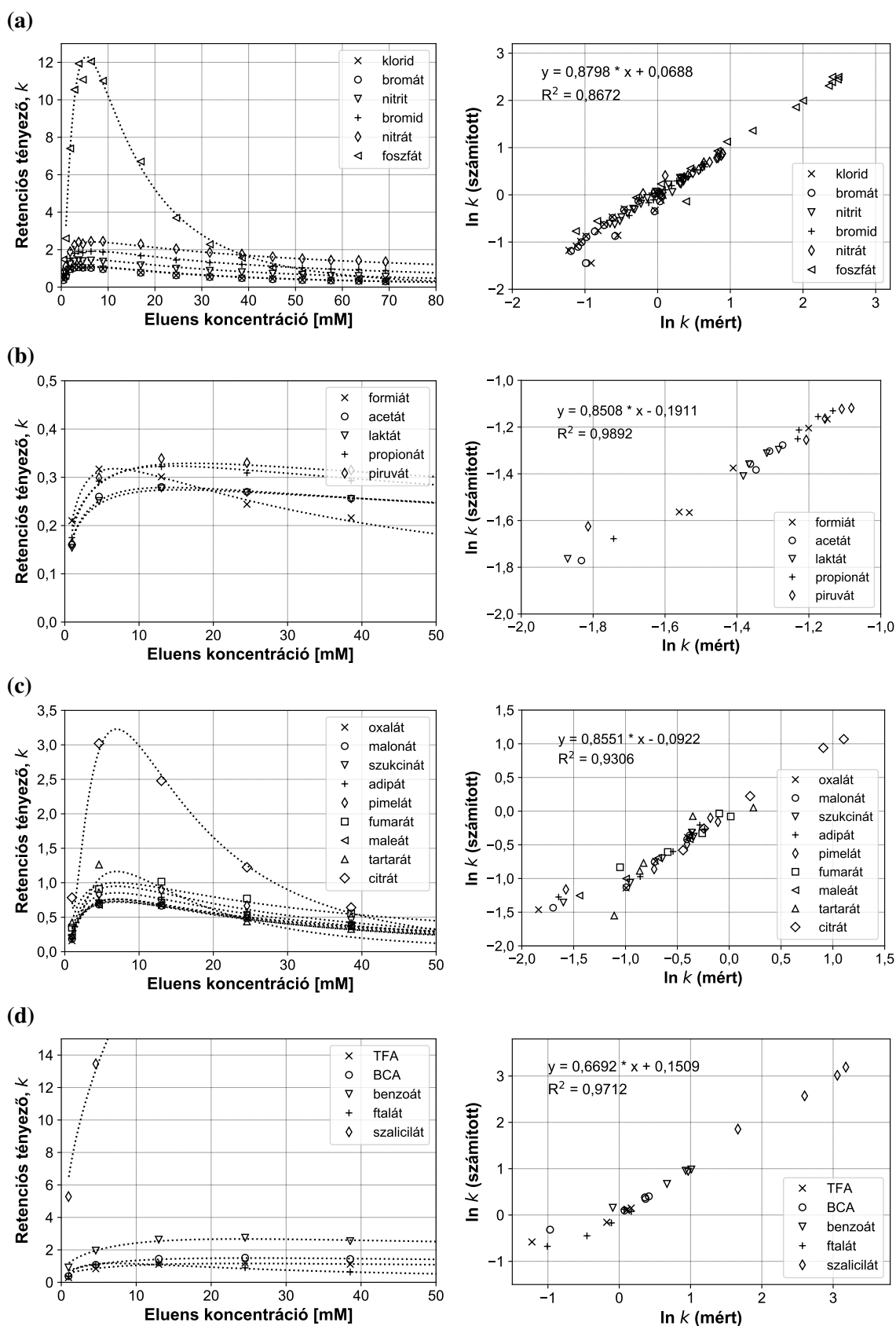
Az általam levezetett bővített kriptand modell helyességét kísérleti retenciós adatokra illesztéssel ellenőriztem, melynek során a különböző egyensúlyi paramétereket is meghatároztam. A 3.4.3 ábrán a vizsgált szervetlen és karboxilát anionok retenciós tényezőjének alakulását tüntettem fel KOH mozgófázis koncentrációjának függvényében. Az eluens ionerősségének növelésével minden esetben csökkenés volt tapasztalható a retenciós tényezők tekintetében.

3.4. ÁLLÓFÁZISBELI KOMPLEXKÉPZŐDÉSEN ALAPULÓ ANIONCSERE-KROMATOGRÁFIÁS KARBONSAV ELVÁLASZTÁSOK KRIPTAND-FUNKCIONALIZÁLT TÖLTETÉKEN



3.4.3. ábra. Szervetlen anionok (a), monovalens (b), di- és trivalens (c), valamint halogénezett és aromás (d) karbonsav anionok mért és számított retenció tényezője az eluens-koncentráció függvényében KOH mozgófázis esetén.

3.4. ÁLLÓFÁZISBELI KOMPLEXKÉPZŐDÉSEN ALAPULÓ ANIONCSERE-KROMATOGRÁFIÁS KARBONSAV ELVÁLASZTÁSOK KRIPTAND-FUNKCIONALIZÁLT TÖLTETEKEN

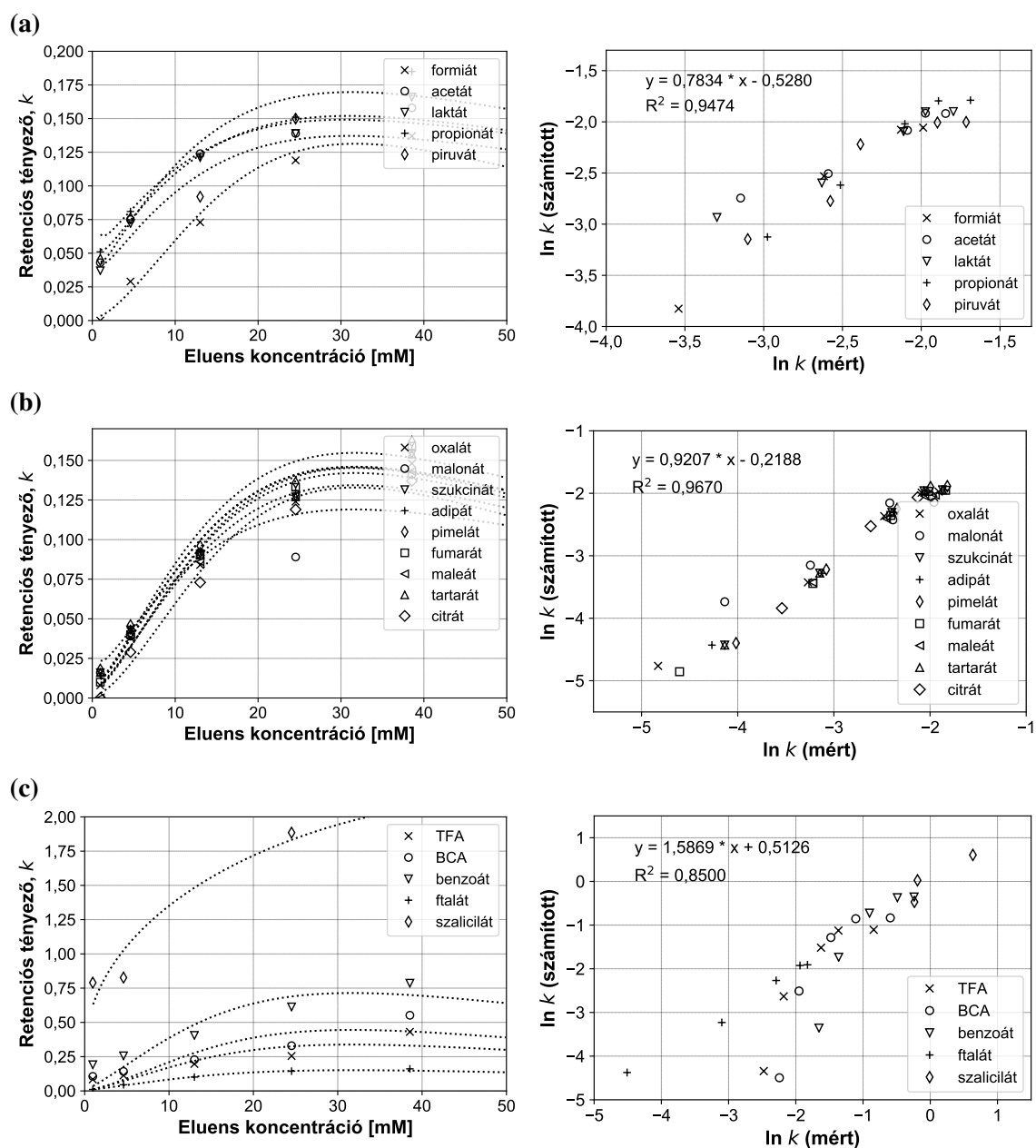


3.4.4. ábra. Szervetlen anionok (a), monovalens (b), di- és trivalens (c), valamint halogénezett és aromás (d) karbonsav anionok mért és számított retenció tényezője az eluens-koncentráció függvényében NaOH mozgófázis esetén.

3.4. ÁLLÓFÁZISBELI KOMPLEXKÉPZŐDÉSEN ALAPULÓ
ANIONCSERE-KROMATOGRÁFIÁS KARBONSAV ELVÁLASZTÁSOK
KRIPTAND-FUNKCIONALIZÁLT TÖLTETEKEN

NaOH mozgófázis alkalmazása mellett az ionerősség emelésével kezdetben a retenció tényezők növekedését, majd ezt követően azok csökkenését tapasztaltam (3.4.4. ábrák). A görbék ilyen jellegű lefutásának magyarázata, hogy a kezdeti szakaszban, a stabilitási állandóval összefüggésben az állófázis ioncserekapacitásának emelkedése (3.4.1. ábra) is hatással van a retenció alakulására, majd tovább növelve a mozgófázis koncentrációt egyre inkább az elúciós erő válik meghatározóvá.

LiOH elúció esetén az ionerősség növelésével az általam vizsgált komponensek visszatartása növekedett, mely szintén az ioncserekapacitás változására vezethető vissza.



3.4.5. ábra. Monovalens (a), di- és trivalens (b), valamint halogénezett és aromás (c) karbonsav anionok mért és számított retenció tényezője az eluenskoncentráció függvényében LiOH mozgófázis esetén.

A vizsgált komponensek retenciójával kapcsolatban jellemzően a hagyományos anioncsere-lőknél tapasztaltak érvényesülnek. Szervetlen komponensek esetén a retenció a polarizálhatósággal és az értékűséggel növekszik, mely változás az anion töltésének növekedésével egyre jelentősebb. Karboxilátok esetén a karboxil ($-\text{COOH}$) csoportok számának, azaz az anion töltésének szerepe hasonló a szervetlen ionoknál tapasztaltakhoz. Előbbiek mellett a szénlánc hosszának növekedésével a visszatartás növekszik, illetve azonos alapszerkezetű komponensek esetén hidroxó ($-\text{OH}$) csoportok jelenlétével csökken a retenció. Az acetát halogénezett formái esetében a molekula dipólusmomentumának növekedésével szintén növekedés tapasztalható a komponensek visszatartásában. Az aromás karboxilátok esetében jelentősen magasabb retenció figyelhető meg, mely a karbonsav aromás gyűrűje és az állófázis makrociklikus gyűrűje közötti másodlagos $\pi - \pi$ kötések kialakulásával magyarázható.

A modell alkalmazása során minden esetben megvizsgáltam a mért és a számított retenció tényező adatok közötti korrelációt, melynek eredményét a fenti ábrákon is feltüntettem. A mért illetve számított retenció tényező értékek egyezőségét jellemző korrelációs egyenesek meredekségének számszerű értékei az egyes komponensek esetén a Függelék: 13. táblázatban láthatók. A maximális ioncserekapacitást biztosító KOH mozgófázis esetében a kidolgozott modell által becsült értékek átlagos hibája szervetlen ionokra $\pm 2\%$, monokarbonsavakra $\pm 5\%$, dikarbonsavakra $\pm 2,5\%$, citrát, benzoát és ftalát anionokra $\pm 2\%$ volt. Nitrát, TFA és BCA ionok esetében az illesztés átlagos hibája $\pm 12\%$ -nak adódott. Nátrium-hidroxid mozgófázis esetében szervetlen ionok és citrát retenció tényezői $\pm 3,5\%$ -os illetve $\pm 5\%$ -o hibával voltak illeszthetők. A monokarboxilátok NaOH alkalmazása esetén közel holtidőben eluálódtak, így azok mért retenció tényező értékeinek meghatározása nehézkes volt, ezzel összefüggésben az illesztés átlagos hibája ezen komponensekre magasabb ($\pm 15\%$) volt. Dikarbonsavak esetében hasonló értéket ($\pm 17\%$ -o) határoztam meg. Nitrát, TFA és BCA, valamint aromás karboxilátok esetében az illesztések hibája $> \pm 20\%$ -nak adódott. Lítium-hidroxid mozgófázis esetében a mérések bizonytalansága a komponensek alacsony visszatartásával összefüggésben nagyobb mértékű volt. Ftalát és szalicilát esetében viszont alacsony $\pm 2,5\%$ -os hibával volt becsülhető a retenció tényező értékek változása.

A modell által számított eredmények összességében megfelelőek voltak (lásd 3.4.3, 3.4.4, 3.4.5 retenció görbék), azok gyakorlatban való alkalmazása jelentős segítséget nyújt az optimális elválasztási körülmények meghatározásához.

3.4. ÁLLÓFÁZISBELI KOMPLEXKÉPZŐDÉSEN ALAPULÓ
ANIONCSERE-KROMATOGRÁFIÁS KARBONSAV ELVÁLASZTÁSOK
KRIPTAND-FUNKCIONALIZÁLT TÖLTETEKEN

A kísérleti adatokat és a modellt felhasználva számítottam az egyes komponensek különböző alkálifém tartalmú mozgófázisok esetén mutatott retencióját meghatározó egyensúlyi állandókat, melyek számszerű értékeit az alábbi táblázatban tüntettem fel.

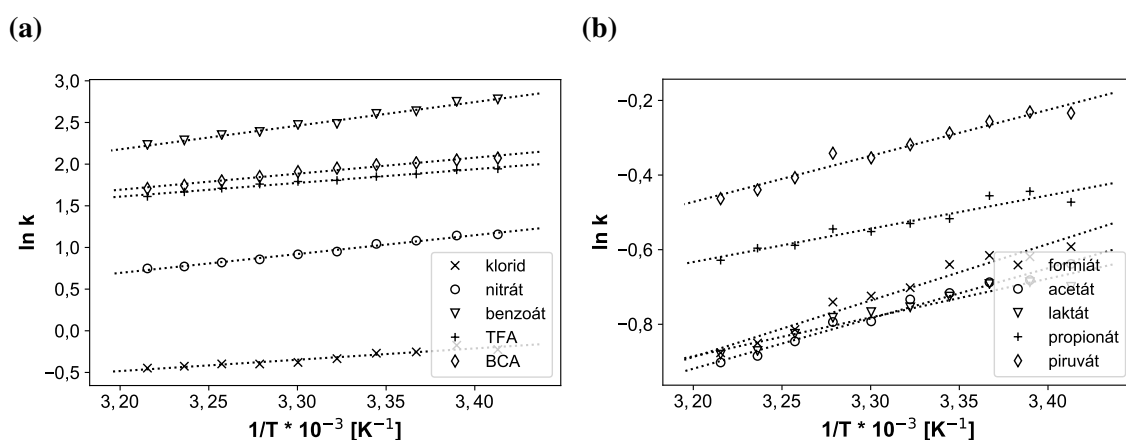
3.6. táblázat. Kriptand típusú állófázison lejátszódó ioncsere- és komplexképződési folyamatok iterációval meghatározott egyensúlyi paramétereit.

Komponens	KOH			NaOH			LiOH			K_{H-A}
	K_{M-A}	K_{M-HA}	x'	K_{M-A}	K_{M-HA}	x'	K_{M-A}	K_{M-HA}	x'	
<i>klorid</i>	$1,47 \times 10^2$	-	0,98	$4,56 \times 10^1$	-	1,58	-	-	-	-
<i>bromát</i>	$1,33 \times 10^2$	-	0,94	$4,35 \times 10^1$	-	1,57	-	-	-	-
<i>nitrít</i>	$1,46 \times 10^2$	-	0,84	$2,89 \times 10^1$	-	1,25	-	-	-	-
<i>bromid</i>	$1,63 \times 10^2$	-	0,76	$2,35 \times 10^1$	-	1,03	-	-	-	4,81
<i>nitrát</i>	$1,72 \times 10^2$	-	0,65	$1,64 \times 10^1$	-	0,77	-	-	-	-
<i>szulfát</i>	$1,66 \times 10^5$	-	2,34	$2,70 \times 10^3$	-	2,76	-	-	-	-
<i>foszfát</i>	$1,13 \times 10^3$	$1,47 \times 10$	3,75	$6,55 \times 10^{-7}$	$6,56 \times 10^3$	3,60	-	-	-	1,88
<i>formiát</i>	3,12	-	0,61	1,71	-	0,93	$2,24 \times 10^2$	-	1,45	3,76
<i>acetát</i>	6,81	-	0,77	$3,51 \times 10^{-1}$	-	0,31	2,67	-	0,63	0,20
<i>laktát</i>	7,09	-	0,78	$3,18 \times 10^{-1}$	-	0,28	3,82	-	0,69	0,22
<i>propionát</i>	8,59	-	0,78	$4,26 \times 10^{-1}$	-	0,33	6,32	-	0,76	0,60
<i>piruvát</i>	7,78	-	0,71	$3,92 \times 10^{-1}$	-	0,28	4,56	-	0,74	0,48
<i>oxalát</i>	$2,04 \times 10^3$	-	1,77	$4,83 \times 10^1$	-	1,94	$6,07 \times 10^1$	-	1,20	1,33
<i>malonát</i>	$1,91 \times 10^3$	-	1,75	$3,56 \times 10^1$	-	1,83	9,13	-	0,89	0,35
<i>szukcinát</i>	$1,87 \times 10^3$	-	1,72	$3,20 \times 10^1$	-	1,77	$3,79 \times 10^1$	-	1,11	2,14
<i>adipát</i>	$2,13 \times 10^3$	-	1,72	$4,04 \times 10^1$	-	1,82	$3,78 \times 10^1$	-	1,11	1,64
<i>pimelát</i>	$2,20 \times 10^3$	-	1,68	$4,39 \times 10^1$	-	1,81	$4,02 \times 10^1$	-	1,11	2,49
<i>fumarát</i>	$2,42 \times 10^3$	-	1,66	$1,55 \times 10^1$	-	1,36	$7,33 \times 10^1$	-	1,23	2,22
<i>maleát</i>	$1,45 \times 10^3$	-	1,68	$1,60 \times 10^1$	-	1,51	$4,60 \times 10^1$	-	1,16	-
<i>tartarát</i>	$1,16 \times 10^3$	-	1,69	$7,08 \times 10^3$	-	3,81	$3,79 \times 10^1$	-	1,11	2,14
<i>citrát</i>	$8,57 \times 10^6$	-	3,24	$2,57 \times 10^4$	-	3,92	$2,53 \times 10^2$	-	1,47	-
<i>TFA</i>	$1,59 \times 10^1$	-	0,46	1,81	-	0,36	$1,91 \times 10^2$	-	1,25	17,27
<i>BCA</i>	$2,22 \times 10^1$	-	0,49	2,22	-	0,34	$4,88 \times 10^2$	-	1,37	42,09
<i>benzoát</i>	$4,63 \times 10^1$	-	0,55	3,98	-	0,34	$2,0 \times 10^2$	-	1,13	20,59
<i>ftalát</i>	$2,45 \times 10^3$	-	1,58	$1,81 \times 10^1$	-	1,36	$3,72 \times 10^1$	-	1,10	0,81
<i>szalicilát</i>	-	-	-	$6,91 \times 10^3$	$1,74 \times 10^1$	1,43	$2,85 \times 10^3$	$1,07 \times 10^1$	1,34	0,99
K_M	$2,91 \times 10^4$			$6,68 \times 10^2$			2,06			
K_{M-OH}	$5,13 \times 10^2$			$3,12 \times 10^1$			$4,82 \times 10^2$			

A számított ioncsere-egyensúlyi állandók önmagukban nem, de azok látszólagos töltéssel súlyozott értékei ($K_{M-A}^{(1/x')}$) jól követik a vizsgált komponensek retenciójának sorrendjét. Előbbi az egyes ioncsoportokat külön illetve a teljes komponens sorozatot együtt vizsgálva egyaránt teljesül. Az azonos értékűséggel rendelkező komponensek ioncsere-egyensúlyi állandóinak nagyságrendje jellemzően megegyezik, KOH mozgófázis esetében alifás és aromás dikarbonsavakra 10^3 , egyértékű szerves anionokra 10^2 , halogénezett és aromás monokarbonsavakra 10^1 , míg alifás monokarbonsavakra < 10 az említett állandók nagyságrendje.

3.4.2. Komponensek kriptand állófázison való megkötődésének termodinamikai jellemzése

Kutatómunkám során különböző egyértékű szerves anionok, alifás, aromás és halogénezett monokarboxilátok esetén vizsgáltam a hőmérséklet retencióra gyakorolt hatását kriptand típusú anioncserélő állófázison. A méréseket 10 mM koncentrációjú KOH mozgófázis és 2-2 párhuzamos injektálás alkalmazása mellett, 20–38 °C hőmérséklet-tartományban ($\Delta T = 2\text{ °C}$) végeztem. Az egyes komponensek retenciós tényezőjének hőmérséklet függvényében tapasztalt alakulását a 3.4.6. ábrán ismertetem.



3.4.6. ábra. Egyértékű szerves, aromás és halogénezett (a), valamint monokarbonsav anionok (b) van't Hoff diagramjai kriptand állófázison.

3.7. táblázat. Kriptand típusú állófázison történő retenció termodinamikai paramétereit egyértékű anionok esetén ($T = 35\text{ °C}$).

Komponens	$\ln k$	ΔH [kJ mol ⁻¹]	ΔS [kJ mol ⁻¹ K ⁻¹]	ΔG [kJ mol ⁻¹]
acetát	-0,86	-11,20	-0,05	3,68
laktát	-0,84	-8,65	-0,04	3,63
formiát	-0,82	-12,58	-0,05	3,58
propionát	-0,59	-7,42	-0,03	3,01
piruvát	-0,41	-10,26	-0,04	2,55
klorid	-0,42	-11,29	-0,04	2,57
nitrát	0,80	-18,80	-0,06	-0,56
TFA	1,69	-13,69	-0,04	-2,83
BCA	1,78	-15,99	-0,04	-3,07
benzoát	2,31	-23,57	-0,06	-4,43

Kriptand állófázison végzett kísérleteim során a hőmérséklet emelésével az általam vizsgált komponensek retenciója jellemzően csökkent. Előbbi elsősorban a komplexképződési egyensúly eltolódásával, az ioncserekapacitás csökkenésével magyarázható [93]. Szerves anionok (Cl^- , NO_3^-) ionok, valamint aromás (benzoát) karbonsav anion esetén közel lineá-

ris, míg alifás (formiát, acetát, laktát, propionát, piruvát) és halogénezett (TFA, BCA) monokarboxilátok esetén a lineáristól kismértékben eltérő változást figyeltem meg. A mérési adatokból a (1.32) egyenlet felhasználásával, iterációs úton meghatároztam az egyes komponensek kriptand állófázison történő retencióját jellemző moláris entalpia (ΔH), entrópia (ΔS) és szabadentalpia (ΔG) értékeket, melyeket a 3.7. táblázatban tüntettem fel. Az entrópiaváltozás retenciós folyamathoz való hozzájárulása az összes vizsgált anion esetében elhanyagolható ($\Delta S = -0,03-0,06$) volt. Az entalpiaváltozás értékek $\text{Cl}^- - \text{NO}_3^-$ illetve TFA–BCA-benzoát ioncsoportok esetében korreláltak a retenciós tényező értékekkel, alifás monokarboxilátok esetében azonban ilyen kapcsolatot nem tapasztaltam. A moláris entalpia és entrópia értékekből számított moláris szabadentalpia ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) adatok egyértelműen követték a retenciós tényező értékek alakulását. A termodinamika alapelveinek megfelelően legmagasabb retencióval a legalacsonyabb moláris szabadentalpiaváltozással jellemezhető komponens (benzoát) rendelkezett.

Kutatásaimat homológ sorok vizsgálatára is kiterjesztettem. Számításaim során a retenciós tényező hőmérsékletfüggő változásának a szénlánc hosszával való kapcsolatát [6] alapján, egy a komponensek töltését is figyelembe vevő összefüggést vezettem le.

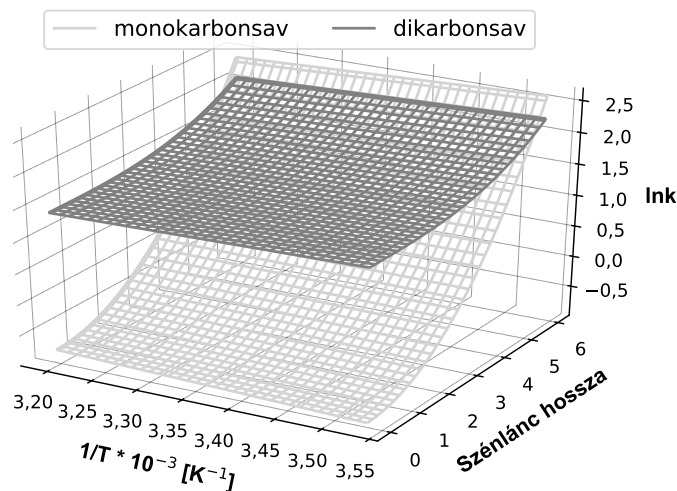
$$\ln k = - \left[\frac{\Delta G_0}{RT} + \frac{\Delta^*G}{RT} n_i^{(x+1)} \right] + \ln F \quad (3.27)$$

ahol ΔG_0 a homológ sor első tagjának moláris szabadentalpia változása, Δ^*G a homológ sorra jellemző, a szénlánc hosszának egy szénatommal való növekedésekor bekövetkező szabadentalpia változás, n_i a szénatomszám, x pedig a homológ sor tagjainak töltése. A (3.27) összefüggés mérési adatokra történő illesztésével meghatároztam a vizsgált homológ sorokra jellemző ΔG_0 és Δ^*G értékeket (3.8. táblázat).

3.8. táblázat. Mono- és dikarboxilát homológ sorokra meghatározott szabadentalpiaváltozás értékek.

	ΔG_0 [kJ mol ⁻¹]	Δ^*G [kJ mol ⁻¹]
monokarboxilátok	3,53	-0,23
dikarboxilátok	-2,22	-0,01

A fenti táblázatban ismertetett szabadentalpia változás értékeket és a 3.27 egyenletet alkalmazva kiszámítottam az egyes homológ sorok retenciós felületeinek alakulását a szénatomszám illetve hőmérséklet változás együttes hatásának függvényében.



3.4.7. ábra. Homológ sorok retenciós felületei a hőmérséklet és a szénlánc hosszának változása függvényében.

Mono- (formiát, acetát, propionát, benzoát) és dikarbonsavak (oxalát, malonát, szukcinát, adipát, pimelát, ftalát) 3.4.7. ábrán bemutatott retenciós felületeinek vizsgálata során úgy találtam, hogy a szénatomszám növekedésével monokarboxilátok esetén a retenciós tényező növekedése nagyobb mértékű, mint dikarbonsav anionok esetében. A szénatomszám változása a retenciós tényező értékek hőmérséklettől függő alakulására vonatkozóan elhanyagolható volt.

3.4.3. Koncentráció- és kapacitásgradiensek kriptand típusú állófázison való alkalmazása

3.4.3.1. Koncentrációgradiens kriptand típusú állófázison való alkalmazása

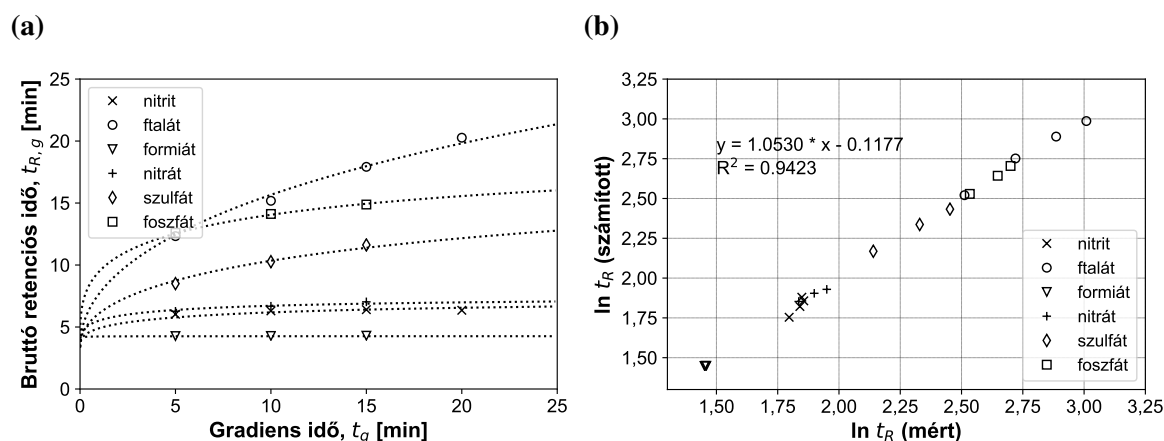
A koncentrációgradiens programok alkalmazása az anioncsere-kromatográfiás gyakorlatban széles körben elterjedt. A komponensek gradiens elúció esetén várható retenciójának előrejelzésére több modell is rendelkezésre áll, melyek közül a legismertebbeket korábban a 1.3.2.6. fejezetben ismertettem. Ezen modellek lineáris $\ln k - \ln c$ kapcsolat esetén használhatóak, így az általam vizsgált kriptand rendszerre jelen formájukban nem alkalmazhatóak. Előbbieket figyelembe véve szükségesnek láttam egy olyan gradiens modell kidolgozását, mely makrociklus alapú anioncsere elválasztás esetén is lehetővé teszi a komponensek várható retenciójának becslését gradiens körülmények között.

Munkám során egy a kutatócsoportunk által korábban kidolgozott gradiens retenciós modellt [94] használtam fel. Előbbi, az irodalomban található egyéb modellekkel ellentétben a komponensek gradiens késési idő alatt, a kezdeti izokratikus körülmények között történő vándorlást is figyelembe veszi. Bár a gradiens késési idő hatása az injektálási és gradiens indítási idők megfelelő programozásával kiküszöbölhető, annak tudatos kihasználása jelentősen javíthatja a kisretenciójú komponensek mátrixionoktól (pl: lúgos elúciónál a

savas mintaközeg) való elválasztását. A modell – a részletes levezetéstől eltekintve – az alábbi formában adható meg. A gradiens késés hatásának figyelembevételére az egyenlet jobb oldalának első tagja szolgál.

$$t_{R,g} = t_d \left(\frac{1 + k_{0,g}}{k_{0,g}} \right) + t_0 - \frac{c_0}{R_g} + \left[\left(\frac{c_0}{R_g} \right)^{(1+b_g)} + \frac{(1 + b_g) k_{0,g} c_0 t_0}{R_g^{b_g}} \right]^{\left(\frac{1}{1+b_g} \right)} \quad (3.28)$$

ahol t_0 és t_d a holtidő illetve a gradiens késési idő, c_0 a kezdeti mozgófázis koncentráció, R_g a gradiens meredekség ($R_g = \Delta c/t_g$), b_g a töltésviszonyoktól függő gradiens faktor ($b_g = x/(x + y)$), $k_{0,g}$ pedig a retenciós tényező kezdeti értéke. Munkám során b_g paramétereket kísérleti adatokból illesztéssel (3.9. táblázat), míg a retenciós tényező kezdeti $k_{0,g}$ értékét a bővített kriptand modellt felhasználva határoztam meg. Számított eredményeimet mérési adatokkal összevetve az alábbi ábrákon szemléltetem.



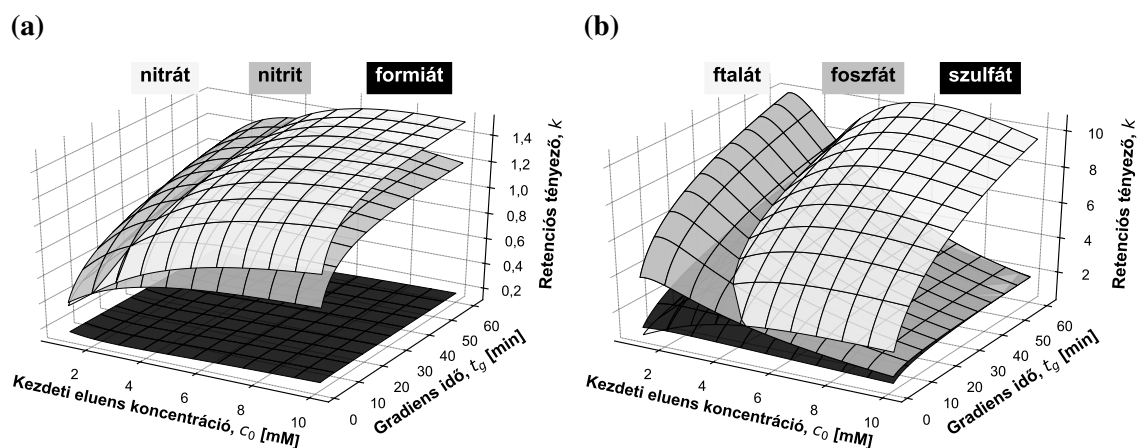
3.4.8. ábra. Különböző szerkezetű anionok retenciójának alakulása (a) gradiens körülmények között KOH mozgófázis esetén, valamint a mért és számított retenciós idők közötti korreláció (b).

3.9. táblázat. Gradiens retenciós idő számításához szükséges b_g paraméter elméleti és számított adatokból iterációval meghatározott értéke a különböző komponensek esetén.

Komponens	$b_{\text{elméleti}}$	$b_{\text{iterált}}$
nitrit	0,50	0,544
nitrát	0,50	0,410
szulfát	0,67	0,653
foszfát	0,75	0,304
formiát	0,50	0,226
ftalát	0,67	0,818

A méréseket nitrit és ftalát anionok esetében 2-15 mM, míg formiát, nitrát, szulfát és foszfát ionok elúciója során 5-25 mM koncentráció tartományokban végeztem. A számított eredmények megfelelő egyezést mutattak a mért adatokkal így a modellt alkalmasnak

találtam a különböző szerkezetű komponensek kriptand állófázison, gradiens körülmények között várható retenciós idejének meghatározására. A bővített kriptand és gradiens modelleket együttesen alkalmazva a mozgófázis kezdeti koncentrációjának és a gradiens meredekségének hatása a retenciós tényezőre együttesen is vizsgálható, melyre az alábbi ábrákon adok példát ($c_{\max} = 50$ mM).

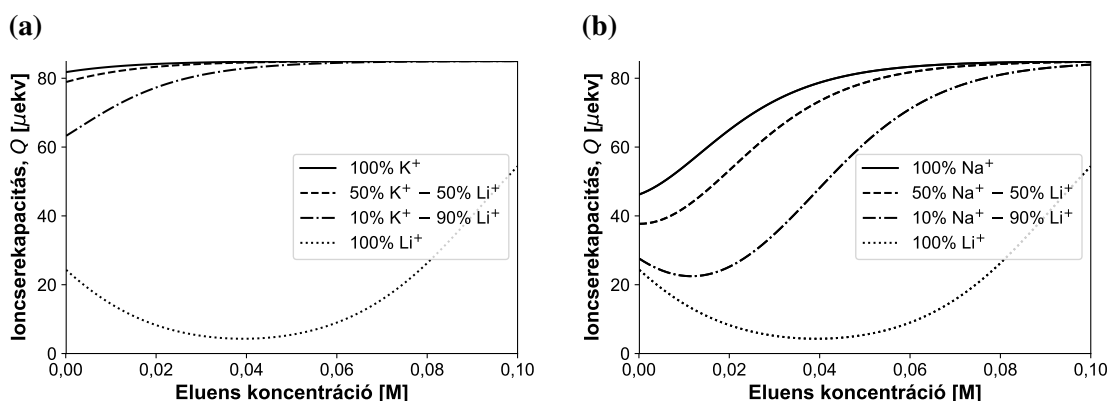


3.4.9. ábra. Egy- (a) illetve többértékű (b) anionok számított retenciós felületeinek alakulása a gradiens idő és a kezdeti eluenskonzentráció függvényében KOH mozgófázis esetén.

A bővített kriptand és gradiens modellek együttes alkalmazásával előrejelezhető az egyes komponensek kriptand állófázison, adott alkáli-hidroxid mozgófázis koncentrációjának különböző meredekségű változtatása esetén várható retenciója. Előbbi lehetőséget ad az optimális gradiens elválasztási körülmények előzetes meghatározására. A 3.4.9.a és 3.4.9.b ábrák alapján formiát, NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} és ftalát megfelelő felbontású, szimultán elválasztására alkalmas lehet egy KOH: 5 \rightarrow 50 mM / 30 min lineáris koncentrációgradiens program.

3.4.3.2. Kapacitásgradiens kriptand típusú állófázison való alkalmazása

Makrociklus alapú anioncserélő állófázis esetén a mozgófázis fémionjának megválasztásától függően az oszlop szelektivitása eltérő. A fémion minőségének az elválasztás alatt történő változtatásával kapacitásgradiens elúció érhető el. Kapacitásgradiens elválasztás során a mozgófázis ionerőssége, tehát annak hajtóereje állandó, azonban a fémionösszetétel változása révén változik az oszlop ioncserekapacitása. Előbbi az aktív anioncserélő helyek, azaz a protonált és komplexált kriptand specicszek arányának megváltozásával magyarázható.



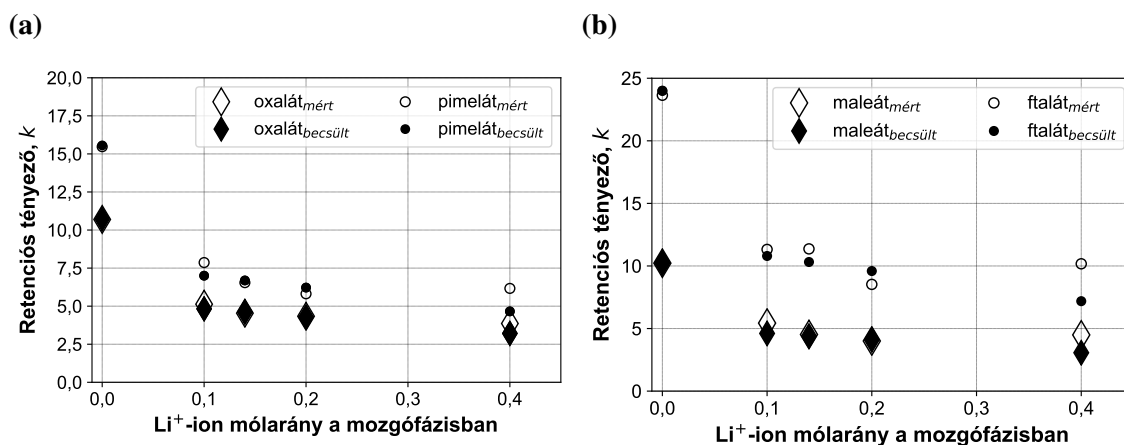
3.4.10. ábra. Kriptand állófázis ioncserekapacitásának alakulása a mozgófázis koncentrációjának függvényében eltérő kálium-lítium (a) és nátrium-lítium (b) fémion-arányok esetén vizes közegben.

A 3.4.10.a és 3.4.10.b ábrákon különböző fémion összetételű alkáli-hidroxid eluensek esetén látható az általam vizsgált kriptand típusú oszlop (3.29) egyenlet szerint számított ioncserekapacitásának alakulása. „Kevert” eluensmód esetén a komponensek retenciós tényezője az eltérő fémionnal (M_1 ill. M_2) komplexált kriptand funkciós csoportok mól-arányának ismeretében, az alábbi összefüggések felhasználásával becsülhető.

$$Q = (Cry) + (CryH^+) + (CryH_x - A) + (CryH - OH) + (CryM_1^+) + (CryM_{1,x} - A) + (CryM_1 - OH) + (CryM_2^+) + (CryM_{2,x} - A) + (CryM_2 - OH) \quad (3.29)$$

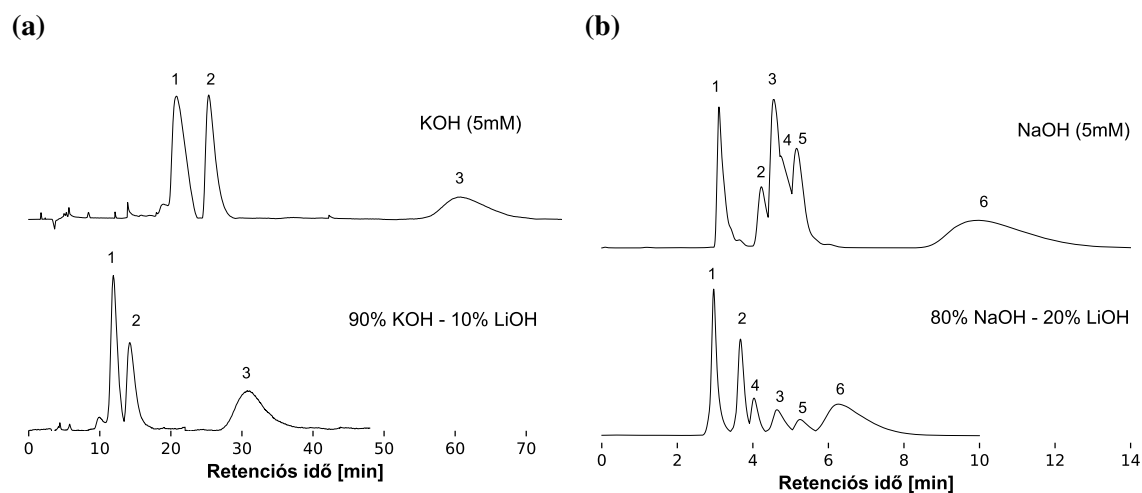
$$D_A = \frac{(A)}{[A]} = \frac{(CryH_x - A) + (CryM_{1,x} - A) + (CryM_{2,x} - A)}{[A^{x-}]} \quad (3.30)$$

A különböző fémion összetételű alkáli-hidroxid mozgófázisok esetén mért, illetve a (3.29) és (3.30) összefüggésekkel módosított bővített kriptand modell segítségével számított retenciós tényező értékek egyezőségére a 3.4.11.a és 3.4.11.b ábrákon adok példát.



3.4.11. ábra. Különböző karbonsav anionok mért és számított retenciós tényezője kálium-lítium fémion párt tartalmazó mozgófázis esetén a Li^+ -ion mólaránya függvényében.

Kriptand állófázis esetében a kettős fémiontartalmú mozgófázisok alkalmazása a nagy retenciójú komponensek visszatartásának csökkentése mellett a kromatográfiás csúcsalakok javítását is lehetővé teszi, melyre a 3.4.12. ábrán látható kromatogramok adnak példát.



3.4.12. ábra. Kriptand állófázison, eltérő fémion összetételű mozgófázisok esetén mért kromatogramok.

(a): 1–TFA, 2–BCA, 3–ftalát

(b): 1–laktát, 2–oxalát, 3–TFA, 4–fumarát, 5–BCA, 6–citrát

A megfelelő retenciósi modelleket felhasználva a mozgófázis koncentrációjának és fémionösszetételének együttes hatása szintén vizsgálható, mely az optimális kapacitásgradiens körülmények kiválasztásában nyújt segítséget.

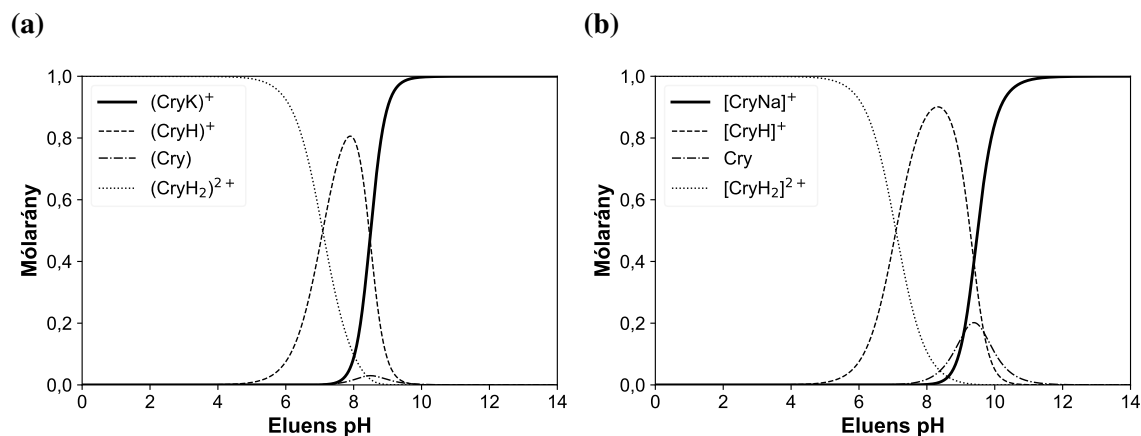
3.4.4. Szerves oldószer, mint ioncsere-kromatográfiás eluensmódosító használata kriptand típusú állófázis esetén

A szerves oldószerek a minták oldhatóságának javítása és az oszloptöltetek tisztítása mellett az elválasztás szelektivitásának megváltoztatására és ezáltal módszerfejlesztésre is alkalmazhatóak.

Előbbiek ismeretében vizsgáltam a MeOH, mint szerves eluensmódosító kriptand alapú állófázison történő elválasztásra gyakorolt hatását. Az n-decil-2.2.2 kriptand molekula megfelelő komplexstabilitási állandóit (Függelék: 6. táblázat) felhasználva a korábbiakhoz hasonlóan metanol tartalmú mozgófázis esetére is meghatároztam a ligandum specíeszek móltörteloszlását (3.4.13. ábra). A móltörteloszlás görbék számításához szükséges protonálódási és komplexképződési állandókat a megjelölt térfogatarányra vonatkozóan interpolálással becsültem.

A 3.4.1.b és 3.4.13.b ábrákat összehasonlítva megállapítható, hogy NaOH mozgófázis-hoz 4 v/v %-ban metanolt adva a fémionnal komplexált kriptand specíesz mólaránya a korábbi pH > 12 helyett már pH ≈ 11 (elúciós tartomány) esetén eléri az 1-et. Előbbinek

köszönhetően a funkciós csoportok közel 100%-ban komplexált formában vannak jelen, így az oszlop ioncserekapacitása maximális.



3.4.13. ábra. Az állófázison lévő kriptand molekulák komplexált, protonált, valamint szabad formáinak molaránya KOH (a) és NaOH (b) mozgófázisok esetén 96:4 térfogatarányú víz:metanol elegyben.

A karbonsav anionok retenciós viselkedését 15-15 mM KOH és NaOH mozgófázisok esetén 4,25%, 8,5% és 12,75% metanol tartalom mellett vizsgáltam. Az alkalmazott elúciós körülmények között a komponensek disszociációs egyensúlyának eltolódásának retencióra gyakorolt hatása elhanyagolható. Kálium-hidroxid mozgófázis mellett a metanol tartalom növelése minden karboxilátra vonatkozóan a retenció csökkenését eredményezte, míg nátrium-hidroxid esetében, benzoát és szalicilát kivételével növekedés volt tapasztalható. Előbbiek alapvetően a komplexképződési egyensúlyi állandók változásával magyarázhatóak. Míg KOH eluens alkalmazása esetén az állófázis ioncserekapacitása eleve maximális, addig Na-kriptand komplexképződési állandójának MeOH hozzáadásával való növelése révén növekszik az állófázis ioncserekapacitása.

Az egyes karboxilátok retenciós tényezőjének az eluens szerves oldószertartalmának függvényében való változását [6] szerint az alábbi lineáris összefüggéssel írtam le.

$$\lg k' = \lg k'_0 - S' \Phi' \quad (3.31)$$

ahol k'_0 a szerves oldószer mentes alkáli-hidroxid mozgófázis esetén mérhető retenciós tényező, Φ' a szerves oldószer térfogataránya, S' pedig az adott komponens visszatartásának metanol tartalom függvényében való változását jellemző paraméter. Mérési eredményeimet, valamint a (3.31) összefüggést felhasználva meghatároztam az egyes karbonsav anionokhoz tartozó S' paramétereket, melyek értékét a 3.10. táblázatban tüntettem fel.

3.4. ÁLLÓFÁZISBELI KOMPLEXKÉPZŐDÉSEN ALAPULÓ
ANIONCSERE-KROMATOGRÁFIÁS KARBONSAV ELVÁLASZTÁSOK
KRIPTAND-FUNKCIONALIZÁLT TÖLTETÉKEN

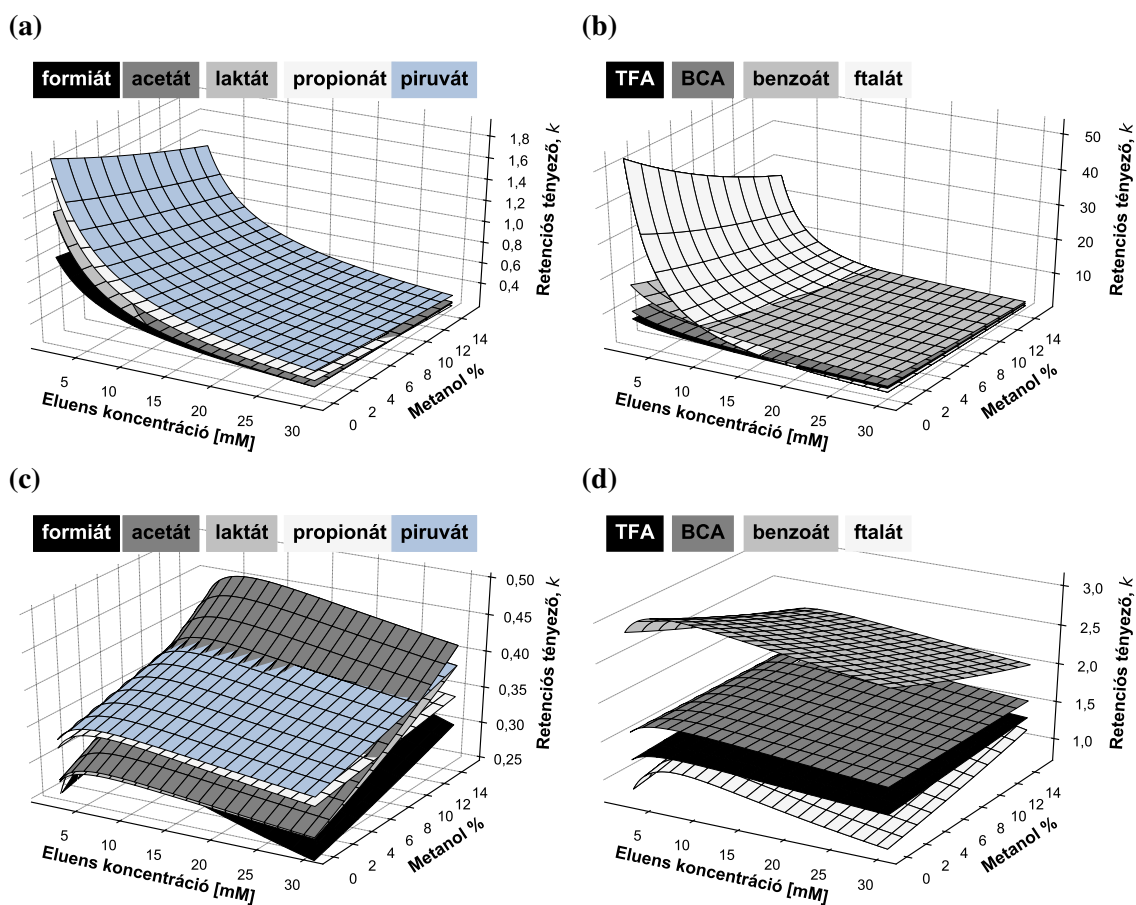
3.10. táblázat. A retenció tényező változását, az alkáli-hidroxid mozgófázis metanol tartalmának függvényében leíró S' paraméter alkáli-hidroxid mozgófázisok esetén.

Komponens	KOH			NaOH		
	k_0'	S'	R^2	k_0'	S'	R^2
<i>formiát</i>	0,463	(-1,44)	-	0,206	1,66	0,9906
<i>acetát</i>	0,420	-1,23	0,9644	0,156	2,91	0,9692
<i>laktát</i>	0,420	(-1,47)	-	0,174	2,49	0,9853
<i>propionát</i>	0,585	(-3,58)	-	0,261	0,64	0,9978
<i>piruvát</i>	0,714	(-2,45)	-	0,279	1,16	0,9616
<i>oxalát</i>	2,859	-2,84	0,9833	0,668	3,29	0,9815
<i>malonát</i>	2,897	-2,70	0,9636	0,667	3,25	0,9899
<i>szukcinát</i>	3,229	-2,18	0,981	0,713	3,17	0,9709
<i>adipát</i>	3,845	-2,84	0,9992	0,814	3,10	0,9958
<i>pimelát</i>	4,913	-3,51	0,9996	0,947	2,42	0,9574
<i>fumarát</i>	6,257	-2,99	0,8461	1,118	3,15	0,9615
<i>maleát</i>	3,128	-2,33	0,8101	0,678	2,83	0,9294
<i>tartarát</i>	3,262	-2,09	0,7922	0,675	3,48	0,9789
<i>citrát</i>	25,733	-5,27	0,975	2,590	4,25	0,9743
<i>TFA</i>	5,570	-4,50	0,9674	1,403	0,63	0,8
<i>BCA</i>	6,862	-4,96	0,9636	1,920	(-0,05)	-
<i>benzoát</i>	11,724	-6,35	0,9904	3,942	-2,14	0,9631
<i>fiálát</i>	7,755	-4,65	0,9481	1,327	2,83	0,9963
<i>szalicilát</i>	73,477	(-8,01)	-	34,277	-3,07	0,96

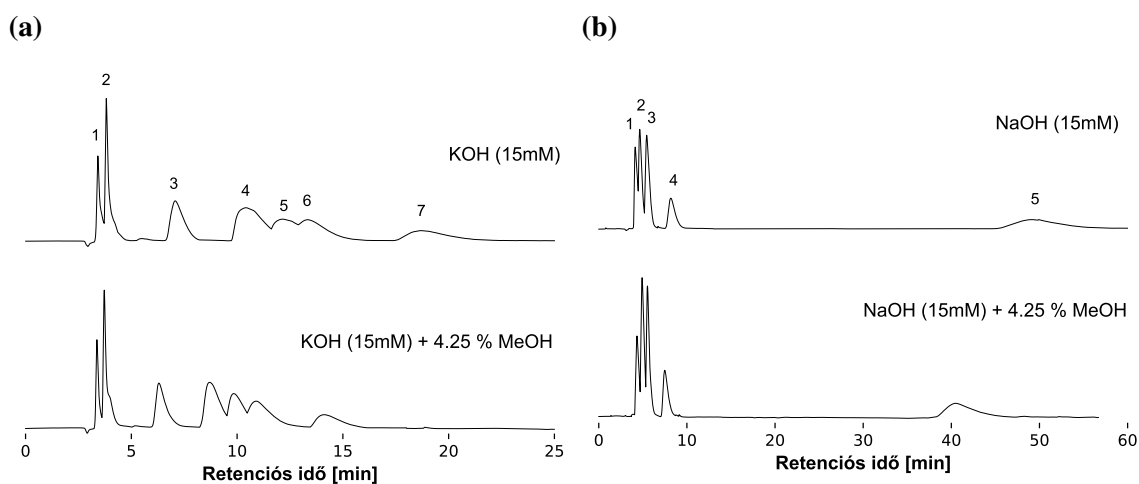
A 3.6. táblázatban szereplő komplexképződési és ioncsere-egyensúlyi, valamint a 3.10. táblázatban feltüntetett S' paraméterek ismeretében a (3.31) egyenletben szereplő k_0' tagot a bővített kriptand modell alapján számítva meghatároztam az egyes komponensek retenció felületeinek mozgófázis koncentráció és metanol tartalom függvényében várható alakulását (3.4.14. ábra). Az eredmények alapján a metanol, mint szerves eluensmódosító alkalmazása egy további optimalizálási lehetőség a koncentráció illetve kapacitás gradiens módszerek mellett makrociklus alapú állófázisok esetén.

Metanol tartalmú mozgófázissal végzett elúció során a retenció tényezők és ezáltal a selektivitás változtatása mellett az elválasztás felbontása is javítható. Kísérleti munkám során azt tapasztaltam, hogy n-decil-2.2.2 kriptand típusú állófázis esetén az alkáli-hidroxid mozgófázishoz 4-5 v/v %-ban metanolt adva kedvező változás érhető el a vizsgált karbonsav anionok kromatográfiás csúcsalakjai tekintetében (3.4.15. ábra).

3.4. ÁLLÓFÁZISBELI KOMPLEXKÉPZŐDÉSEN ALAPULÓ ANIONCSERE-KROMATOGRÁFIÁS KARBONSAV ELVÁLASZTÁSOK KRIPTAND-FUNKCIONALIZÁLT TÖLTETEKEN



3.4.14. ábra. Monovalens, valamint halogénezett és aromás karbonsav anionokra számított retenciós felületek az eluens metanol tartalmának és koncentrációjának változása függvényében KOH (a,b) és NaOH (c,d) mozgófázisok esetén.



3.4.15. ábra. A mozgófázis metanol tartalmának elúciós csúcsalakokra gyakorolt hatása KOH (a) és NaOH (b) eluensek esetén.

(a): 1–acetát, 2–piruvát, 3–maleinát, 4–TFA, 5–BCA, 6–benzoát, 7–ftalát
 (b): 1–pimelát, 2–BCA, 3–benzoát, 4–ftalát, 5–szalicilát

4. Összefoglalás

A folyadékkromatográfiai készülékek teljesítményének, érzékenységének és az elválasztási módszerek hatékonyságának, szelektivitásának növelése folyamatos munkát ad a szakemberek számára. A felmerülő analitikai feladatok hatékony megoldása, különösen komplex minták esetében a kromatográfiai rendszer és az elválasztandó komponensek, továbbá a mátrixalkotók részletes ismeretét igényli. Ezen ismeretek megszerzése gyakorlati és elméleti alap kutatások révén lehetséges. Doktori kutatómunkám alapvető célja az említett alap kutatások eredményeinek bővítése, folyadékkromatográfiai gyakorlatban is használható információk megszerzése volt.

Támaszkodva a folyadékkromatográfia és az ionkromatográfia általánosan elfogadott elméleteire, felhasználva az elválasztástechnika alapösszefüggéseit, célom volt a folyadékkromatográfiai kolonnák tulajdonságainak, különös tekintettel azok szemcseméret eloszlásának (PSD), valamint nyomásesésének elválasztási hatékonyságra gyakorolt hatásának részletes megismerése, továbbá komplexképződési egyensúlyi folyamatok ioncsere-kromatográfiai jelentőségének, alkalmazhatóságának vizsgálata.

A PSD elválasztási hatékonyságra gyakorolt hatásával számos tanulmány foglalkozik, azonban mivel az oszloptöltés minősége nehezen reprodukálható, a kísérleti adatok összehasonlítása nem ad egyértelmű, teljes mértékben megbízható eredményt. Előbbire tekintettel doktori munkám keretében olyan elméleti modellt dolgoztam ki, mely lehetőséget ad a PSD hatásának, oszloptöltés minőségétől független, gyors, készülék- és oldószerhasználat mentes vizsgálatára.

Az oszloptöltetek PSD szórásának elválasztási hatékonyságra gyakorolt hatását az általános sebességi modell segítségével vizsgáltam. Számításaim során a töltet szemcseméret eloszlását lognormális eloszlással jellemeztem. A szemcseméret eloszlás szórásának hatékonysági paraméterekre (tányérszám, felbontás, csúcskapacitás) gyakorolt hatását $5\ \mu\text{m}$ és $2,6\ \mu\text{m}$ átlagos szemcseátmérőjű, teljesen porózus illetve tömörmagvú töltetek, valamint különböző vizsgálandó molekulaméret tartományok esetében vizsgáltam.

Megállapítottam, hogy a tömörmagvú fázisok szűkebb PSD-vel jellemezhetőek, és a porózus töltetekhez képest, különösen a nagyméretű molekulák esetén hatékonyabb elválasztást tesznek lehetővé. A porózus töltetek tekintetében a PSD szórásának csökkentését, elsősorban a kisebb szemcseátmérőjű fázisok vonatkozásában megfontolandónak ta-

láltam, míg tömörmagvú fázisok esetén úgy tapasztaltam, hogy az alapvetően szűk PSD értékek csökkentésével nem érhető el további, számottevő hatékonyság növekedés.

A $< 2 \mu\text{m}$ szemcseátmérőjű kromatográfiás töltetek és az UHPLC rendszerek megjelenésével előtérbe került az oszlop nyomásesés elválasztásra gyakorolt hatásának vizsgálata. Több tanulmány is igazolta, hogy nagyméretű molekulák (peptidek, proteinek) esetében a nyomásváltozás észrevehetően befolyásolja az adott komponens retencióját. Előbbi háttérben a mozgófázis és ezzel együtt a komponens lineáris vándorlási sebességének, valamint moláris térfogatának megváltozása áll. Munkám során az oszlopbeli nyomásesés retencióra és elválasztási hatékonyságra gyakorolt hatását a Gibbs-féle szabadentalpia egyenlet és az egyensúlyi-diszperzív modell segítségével részleteiben vizsgáltam.

Magasabb nyomásesés és moláris térfogatváltozás esetén a retenció tényező és a vándorlási sebesség jelentősebb mértékű változását tapasztaltam. Megállapítottam, hogy nagyméretű molekulák UHPLC körülmények között történő elválasztása során a nyomásesés okozta sebesség gradiens retenció tényezőre gyakorolt hatása nem hagyható figyelmen kívül.

Az egyensúlyi-diszperzív modellt a Martin-Synge algoritmus alkalmazásával megoldva számítottam az oszlopbeli sávprofilokat, majd az elúciós csúcprofilokat. Utóbbiakból momentumanalízissel meghatároztam a várható retenció idő, csúc szélesség, csúcsaszimmetria és elérhető tányérszám értékeket. Megállapítottam, hogy a nyomásesés és moláris térfogatváltozás növekedése a sávok hosszirányú varianciájára, valamint a csúc szélesség, csúcsaszimmetria és tányérszám értékekre egyaránt kedvezőtlen hatást gyakorol. Számításokkal igazoltam, hogy a komponens sávok oszlopból való megnövekedett kielépési sebessége egyfajta sávkompressziós hatásként, különösen a magasabb Δp és ΔV_m tartományokban részben vagy teljes mértékben kompenzálhatja az oszlopbeli sáv szélesedést.

A Gd(III) és Gd(III) specieszek analitikája az 1980-as évektől kezdődően egyre nagyobb figyelmet kapott. A különböző Gd-kelátok MRI kontrasztanyagként való felhasználása a szennyvíztisztítási technológiák alacsony eltávolítási határfoka következtében jelentős környezeti terhelést jelent. A vízkezelés során komplexből felszabaduló Gd(III) erősen toxikus, felszíni vizekben és potenciálisan ivóvizekben való megjelenése komoly kockázatot jelent. A Gd(III) és specieszeinek vizsgálata jellemzően csatolt analitikai módszerekkel történik, mely technikák műszer és szerves oldószer igénye magas. Az ionkromatográfiás módszerek jelentősen egyszerűbb készülékigényűek és szerves oldószer felhasználását sem igénylik, mindemellett lehetőséget adnak az egyes Gd(III) specieszek mellett szervetlen és szerves mátrixonok szimultán minőségi és mennyiségi meghatározására, akár magas sótartalmú minták esetében is. Előbbiek ismeretében kutatómunkát végeztem különböző poliamino-karboxilát ligandumok Gd^{3+} fémionnal alkotott kelát komplexeinek anioncsere-kromatográfiás elválasztására vonatkozóan.

Protonálódási és komplexképződési egyensúlyi állandók felhasználásával meghatároztam az egyes ligandumok (EDTA, DCTA, DTPA) és a Gd-kelát komplex specieszek pH és koncentrációviszonyok függvényében jellemző móltörteloszlását. Lehetséges mátrixkomponensek közül PO_4^{3-} ion esetében úgy találtam, hogy annak magas mintaoldatbeli koncentrációja befolyásolhatja a kelát komplexek kialakulását.

Az anioncsere-kromatográfiai módszert, lúgos elúció ($\text{pH} > 10$) mellett alkalmasnak találtam Gd-EDTA, Gd-DCTA és Gd-DTPA kelátok meghatározására. Standard mintaoldatot injektálva a kromatográfiai csúcsokból frakciógyűjtést követően igazoltam, hogy az elválasztott csúcsok valóban Gd-DTPA és Gd-EDTA komplexekhez tartoznak. Analitikai mérőgörbe felvételét követően meghatároztam a módszer Gd-DTPA komplexre vonatkozó kimutatási határkoncentrációját ($\text{LOD} = 0,2 \mu\text{g/L}$ ($0,37 \text{ nM}$)).

Cl^- , NO_3^- , Gd-DTPA, PO_4^{3-} , SO_4^{2-} és Gd-EDTA anionokra retenciós adatbázist rögzítettem. Elméleti modell vezettem le a komponensek retenciójának mozgófázis pH és ionerősség függvényében való leírására. A modellt mérési adatokra illesztve meghatároztam az egyes anioncsere-egyensúlyi és intereluens állandók értékeit. Az illesztett paraméterek és a modell felhasználásával kiszámítottam a komponensek retenciós, valamint felbontás felületeit. Ezen felületeket együttesen értékelve megadtam a vizsgálni kívánt komponensek szelektív elválasztását biztosító optimális elúciós körülményeket.

Erős kationcserélő SPE töltet és DTPA komplexképző ligandum alkalmazásán alapuló mintaelőkészítési eljárást dolgoztam ki, mely a mátrixalkotók hatékony eltávolítása mellett biztosítja nyomnyi mennyiségű Gd-kelát komplexek reprezentatív minőségi és mennyiségi meghatározását.

Egyszerű kémiai szerkezetük ellenére a különböző karbonsavak és származékaik számos területen (pl.: környezeti minták, élelmiszeripar, gyógyszeripar stb.) fontos szerepet játszanak, minőségi és mennyiségi meghatározásuk gyakori analitikai feladat. A fordított-fázisú folyadékkromatográfia mellett ionkromatográfiai technikák (ionkizárás, ioncsere) is lehetőséget adnak az említett komponensek meghatározására. Az ioncserekromatográfiában használt állófázisok között rendelkezésre állnak makrociklikus ligandummal funkcionalizált állófázisok is, melyek bár széles körben nem terjedtek el, több előnyös tulajdonsággal is rendelkeznek. Ezen töltetek esetében az elválasztást meghatározó kémiai folyamatok, különösen szerves analitok tekintetében teljes részletességgel nem ismertek, így doktori kutatómunkámat szerves és karboxilát anionok n-decil-2.2.2 kriptand ligandumokkal funkcionalizált makrociklus alapú ioncserélőn, alkáli-hidroxidos elúció mellett mutatott retenciós viselkedésének vizsgálatára is kiterjesztettem.

Megállapítottam, hogy az alkalmazott elúciós körülmények között a komplexált és szabad kriptand specieszek túlsúlya jellemző, az egyszerűen protonált forma megjelenésével csak Li^+ fémion esetén kell számolni, kétszeresen protonált ligandum jelenléte mindhárom alkáli fémion esetében elhanyagolható.

Mono- és multivalens, eltérő protonálódási hajlammal rendelkező komponensek kriptand állófázison való retenciójának mozgófázis ionerősség és fémion tartalom függvényében való alakulásának előrejelzésére retenciós modellt („bővített kriptand modell”) vezettem le. A számított eredmények kísérleti adatbázissal való összevetése mellett meghatároztam Cl^- , BrO_3^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} és PO_4^{3-} , valamint formiát, acetát, laktát, propionát, piruvát, oxalát, malonát, szukcinát, adipát, pimelát, fumarát, maleát, tartarát, citrát, TFA, BCA, benzoát, ftalát és szalicilát anionok esetén az elválasztást KOH, NaOH és LiOH mozgófázisok esetén befolyásoló egyensúlyi paramétereket, illetve a retenció és a kémiai szerkezet közötti alapvető összefüggéseket.

A hőmérséklet, kriptand állófázison való retencióra gyakorolt hatásának vizsgálata során egyértékű anionok esetében a van't Hoff összefüggés alapján meghatároztam a retenciót jellemző főbb termodinamikai paramétereket. Homológ sorok retenciójának hőmérséklet-függését vizsgálva mono- és dikarbonsavak esetére megadtam a szabadentalpia változás szénatomszám függvényében jellemző változásának mértékét.

Retenciós modelleket vezettem le a komponensek kriptand alapú koncentrációgradiens és kapacitásgradiens elúció esetén várható retenciójának előrejelzésére. Vizsgáltam továbbá szerves és karbonsav anionok retenciójának metanol tartalmú mozgófázis esetén való alakulását és megállapítottam, hogy alacsony v/v %-ban alkalmazott MeOH eluensmódosító a csúcsalakok javítása révén növelheti az elválasztás hatékonyságát.

Doktori munkám eredményei elméleti és gyakorlati területen egyaránt hasznosíthatóak. A szemcseméret eloszlás tekintetében végzett elméleti kutatásom a folyadékkromatográfiás oszloptöltetek fejlesztési irányainak kijelölésére vonatkozóan szolgáltat hasznos információt. A kolonnák nyomásesésének elválasztási hatékonyságra gyakorolt hatásával kapcsolatos eredményeim a HPLC - UHPLC módszertranszferek során adhatnak segítséget a retenciós viselkedés, elsősorban nagyméretű molekuláknál jelentkező változásának értelmezésében. Gd-kelátok anioncsere-kromatográfiás elválasztásával kapcsolatban született eredményeimmel igazoltam, hogy a csatolt technikák mellett az egyszerűbb műszer és kevésbé terhelő vegyszerigényű ionkromatográfia is alkalmas lehet a különböző Gd(III) specieszek minőségi és mennyiségi meghatározására, míg a kidolgozott retenciós modell mintamátrix-specifikus módszerek kidolgozásához nyújt segítséget. Kriptand alapú anioncserélő állófázison végzett kísérleti munkám hozzájárul szerves anionok és karboxilátok makrociklikus ioncserélőn történő elválasztása során lejátszódó egyensúlyi folyamatok részletesebb megismeréséhez. A kidolgozott retenciós modellek és meghatározott egyensúlyi paraméterek a megfelelő elúciós körülmények meghatározásában nyújtanak segítséget.

Irodalomjegyzék

- [1] S. Fekete, K. Horváth, and D. Guillarme, „Influence of pressure and temperature on molar volume and retention properties of peptides in ultra-high pressure liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1311, pp. 65–71, 2013.
- [2] K. Kümmerer and E. Helmers, „Hospital effluents as a source of gadolinium in the aquatic environment,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 34(4), pp. 573–577, 2000.
- [3] M. Cyris, „Behavior of gadolinium-based diagnostics in water treatment,” Ph.D. dissertation, Institut für Instrumentelle Analytische Chemie der Universität Duisburg-Essen, 2013.
- [4] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, and J. W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2011.
- [5] S. C. Moldoveanu and V. David, *Essentials in Modern HPLC Separations*. Amsterdam: Elsevier, 2013.
- [6] J. Weiss, *Handbook of Ion Chromatography*, 4th ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2016.
- [7] J. P. Foley and J. G. Dorsey, „Equations for calculation of chromatographic figures of merit for ideal and skewed peaks,” *Anal. Chem.*, vol. 55(4), pp. 730–737, 1983.
- [8] A. J. P. Martin and R. L. M. Synge, „A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography 2. application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins,” *Biochem. J.*, vol. 35(12), pp. 1358–1368, 1941.
- [9] L. C. Craig, „Identification of small amounts of organic compounds by distribution studies ii. separation by counter-current distribution,” *J. Biol. Chem.*, vol. 155, pp. 519–534, 1944.
- [10] J. C. Giddings and H. Eyring, „A molecular dynamic theory of chromatography,” *J. Phys. Chem.*, vol. 59(5), pp. 416–421, 1955.
- [11] F. Dondi and M. Remelli, „The characteristic function method in the stochastic theory of chromatography,” *J. Phys. Chem.*, vol. 90(9), pp. 1885–1891, 1986.
- [12] F. Dondi, A. Cavazzini, M. Remelli, A. Felinger, and M. Martin, „Stochastic theory of size exclusion chromatography by the characteristic function approach,” *J. Chromatogr. A*, vol. 943(2), pp. 185–207, 2002.

- [13] A. Felinger, A. Cavazzini, M. Remelli, and D. F., „Stochastic–dispersive theory of chromatography,” *Anal. Chem.*, vol. 71(20), pp. 4472–4479, 1999.
- [14] A. Felinger, A. Cavazzini, and F. Dondi, „Equivalence of the microscopic and macroscopic models of chromatography: stochastic–dispersive versus lumped kinetic model,” *J. Chromatogr. A.*, vol. 1043(2), pp. 149–157, 2004.
- [15] G. Guiochon, A. Felinger, D. G. Shirazi, and A. M. Katti, *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 2006.
- [16] E. Wicke, „Empirische und theoretische untersuchungen der sorptionsgeschwindigkeit von gasen an porösen stoffen ii,” *Kolloid Z.*, vol. 86(3), pp. 295–313, 1939.
- [17] J. N. Wilson, „A theory of chromatography,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 62(6), pp. 1583–1591, 1940.
- [18] D. DeVault, „The theory of chromatography,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 65(4), pp. 532–540, 1943.
- [19] J. C. Giddings, *Dynamics of Chromatography*. New York: M. Dekker, 1965.
- [20] J. J. van Deemter, F. J. Zuiderweg, and A. Klinkenberg, „Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 5(6), pp. 271–289, 1956.
- [21] P. C. Haarhoff and V. der Linde H. J., „Concentration dependence of elution curves in non-ideal gas chromatography,” *Anal. Chem.*, vol. 38(4), pp. 573–582, 1966.
- [22] D. M. Ruthven, *Principles of Adsorption and Adsorption Processes*. New York: Wiley, 1984.
- [23] E. Kučera, „Contribution to the theory of chromatography: linear non-equilibrium elution chromatography,” *J. Chromatogr.*, vol. 19(2), pp. 237–248, 1965.
- [24] M. Kubin, „Beitrag zur theorie der chromatographie ii. einfluss der diffusion ausserhalb und der adsorption innerhalb des sorbens-korns,” *Collect. Czech. Chem. Commun.*, vol. 30(9), pp. 2900–2907, 1965.
- [25] K. Horváth, F. Gritti, J. N. Fairchild, and G. Guiochon, „On the optimization of the shell thickness of superficially porous particles,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, pp. 6373–6381, 2010.
- [26] A. Felinger, B. Boros, and R. Ohmacht, „Effect of pressure on retention factors in hplc using a non-porous stationary phase,” *Chromatographia*, vol. 56(1), pp. S61–S64, 2002.
- [27] M. Martin and G. Guiochon, „Effects of high pressure in liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1090(1-2), pp. 16–38, 2005.
- [28] M. C. Ringo and C. E. Evans, „Pressure-dependent retention and selectivity in reversed-phase liquid chromatographic separations using β -cyclodextrin stationary phases,” *Anal. Chem.*, vol. 69(4), pp. 643–649, 1997.

- [29] M. C. . Ringo and C. E. Evans, „Pressure-induced changes in chiral separations in liquid chromatography,” *Anal. Chem.*, vol. 69(24), pp. 4964–4971, 1997.
- [30] C. E. Evans and J. A. Davis, „Effect of pressure-induced ionization, partitioning, and complexation on solute retention in reversed-phase liquid chromatography,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 397(1-3), pp. 163–172, 1999.
- [31] V. L. McGuffin, C. E. Evans, S. H. Chen, V. V. Mozhaev, K. Heremans, J. Frank, P. Masson, and C. Balny, „Direct examination of separation processes in liquid chromatography: Effect of temperature and pressure on solute retention,” *J. Microcolumn. Sep.*, vol. 5, pp. 3–10, 1993.
- [32] V. L. McGuffin and S. H. Chen, „Molar enthalpy and molar volume of methylene and benzene homologues in reversed-phase liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 762(1-2), pp. 35–46, 1997.
- [33] V. L. . McGuffin and S. H. Chen, „Theoretical and experimental studies of the effect of pressure on solute retention in liquid chromatography,” *Anal. Chem.*, vol. 69(5), pp. 930–943, 1997.
- [34] M. M. Fallas, U. D. Neue, M. R. Hadley, and D. V. McCalley, „Investigation of the effect of pressure on retention of small molecules using reversed-phase ultra-high-pressure liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1209(1-2), pp. 195–205, 2008.
- [35] M. M. . Fallas, U. D. Neue, M. R. Hadley, and D. V. McCalley, „Further investigations of the effect of pressure on retention in ultra-high-pressure liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1217(3), pp. 276–284, 2010.
- [36] M. M. Fallas, M. R. Hadley, and D. V. McCalley, „Practical assessment of frictional heating effects and thermostat design on the performance of conventional (3 μm and 5 μm) columns in reversed-phase high-performance liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1216(18), pp. 3961–3969, 2009.
- [37] L. Novakova, J. L. Veuthey, and D. Guillarme, „Practical method transfer from high performance liquid chromatography to ultra-high performance liquid chromatography: The importance of frictional heating,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1218(44), pp. 7971–7981, 2011.
- [38] A. de Villiers, H. Lauer, R. Szucs, S. Goodall, and P. Sandra, „Influence of frictional heating on temperature gradients in ultra-high-pressure liquid chromatography on 2.1 mm i.d. columns,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1113(1-2), pp. 84–91, 2006.
- [39] S. Fekete, J. L. Veuthey, D. McCalley, and D. Guillarme, „The effect of pressure and mobile phase velocity on the retention properties of small analytes and large biomolecules in ultra-high pressure liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1270, pp. 127–138, 2012.
- [40] X. Liu, P. Szabelski, K. Kaczmarski, D. Zhou, and G. Guiochon, „Influence of pressure on the chromatographic behavior of insulin variants under nonlinear conditions,” *J. Chromatogr. A*, vol. 988(2), pp. 205–218, 2003.

- [41] J. E. Madden, M. J. Shaw, G. W. Dicoski, N. Avdalovic, and P. R. Haddad, „Simulation and optimization of retention in ion chromatography using virtual column 2 software,” *Anal. Chem.*, vol. 74(23), pp. 6023–6030, 2002.
- [42] D. T. Gjerde, G. Schmuckler, and J. S. Fritz, „Anion chromatography with low-conductivity eluents,” *J. Chromatogr. A*, vol. 187(1), pp. 35–45, 1980.
- [43] P. R. Haddad and C. E. Cowie, „Computer-assisted optimization of eluent concentration and pH in ion chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 303, pp. 321–330, 1984.
- [44] M. J. Van Os, J. Slanina, W. E. De Ligny, W. E. Hammers, and J. Agterdenbos, „Determination of traces of inorganic anions by means of high-performance liquid chromatography on zipaxsax columns,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 144, pp. 73–82, 1982.
- [45] P. R. Haddad and J. P. E., *Ion Chromatography - Principles and Applications*, 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 1990.
- [46] J. E. Madden and H. P. R., „Critical comparison of retention models for optimization of the separation of anions in ion chromatography i. non-suppressed anion chromatography using phthalate eluents and three different stationary phases,” *J. Chromatogr. A*, vol. 829, pp. 65–80, 1998.
- [47] T. B. Hoover, „Multiple eluent and pH effects on ion chromatography of phosphate and arsenate,” *Sep. Sci. Technol.*, vol. 17(2), pp. 295–305, 1982.
- [48] D. R. Jenke and G. K. Pagenkopf, „Optimization of anion separation by nonsuppressed ion chromatography,” *Anal. Chem.*, vol. 56(1), pp. 85–88, 1984.
- [49] G. K. Jenke, D. R. Pagenkopf, „Models for prediction of retention in nonsuppressed ion chromatography,” *Anal. Chem.*, vol. 56(1), pp. 88–91, 1984.
- [50] D. R. Jenke, „Modeling of analyte behavior in indirect photometric chromatography,” *Anal. Chem.*, vol. 56(14), pp. 2674–2681, 1984.
- [51] M. Maruo, N. Hirayama, and T. Kuwamoto, „Ion chromatographic elution behaviour and prediction of the retention of inorganic monovalent anions using a phosphate eluent,” *J. Chromatogr. A*, vol. 481, pp. 315–322, 1989.
- [52] P. Hajós, O. Horváth, and V. Denke, „Prediction of retention for halide anions and oxoanions in suppressed ion chromatography using multiple species eluent,” *Anal. Chem.*, vol. 67, pp. 434–441, 1995.
- [53] P. Hajós, G. Révész, O. Horváth, J. Ppear, and C. Sarzanini, „The simultaneous analysis of metal-edta complexes and inorganic anions by suppressed ion chromatography,” *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 34, pp. 291–299, 1996.
- [54] P. Hajós, O. Horváth, and G. Révész, „Chemical equilibria in ion chromatography: theory and application,” *Adv. Chromatogr.*, vol. 39, pp. 311–350, 1998.
- [55] C. Sarzanini, M. C. Bruzzoniti, and P. Hajós, „Effect of stationary phase hydrophobicity and mobile phase composition on the separation of carboxylic acids in ion chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 867(1-2), pp. 131–142, 2000.

- [56] P. Hajós, „Histidine as a dipolar eluent component in cation chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 789(1-2), pp. 141–148, 1997.
- [57] K. Horváth and P. Hajós, „Retention profiles and mechanism of anion separation on latex-based pellicular ion exchanger in ion chromatography,” *J. Chromatogr. A.*, vol. 1104(1-2), pp. 75–81, 2006.
- [58] M. C. Bruzzoniti, P. Hajós, and S. C. Horváth, K., „Ion chromatographic retention mechanism of inorganic anions on macrocycle based stationary phase,” *Acta Chim. Slov.*, vol. 54(1), pp. 14–19, 2007.
- [59] L. R. Snyder and J. W. Dolan, *High-Performance Gradient Elution: The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2007.
- [60] R. D. Rocklin, C. A. Pohl, and J. A. Schibler, „Gradient elution in ion chromatography,” *J. Chromatogr. A.*, vol. 411, pp. 107–119, 1987.
- [61] R. A. Shellie, B. K. Ng, G. W. Dicinoski, S. D. H. Poynter, J. W. O’Reilly, C. A. Pohl, and P. R. Haddad, „Prediction of analyte retention for ion chromatography separations performed using elution profiles comprising multiple isocratic and gradient steps,” *Anal. Chem.*, vol. 80, pp. 2474–2482, 2008.
- [62] P. Jandera and 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.*, vol. 91, pp. 223–235, 1974.
- [63] Y. Baba, N. Yoza, and S. Ohashi, „Computer-assisted prediction of retention times for inorganic polyphosphates in gradient ion-exchange chromatography,” *J. Chromatogr. A.*, vol. 350, pp. 461–467, 1985.
- [64] L. R. Snyder, J. W. Dolan, and J. R. Gant, „Gradient elution in high-performance liquid chromatography : I. theoretical basis for reversed-phase systems,” *J. Chromatogr.*, vol. 165(1), pp. 3–30, 1979.
- [65] L. J. Norman, S. Kotz, and N. Balakrishnan, *Continuous univariate distributions: Log-normal Distribution*, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1994.
- [66] R. Preti, „Core-shell columns in high-performance liquid chromatography: Food analysis applications,” *Int. J. Anal. Chem.*, vol. 2016, 2016, iD 3189724.
- [67] F. Gritti and G. Guiochon, „Mass transfer kinetics, band broadening and column efficiency,” *J. Chromatogr. A.*, vol. 1221, pp. 2–40, 2012.
- [68] J. DeStefano, T. Langlois, and J. Kirkland, „Characteristics of superficially-porous silica particles for fast hplc: some performance comparisons with sub-2 μm particles,” *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 46, pp. 254–260, 2008.
- [69] J. Cunliffe and T. Maloney, „Fused core particle technology as an alternative to sub-2 μm particles to achieve high separation efficiency with low backpressure,” *J. Sep. Sci.*, vol. 30, pp. 3104–3109, 2007.

- [70] J. J. DeStefano, S. A. Schuster, J. M. Lawhorn, and J. J. Kirkland, „Performance characteristics of new superficially porous particles,” *J. Chromatogr. A.*, vol. 1258, pp. 76–83, 2012.
- [71] L. E. Blue and J. W. Jorgenson, „1.1 μm superficially porous particles for liquid chromatography. part i: synthesis and particle structure characterization,” *J. Chromatogr. A.*, vol. 1218(44), pp. 7989–7995, 2011.
- [72] G. Guiochon and F. Gritti, „Theoretical investigation of diffusion along columns packed with fully and superficially porous particles,” *J. Chromatogr. A.*, vol. 1218(22), pp. 3476–3488, 2011.
- [73] J. J. van Deemter, F. J. Zuiderweg, and A. Klinkenberg, „Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 5(6), pp. 271–283, 1956.
- [74] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, and H. Zhang, „Core–shell particles: preparation, fundamentals and applications in high-performance liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A.*, vol. 1357, pp. 36–52, 2014.
- [75] S. A. Schuster, B. M. Wagner, B. E. Boyes, and J. J. Kirkland, „Wider pore superficially porous particles for peptide separations by HPLC,” *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 48(7), pp. 566–571, 2010.
- [76] S. Fekete, R. Berky, J. Fekete, J. L. Veuthey, and 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.*, vol. 1236, pp. 177–188, 2012.
- [77] B. M. Wagner, S. A. Schuster, B. E. Boyes, and J. J. Kirkland, „Superficially porous silica particles with wide pores for biomacromolecular separations,” *J. Chromatogr. A.*, vol. 1264, pp. 22–30, 2012.
- [78] S. Fekete, E. Oláh, and J. Fekete, „Fast liquid chromatography: the domination of core–shell and very fine particles,” *J. Chromatogr. A.*, vol. 1228, pp. 57–71, 2012.
- [79] F. Gritti, I. Leonardis, J. Abia, and G. Guiochon, „Physical properties and structure of fine core-shell particles used as packing materials for chromatography: relationships between particle characteristics and column performance,” *J. Chromatogr. A.*, vol. 1217(24), pp. 3819–3843, 2010.
- [80] P. Hajós and J. Inczédy, „Preparation and ion chromatographic application of surface-sulphonated cation exchangers,” *J. Chromatogr.*, vol. 201, pp. 253–257, 1980.
- [81] E. Blasius, K. P. Janzen, W. Adrian, and G. Klautke, „Darstellung und eigenschaften von austauschern auf basis von kronenverbindungen,” *J. Chromatogr. A*, vol. 96(1), pp. 89–97, 1974.
- [82] H. Krisztián, „Kémiai egyensúlyi és kinetikai kölcsönhatások leírása, alkalmazása az ioncsere-kromatográfiában,” Ph.D. dissertation, Anyagtudományok és -technológiák Doktori Iskola, 2007.

- [83] J. D. Lamb, R. G. Smith, R. C. Anderson, and M. K. Mortensen, „Anion separations on columns based on transition metal-macrocycle complex exchange sites,” *J. Chromatogr. A*, vol. 671(1-2), pp. 55–62, 1994.
- [84] A. Woodruff, C. Pohl, A. Bordunov, and N. Avdalovic, „Adjustable-capacity anion-exchange separator,” *J. Chromatogr. A*, vol. 956(1-2), pp. 35–41, 2002.
- [85] J. D. Lamb, R. G. Smith, and J. Jagodzinski, „Anion chromatography with a crown ether-based stationary phase and an organic modifier in the eluent,” *J. Chromatogr. A*, vol. 640(1-2), pp. 33–40, 1993.
- [86] S. Fanali, P. R. Haddad, C. F. Poole, P. Schoenmakers, and D. Lloyd, *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. Elsevier, 2013.
- [87] K. Horváth, D. Lukács, A. Sepsey, and A. Felinger, „Effect of particle size distribution on the separation efficiency in liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1361, pp. 203–208, 2014.
- [88] D. Lukács and K. Horváth, „Impact of size heterogeneity of core-shell packing materials on chromatographic separation of large biomolecules,” *Hung. J. Ind. Chem.*, vol. 42(1), pp. 27–31, 2014.
- [89] K. Horváth, S. Horváth, and D. Lukács, „Effect of axial temperature gradient on chromatographic efficiency under adiabatic conditions,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1483, pp. 80–85, 2017.
- [90] P. W. Lee, H. Aizawa, A. C. Barefoot, and J. J. Murphy, *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals*. John Wiley & Sons, Inc., 2003, vol. 1. [Online]. Available: <https://books.google.hu/books?id=SKvpAQAACAAJ>
- [91] L. Telgmann, M. Sperling, and U. Karst, „Determination of gadolinium-based mri contrast agents in biological and environmental samples: A review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 764, pp. 1–16, 2013.
- [92] P. Hajós, D. Lukács, E. Farsang, and K. Horváth, „High performance anion chromatography of gadolinium chelates,” *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 54(10), pp. 1752–1760, 2016.
- [93] J. D. Lamb and R. G. Smith, „A comparison of gradient capacity anion chromatography using macrocycles d-2.2.2 and d-2.2.1 in constant or variable temperature mode,” *Talanta*, vol. 39(8), pp. 923–930, 1992.
- [94] S. Beáta, „Nagyhatékonyságú ionkromatográfiai módszer fejlesztése fluorid- és kloridionok meghatározására salétromsavval feltárt mintákból,” Master’s thesis, Pannon Egyetem, 2018.
- [95] W. M. Haynes, *Handbook of Chemistry and Physics*, 95th ed. Boca Raton: CRC Press Taylor, & Francis Group, 2014.
- [96] R. G. Compton and H. G., *Applications of Kinetic Modelling*. Amsterdam: Elsevier, 1999, vol. 37.

- [97] K. Fan-xin, Y. Hong-wei, W. Xiao-mao, and X. Yuefeng F., „Rejection of nine haloacetic acids and coupled reverse draw solute permeation in forward osmosis,” *Desalination*, vol. 341, pp. 1–9, 2014.
- [98] C. L. Yaws, *Transport Properties of Chemicals and Hydrocarbons. Viscosity, Thermal Conductivity, and Diffusivity of C1 to C100 Organics and Ac to Zr Inorganics*, 1st ed. Norwich: William Andrew, 2009.
- [99] A. Ringbom, *Complexation in Analytical Chemistry*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1963.
- [100] J. Inczedy, *Komplex egyensúlyok analitikai alkalmazása*. Budapest: Műszaki Könyvkiadó, 1970.
- [101] A. S. Wood, „The aqueous geochemistry of the rare-earth elements: Critical stability constants for complexes with simple carboxylic acids at 25°C and 1 bar and their application to nuclear waste management*,” *Eng. Geol.*, vol. 34(3), pp. 229–259, 1993.
- [102] K. Spahiu and J. Bruno, „A selected thermodynamic database for ree to be used in hlnw performance assessment exercises,” MBT Tecnologia Ambiental, Cerdanyola, Spain, Tech. Rep., January 1995.
- [103] J. M. Lehn and J. P. Sauvage, „[2]-cryptates: Stability and selectivity of alkali and alkaline-earth macrobicyclic complexes,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 97(23), pp. 6700–6707, 1975.
- [104] X. X. Zhang, R. M. Izatt, J. S. Bradshaw, and K. E. Krakowiak, „Approaches to improvement of metal ion selectivity by cryptands,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 174, pp. 179–189, 1998.
- [105] S. M. Khopkar, *Basic Concepts Of Analytical Chemistry*, 2nd ed. Daryaganj: New Age International, 1998.

Tézispontok

I. *A kromatográfiás oszloptöltet szemcseméret eloszlásának (PSD) elválasztási hatékonyságra gyakorolt hatásának vizsgálata az általános sebességi modell matematikai megoldásával.*

- a) Különböző molekulaméret tartományokban ($\lesssim 0,5-100$ kDa) és kétféle (teljesen porózus és tömörmagvú) szemcseszerkezetű állófázis esetében végzett in silico kísérletek alapján megállapítottam, hogy a PSD szélesedésével az oszlophatékonyság csökken, mely csökkenés a vizsgálandó molekulák méretének növekedésével, illetve a szemcseátmérő csökkenésével egyre jelentősebb, akár 15% is lehet.
- b) A hatékonysági paraméterek (tányérmagasság, tányérszám, felbontás, csúcskapacitás) relatív változásának összehasonlító elemzése alapján, a gyakorlati szórástartományokat is figyelembe véve, igazoltam, hogy a tömörmagvú fázisokkal töltött oszlopok nagy hatékonysághoz a fázisok szűk szemcseméret eloszlása is hozzájárul. A teljesen porózus fázisok esetében, szemben a tömörmagvú töltetekkel, a PSD szórásának további csökkentése révén lehetőséget látok a hatékonyság növelésére.

II. *Az oszlopbeli nyomásviszonyok retencióra és az elválasztás minőségére gyakorolt hatásának vizsgálata a Gibbs-féle szabadentalpia egyenlet és az egyensúlyi-diszperzív modell segítségével eltérő moláris adszorpciós térfogatváltozás értékek mellett.*

Elméleti számításokkal alátámasztottam, hogy az elválasztandó molekulák adszorpció során bekövetkező térfogatváltozása és az oszlopbeli hosszirányú nyomásgradiens együttes hatásaként a komponensek vándorlási sebessége az elúció során folyamatosan nő. Mindez a sávok hosszirányú varianciájának extra növekedését okozza, azonban ezt a hatást némileg ellensúlyozza a sávok oszlopból történő megnövekedett kilépési sebessége. Ráműtöttem, hogy a két hatás eredőjeként az elválasztás hatékonysága jelentősen (10-50%-kal) csökkenhet a kolonna nyomásesésének és a molekula adszorpciós térfogatváltozásának függvényében. Eredményeimmel alátámasztottam, hogy nagyméretű molekulák (fehérjék, polimerek) megfelelő elválasztására a nagy szemcseátmérőjű ($\sim 5 \mu\text{m}$) tömörmagvú oszlopok alkalmasak kis nyomásesésük és nagy hatékonyságuk miatt.

III. *Mintaoldatbeli komplexképződés ionkromatográfiás jelentőségének vizsgálata Gd(III)-kelát komplexek latex-alapú anioncserélőn történő elválasztásának példáján.*

- a) A bázikus mozgófázis ellenionjának minőségétől függetlenül alkalmazható elméleti modellt vezettem le egyszerű és protonálható anionok, eluens koncentráció és pH függő retenciójának előrejelzésére. A modell mérési adatokra való illesztésével megadtam az intereluens, illetve Gd-DTPA és Gd-EDTA kelátok, valamint a leggyakoribb szerves anionok (Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}) ioncsere-egyensúlyi állandóit.
- b) A kidolgozott retenciós modell és a számított egyensúlyi paraméterek felhasználásával meghatároztam az optimális ($R_s \geq 1,3$) elválasztási körülményeket, mellyel anioncsere-kromatográfiás módszert adtam Gd-kelátok szerves mintamátrixból történő szelektív és érzékeny ($LOD = 0,37 \text{ nM} = 0,2 \mu\text{g/L Gd-DTPA}$; $0,06 \mu\text{g/L Gd}^{3+}$) minőségi és mennyiségi meghatározására. Mátrixalkotók eltávolítására, nyomnyi Gd^{3+} mennyiségi meghatározására kationcserélő SPE töltet és DTPA ligandum alkalmazásán alapuló mintaelőkészítési eljárást dolgoztam ki.

IV. *Állófázisbeli komplexképződés ionkromatográfiás szerepének vizsgálata szerves anionok és karboxilátok n-decil-2.2.2 kriptand anioncserélőn történő elválasztása szempontjából.*

- a) Többértékű ill. protonálható anionokra is alkalmazható modellt („bővített kriptand modell”) vezettem le a retenciós tényező alkáli-hidroxid mozgófázis koncentráció és fémion-tartalom függvényében való változásának leírására kriptand állófázison. Kapcsolatot írtam le a vizsgált szerves és karboxilát (egy-, többértékű, alifás, aromás, telített, telítetlen, halogénezett) anionok retenciós viselkedése és kémiai szerkezete között és megadtam az elválasztást befolyásoló egyensúlyi paramétereket.
- b) Kimutattam, hogy a retenció és a hőmérséklet közötti kapcsolat kriptand állófázison, egyértékű anionokra jellemzően lineáris, a moláris entrópia retencióhoz való hozzájárulása elhanyagolható ($\Delta S = -0,03-0,06 \text{ kJ/mol}\cdot\text{K}$) és a moláris szabadentalpia (ΔG) adatok egyértelműen követik a retenciós tényezők értékének alakulását.
- c) Modellt vezettem le a komponensek kezdeti mozgófázis koncentráció és gradiens meredekség függő retenciójának előrejelzésére (koncentráció gradiens elúció), valamint összefüggést írtam le eltérő fémion összetételű alkáli-hidroxid mozgófázisok (kapacitásgradiens elúció) esetén jellemző retenciós tényezők számítására kriptand állófázison. Meghatároztam a vizsgált karboxilátok retenciójának metanol tartalom függvényében való változását és rámutattam, hogy az említett szerves eluensmódosító alacsony, $\sim 5 \text{ v/v\%}$ -ban való alkalmazásával a csúcsalakok jelentősen javíthatók.

Theses

I. *To investigate the effect of the column particle size distribution (PSD) for the chromatographic efficiency based on to solve the general rate model (GRM) numerically.*

- a) It was found that the broadening PSD decreases the column performance. The loss of efficiency may be up to 15%, depending on the size of molecules analyzed and the diameter of the column packing particles. The results based on theoretical studies for various molecular size ranges ($\lesssim 0,5-100$ kDa) and two type (fully-porous and core-shell) of particle structures.
- b) By the comparative analysis of relative changes of the efficiency parameters (plate height, plate number, resolution, peak capacity), taking into account the practical PSD deviation ranges. It was proven that the narrow particle size distribution of the core-shell phases contributes to the high efficiency of columns packed by these phases significantly. It was shown, that it is possible to increase the chromatographic efficiency by further reducing the standard deviation of PSD of fully-porous particles, as opposed to core-shell particles.

II. *To study the effect of the column pressure for the retention and the separation quality in case of analytes with different molar adsorption volume change, using the Gibbs free energy equation and the equilibrium-dispersive model.*

- a) It was proven by theoretical calculations that migration velocity of compounds increases during elution as a simultaneous effect of the change of molar volume of the solutes during adsorption and the longitudinal pressure gradient. This phenomenon affects both retention and physical band broadening. As a result, the longitudinal variances of the bands increase significantly. This effect is partially compensated by the higher release velocity of the bands at the end of column. It was shown that the efficiency can decrease significantly (10-50%) as the result of these two counteracting processes, depending on the pressure drop and the change of molar adsorption volume. It was confirmed that core-shell phases with large particle diameter ($5 \mu\text{m}$) are optimal for separation of macromolecules (e.g. proteins, polymers) due to their low pressure drops and high efficiencies.

III. Complex formation equilibria in the sample solution – separation of Gd(III)-chelates on latex-based anion exchanger.

- a) A theoretical model was developed to predict the retention of simple and ionizable anions at various concentrations and pHs of the mobile phase. The developed model is independent from the type of the counter-ion of eluent. The intereluent selectivities and ion exchange equilibrium constants for Gd-DTPA, Gd-EDTA and the most common inorganic anions (Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}) were calculated by fitting the model to measured data.
- b) The optimal elution conditions ($R_s \geq 1,3$) were determined using the developed model and the iterated equilibrium constants. As a result, an anion exchange chromatographic method was introduced for selective and sensitive determination of Gd-chelates from inorganic sample matrices ($LOD = 0,37 \text{ nM} = 0,2 \mu\text{g/L Gd-DTPA}$; $0,06 \mu\text{g/L Gd}^{3+}$). A sample preparation method based on a solid phase extraction procedure using strong cation exchanger and DTPA ligand was developed to extract traces of Gd^{3+} and eliminate the interfering matrix components.

IV. Complex formation equilibria in the stationary phase – separation of inorganic anions and carboxylates on anion exchanger functionalized by *n*-decyl-2.2.2 cryptand ligand.

- a) A mathematical model, named „extended cyptand model" was developed to predict the retention of multivalent and ionizable anions at various ionic strength and metal ion content of alkali hydroxide mobile phase on cryptand based anion exchanger. The interdependences of chemical structure and retention behaviour of inorganic and carboxylates (mono-, multivalent, aliphatic, aromatic, saturated, unsaturated, halogenated) anions were analyzed. The equilibrium constants determine the separation were calculated.
- b) It was shown that the retention factor of monovalent anions depends on the temperature linearly on cryptand phase. It was proven that the contribution of molar entropy to retention is negligible ($\Delta S = -0,03-0,06 \text{ kJ/mol}\cdot\text{K}$) and the molar Gibbs free energy (ΔG) data are followed the retention order clearly.
- c) Theoretical models were developed to predict the retention factors of analytes, both at various initial eluent concentration and slope of gradient (concentration gradient elution), and at different type of eluent metal ion (capacity gradient elution) on cryptand stationary phase. The effect of methanol content of mobile phase on the retention of carboxylates was determined. It was shown that using a low amount (5 v/v%) of this solvent, the peak shapes can improve significantly.

A szerző tudományos munkássága

I. Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó közlemények

1. K. Horváth, S. Horváth, **D. Lukács**: Effect of axial temperature gradient on chromatographic efficiency under adiabatic conditions, *Journal of Chromatography A*, 1483, 2017, 80-85, doi:10.1016/j.chroma.2016.12.063, **IF: 3,85**
2. P. Hajós, **D. Lukács**, E. Farsang, K. Horváth: High Performance Anion Chromatography of Gadolinium Chelates, *Journal of Chromatographic Science*, 54(10), 2016, 1752-1760, doi:10.1093/chromsci/bmw133, **IF: 1,12**
3. K. Horváth, **D. Lukács**, A. Sepsey, A. Felinger: Effect of particle size distribution on the separation efficiency in liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1361(26), 2014, 203-208, doi:10.1016/j.chroma.2014.08.017, **IF: 4,54**
4. **D. Lukács**, K. Horváth: Impact of size heterogeneity of core-shell packing materials on chromatographic separation of large biomolecules, *Hungarian Journal of Industry and Chemistry*, 42(1), 2014, 25-29, ISSN: 0133-0276

II. Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó konferencia előadások és poszterek

Nemzetközi konferencián bemutatott előadások és poszterek

1. „*ABSZTRAKT ELFOGADVA*”: **D. Lukács**, K. Horváth, P. Hajós: In the shadow of the HPLC: Analysis of carboxylic acids with old-fashioned ion chromatography, *12th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods*, 11-13 September, 2019, Siófok, Hungary
2. **D. Lukács**, K. Horváth, P. Hajós: Analytical separation of carboxylic acids and inorganic anions on cryptand-based ion exchange stationary phase, *48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC-2019)*, 16-20 June, 2019, Milano, Italy

3. **D. Lukács**, K. Horváth, P. Hajós: High-Performance Separation of Aliphatic and Aromatic Carboxylic Acids with Macrocyclic-Based Anion Chromatography, *11th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods*, 6-8 September, 2017, Siófok, Hungary, ISBN: 978-615-5270-38-3 (Book of Abstract, pp. 86)
4. **D. Lukács**, K. Horváth, P. Hajós: Ion-chromatography method for analytical control of Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents, *International Symposium on Scientific and Regulatory Advances in Complex Drugs*, 27-28 October, 2014, Budapest, Hungary
5. **D. Lukács**, K. Horváth, P. Hajós: Ion chromatography of gadolinium chelates, *30th International Symposium on Chromatography*, 14-18 September, 2014, Salzburg, Austria
6. **D. Lukács**, K. Horváth, P. Hajós: Profiling of Gadolinium-Chelates as MRI Contrast Agents by High Performance Ion-Chromatography, *European Bioanalysis Forum: 7th Open Symposium "Beyond the Horizon – Painting a new landscape"*, 19-21 November, 2014, Barcelona, Spain
7. P. Hajós, **D. Lukács**, F. Gecző, K. Horváth: Simultaneous Analysis of Gadolinium Chelates as Ionic MRI Contrast Agents and Anions by High Performance Ion Chromatography, *39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2013)*, 16-20 June, 2013, Amsterdam, Netherlands
8. K. Horváth, **D. Lukács**, F. Gecző, P. Hajós: Analysis of Gadolinium MRI Contrast Agents by High Performance Chelation Ion Chromatography, *9th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods*, 4-6 September, 2013, Siófok, Hungary, ISBN: 978-963-89335-2-2 (Book of Abstract, pp. 153)
9. K. Horváth, A. Sepsey, **D. Lukács**, A. Felinger: Influence of Width of Particle Size Distribution on Separation Efficiency in Liquid Chromatography, *9th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods*, 4-6 September, 2013, Siófok, Hungary, ISBN: 978-963-89335-2-2 (Book of Abstract, pp. 96)

Hazai konferencián bemutatott előadások és poszterek

1. **Lukács D.**, Horváth K., Hajós P.: Karbonsavak és szerves anionok analitikai elválasztása kriptand alapú ioncsere-állófázison, *Műszaki Kémiai Napok*, 2019. április 16-18., Veszprém, ISBN: 978-963-396-121-6 (Konferencia Kiadvány magyar-angol, pp. 59-60)

2. **Lukács D.**, Horváth K., Hajós P.: Módszerfejlesztés karbonsavak és szerves anionok analitikai elválasztására makrociklus alapú ion-kromatográfiával, *Fiatal Analitikusok előadóiülése*, 2018. november 12., Budapest
3. **Lukács D.**, Horváth K., Hajós P.: Szerves anionok retenciós tulajdonságai makrociklus alapú ion-kromatográfiában, *Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2018*, 2018. november 8-10., Tapolca, ISBN: 978-615-5270-49-9 (Előadás- és poszterkivonatok, pp. 63)
4. Horváth K., Horváth Sz., Farsang E., Surguta M., **Lukács D.**: Karbonsav-anionok retenciós tulajdonságai nagyhatékonyságú makrociklikus ion-kromatográfiában, *Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2016*, 2016. november 9-11., Kecskemét, ISBN: 978-615-5270-30-7 (Előadás- és poszterkivonatok, pp. 55)
5. **Lukács D.**, Horváth K., Hajós P.: Gadolínium-kelátok ionkromatográfiás analízise, *Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2014*, 2014. november 12-14., Egerszalók, (Előadás- és poszterkivonatok, pp. 96)
6. **Lukács D.**, Horváth K., Hajós P.: Folyadékkromatográfiás állófázis részecskeméret eloszlásának hatása az elválasztás hatékonyságára, *Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2014*, 2014. november 12-14., Egerszalók, (Előadás- és poszterkivonatok, pp. 58)

III. Az értekezés tématerületét érintő konferencia előadások és poszterek

Nemzetközi konferencián bemutatott előadások és poszterek

1. K. Horváth, **D. Lukács**: Determination of equilibrium isotherms in ion chromatography by the inverse method, *XI. International Conference Ion Chromatography and Related Techniques*, 20-21 April, 2016, Zabrze, Poland
2. **D. Lukács**, K. Horváth, Sz. Horváth: Modeling of the Effect of Frictional Heating on Chromatographic Separations, *10th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods*, 2-4 September, 2015, Siófok, Hungary, ISBN: 978-615-5270-18-5 (Book of Abstract, pp. 118)
3. K. Horváth, M. Szakács, **D. Lukács**, P. Hajós: Evaluation of robustness of two-dimensional liquid chromatographic separations, *30th International Symposium on Chromatography*, 14-18 September, 2014, Salzburg, Austria
4. K. Horváth, V. Gaál, **D. Lukács**, P. Hajós: Separation of Octyl Phenol Ethoxylate Oligomers by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography, *41st International Sympo-*

sium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2014), 11-15 May, 2014, New Orleans, Louisiana, USA

5. K. Horváth, **D. Lukács**, P. Hajós: Determination of Isotherms of Proteins by Inverse Gradient Chromatography, *41st International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2014)*, 11-15 May, 2014, New Orleans, Louisiana, USA

Hazai konferencián bemutatott előadások és poszterek

1. Horváth K., Horváth Sz., Farsang E., Surguta M., **Lukács D.**: Axiális hőmérséklet gradiens hatása kromatográfias elválasztások hatékonyságára, *Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2016*, 2016. november 9-11., Kecskemét, ISBN: 978-615-5270-30-7 (Előadás- és poszterkivonatok, pp. 47)

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Hajós Péter és Dr. Horváth Krisztián egyetemi docenseknek (Analitikai Kémia Intézeti Tanszék) a szakmai segítségért mind elméleti mind gyakorlati vonatkozásban, valamint hogy lehetővé tették számomra a szakterület részletesebb megismerését.

Köszönöm Dr. Idei Miklós (DSc) Professzor Úrnak, az MTA Támogatott Kutatóhelyek Irodája igazgatójának és Nagyné Dr. Szabó Andrea egyetemi docensnek (Széchenyi István Egyetem, Fizika és Kémia Tanszék) a dolgozatról alkotott véleményét, valamint annak szerkesztésére, tartalmára vonatkozóan tett részletes javaslatait, szakmai észrevételeit.

Köszönettel tartozom továbbá a témakörben korábban szakdolgozó, diplomázó és tudományos diákköri kutatást folytatott hallgatóknak, elsősorban Farsang Evelinnek, Gecző Flórának, Gaál Violetának, Szeitz Beátának és Tóth Adélnak az együtt végzett munkából nyert eredményekért és tapasztalatokért.

Köszönöm Dr. Csordás Anitának és Dr. Simon Józsefnek a dolgozatra vonatkozóan tett kritikus és aprólékos észrevételeit, javaslatait, melyek jelentős segítséget nyújtottak a dolgozat végső formájának kialakításához. Köszönöm továbbá az Analitikai Kémia Intézeti Tanszék valamennyi dolgozójának és doktorandusz hallgatójának támogatását és türelmét.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak, akik mindvégig segítettek és támaszt nyújtottak.

Veszprém, 2019. július

Lukács Diána

Függelék

1. táblázat. Az ionkromatográfias mérések során vizsgált komponensek főbb fizikai-kémiai tulajdonságai. [95–98]

Vegyület neve	Kémiai képlet	Moláris tömeg [g/mol]	D^a [$\times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$]	pK_a^b (25°C)		
klorid	Cl^-	35,45	2,032	-	-	-
bromát	BrO_3^-	127,91	1,483	-	-	-
nitrit	NO_2^-	46,00	1,912	-	-	-
bromid	Br^-	79,90	2,080	-	-	-
nitrát	NO_3^-	62,00	1,902	-	-	-
szulfát	SO_4^{2-}	96,06	1,065	-	-	-
foszfát	PO_4^{3-}	94,97	0,824	-	-	-
hangyasav	HCOOH	46,03	1,454	3,77	-	-
ecetsav	CH_3COOH	60,03	1,089	4,76	-	-
tejsav	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$	90,05	1,033	3,86	-	-
propionsav	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$	74,05	0,953	4,87	-	-
piroszőlősav	$\text{CH}_3\text{COCOCH}_2\text{COOH}$	88,03	1,116	2,39	-	-
oxálsav	HOOC-COOH	90,02	0,987	1,25	3,81	-
malonsav	$\text{HOOC}(\text{CH}_2)\text{COOH}$	104,03	0,845	2,85	5,70	-
borostyánkősav	$\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	118,05	0,783	4,21	5,64	-
adipinsav	$\text{HOOC}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	146,08	0,740	4,41	5,41	-
pimelinsav	$\text{HOOC}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$	160,09	0,710	4,71	5,58	-
fumársav	$\text{HOOCCH}=\text{CHCOOH}$	116,03	0,823	3,02	4,38	-
maleinsav	$\text{HOOCCH}=\text{CHCOOH}$	116,03	0,824	1,92	6,23	-
borkősav	$\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2(\text{OH})_2\text{COOH}$	150,09	0,794	3,03	4,46	-
citromsav	$\text{C}_3\text{H}_4(\text{OH})(\text{COOH})_3$	192,06	0,623	3,13	4,76	6,40
TFA	CF_3COOH	114,01	1,092	0,52	-	-
BCA	CHBrClCOOH	183,39	0,104	1,40	-	-
benzoesav	$\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$	122,05	0,863	4,20	-	-
ftálsav	$\text{HOOC}(\text{C}_6\text{H}_4)\text{COOH}$	166,05	0,696	2,94	5,43	-
szalicilsav	$\text{HOOC}(\text{C}_6\text{H}_4)(\text{OH})\text{COOH}$	138,05	0,959	2,98	13,6	-

^aDiffúziós állandó (végtelen híg, vizes oldatban).

^bSavi disszociációs állandó.

2. táblázat. A vizsgált szerves kelátképző és szervesetlen ligandumok protonálódási állandói. [99, 100]

Ligandum	$\lg K_{[HL]}$	$\lg K_{[H_2L]}$	$\lg K_{[H_3L]}$	$\lg K_{[H_4L]}$	$\lg K_{[H_5L]}$	$\lg K_{[H_6L]}$	Ionerősség [M]
EDTA ⁴⁻	10,34	6,24	2,75	2,07	1,60	0,90	0,1
DTPA ⁵⁻	10,56	8,69	4,37	2,87	1,94	-	0,1
DCTA ⁴⁻	11,78	6,20	3,60	2,51	-	-	0,1
CO₃ ²⁻	10,1	6,4	-	-	-	-	0,1
PO₄ ³⁻	11,7	6,9	2,0	-	-	-	0,1

3. táblázat. A vizsgált poliamino-karboxilát ligandumok gadolíniummal képzett komplexek stabilitási állandói (25 °C, 1 bar). [100]

Ligandum	$\lg K_{[GdL]}$	$\lg K_{[GdHL]}$	Ionerősség [M]
EDTA ⁴⁻	17,37	2,63	0,1
DTPA ⁵⁻	22,46	2,39	0,1
DCTA ⁴⁻	18,8	-	0,1

4. táblázat. Néhány karboxilát ligandum gadolíniummal képzett komplexének stabilitási állandója (25 °C, 1 bar). [101]

Ligandum	$\lg K_{[GdL]}$	$\lg K_{[GdL_2]}$	Ionerősség [M]
formiát	1,77	1,00	0,0
acetát	2,43	1,93	-
laktát	3,35	2,60	-
propionát	2,54	1,94	-
oxalát	6,68	4,53	0,0
malonát	5,87	3,46	-
szukcinát	4,59	-	0,0
adipát	4,26	-	0,0
fumarát	4,00	-	0,0
maleát	4,95	2,58	-
benzoát	2,70	1,92	0,0
ftalát	4,87	2,24	0,0
izoftalát	3,85	-	0,0
szalicilát	2,32	2,35	-

5. táblázat. A kelátképződés mellett feltételezhető melléreakciókban kialakuló szervesen gadohányium specieszek képződési állandó. [102]

Ligandum	$\lg K_{[\text{GdL}]}$	$\lg K_{[\text{GdL}_2]}$	$\lg K_{[\text{GdL}_3]}$	$\lg K_{[\text{GdL}_4]}$	$\lg K_{[\text{GdHL}]}$	$\lg K_{[\text{Gd}(\text{HL})_2]}$	$\lg K_{[\text{GdH}_2\text{L}]}$
OH^-	6,0	5,8	5,7	4,6	-	-	-
CO_3^{2-}	7,8	5,3	-	-	2,1	-	-
PO_4^{3-}	12,2	8,5	-	-	5,7	3,9	2,4
SO_4^{2-}	3,4	1,7	-	-	-	-	-
NO_3^-	0,8	-	-	-	-	-	-
Cl^-	0,3	-	-	-	-	-	-

6. táblázat. n-decil-2.2.2 kriptand ligandum protonálódási (pK_1 , pK_2) és komplexstabilitási állandói ($\lg K_M$) különböző alkálifém-kationok esetén. [103, 104]

Oldószer	pK_1	pK_2	$\lg K_M$		
			Li^+	Na^+	K^+
víz	7,28	9,60	1,25	3,9	5,4
víz/metanol (5/95)	6,64	9,85	1,8	7,21	9,75
metanol	n.a.	n.a.	2,6	>8,0	>7,0

7. táblázat. Ionátmérő (d_i) és kavitás kitöltési hányados, valamint hidratációs szabadentalpia (ΔG° , 25°C) és a fém-ligandum komplex kialakulásának entalpiaváltozás értékei különböző alkálifém kationok esetén. [93, 103, 105]

Kation	d_i [Å]	d_i/d_c^a	ΔG° [kJ mol ⁻¹]	ΔH [kJ mol ⁻¹]	
				[2.2.2] _S ^b	[2.2.2] _W ^c
Li^+	1,48	0,53	-510,4	-50,79	-5,86
Na^+	1,99	0,71	-412,1	-28,70	-30,96
K^+	2,66	0,95	-336,8	-22,72	-47,95

^aAz n-decil-2.2.2 kriptand ligandum kavitás átmérője ($d_c = 2,8$ Å).

^bAz állófázison végbemenő komplexképződés entalpiaváltozása.

^cHomogén mozgófázisban végbemenő komplexképződés entalpiaváltozása (25°C).

8. táblázat. Szervetlen anionok kriptand állófázison mért retenciók tényező értékei KOH mozgófázis esetén.

Komponens	Mozgófázis koncentráció [mM]												
	1,0	3,0	5,0	7,0	10,0	15,0	20,0	25,0	30,0	40,0	60,0	80,0	100,0
	1,0	2,8	4,6	6,4	8,9	13,0	17,0	20,8	24,5	31,7	45,1	57,6	69,2
	Mozgófázis aktivitás [mM]												
klorid	10,654	6,842	5,099	3,946	3,203	2,228	1,736	1,427	1,223	0,935	0,687	0,543	0,456
bromát	10,605	6,880	5,256	4,106	3,171	2,404	1,901	1,578	1,359	1,048	0,785	0,632	0,535
nitrit	14,410	10,222	8,025	6,390	5,001	3,842	3,068	2,568	2,234	1,747	1,341	1,093	0,922
bromid	19,163	14,441	11,900	9,569	7,577	5,936	4,793	4,026	3,530	2,775	2,185	1,778	1,526
nitrát	25,306	21,099	17,999	14,895	12,157	9,779	8,079	6,930	6,133	4,941	3,968	3,259	2,810
szulfát	-	-	-	-	-	-	-	-	3,207	1,748	0,869	0,539	0,333
foszfát	-	-	-	-	-	-	-	-	20,894	8,765	3,321	1,550	0,835
RSD% átlag	0,36	0,13	0,22	0,07	1,43	0,22	0,21	0,11	0,16	0,23	0,22	0,15	0,26

9. táblázat. Szervetlen anionok kriptand állófázison mért retenciók tényező értékei NaOH mozgófázis esetén.

Komponens	Mozgófázis koncentráció [mM]																
	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	7,0	10,0	20,0	30,0	40,0	50,0	60,0	70,0	80,0	90,0	100,0
	0,5	1,0	1,9	2,8	3,7	4,6	6,4	8,9	17,0	24,5	31,7	38,6	45,1	51,5	57,6	63,5	69,2
	Mozgófázis aktivitás [mM]																
klorid	0,367	0,519	0,853	0,923	0,949	0,916	0,925	0,858	0,690	0,565	0,482	0,434	0,401	0,343	0,320	0,303	0,276
bromát	0,342	0,501	0,845	0,909	0,933	0,911	0,902	0,848	0,681	0,564	0,486	0,434	0,384	0,345	0,324	0,310	0,283
nitrit	0,468	0,649	1,073	1,207	1,254	1,216	1,240	1,192	1,022	0,867	0,768	0,705	0,636	0,592	0,545	0,533	0,499
bromid	0,603	0,815	1,334	1,572	1,663	1,601	1,661	1,627	1,459	1,263	1,141	1,063	0,976	0,908	0,851	0,834	0,783
nitrát	0,726	0,976	1,645	1,956	2,083	2,009	2,122	2,125	1,994	1,780	1,613	1,535	1,417	1,327	1,258	1,246	1,189
szulfát	1,254	2,044	3,953	4,381	4,291	4,074	3,275	3,073	1,724	1,063	0,733	0,551	0,401	0,343	0,267	0,218	0,175
foszfát	1,294	2,255	6,380	9,079	10,273	9,541	10,374	9,487	5,783	3,198	1,982	1,371	0,923	0,661	-	0,396	0,301
RSD% átlag	0,51	0,30	0,21	0,23	0,33	0,39	0,23	0,26	0,17	0,22	0,29	0,21	0,24	0,38	0,20	0,19	0,31

10. táblázat. Karbonsav anionok kriptand állófázison mért retenciós tényező értékei KOH mozgófázis esetén.

	Mozgófázis koncentráció [mM]				
	1,0	5,0	15,0	30,0	50,0
Komponens	Mozgófázis aktivitás [mM]				
	0,96	4,61	13,0	24,5	38,6
formiát	1,209	0,764	0,434	0,309	0,269
acetát	1,775	0,921	0,495	0,331	0,292
laktát	1,828	0,954	0,506	0,336	0,294
propionát	2,213	1,162	0,618	0,403	0,350
piruvát	2,362	1,347	0,720	0,517	0,399
oxalát	-	10,696	2,497	0,820	0,547
malonát	-	10,758	2,583	0,838	0,528
szukcinát	-	11,462	2,809	0,937	0,582
adipát	-	13,185	3,231	1,098	0,669
pimelát	-	15,473	3,948	1,326	0,806
fumarát	-	18,528	4,847	1,636	0,990
maleát	-	10,224	2,593	0,893	0,551
tartarát	-	7,990	1,920	0,793	0,476
citrát	-	-	24,855	3,707	1,395
TFA	8,385	7,390	4,460	2,631	2,380
BCA	10,972	9,249	5,485	3,221	2,852
benzoát	20,208	15,058	8,439	6,015	4,351
ftalát	-	23,641	6,893	2,026	1,192
szalicilát	-	-	-	-	-
RSD% átlag	0,72	0,86	0,57	0,41	0,21

11. táblázat. Karbonsav anionok kriptand állófázison mért retenciós tényező értékei NaOH mozgófázis esetén.

	Mozgófázis koncentráció [mM]				
	1,0	5,0	15,0	30,0	50,0
Komponens	Mozgófázis aktivitás [mM]				
	0,96	4,61	13,0	24,5	38,6
formiát	0,210	0,317	0,301	0,244	0,216
acetát	0,160	0,260	0,280	0,272	0,256
laktát	0,154	0,251	0,277	0,268	0,255
propionát	0,175	0,292	0,322	0,309	0,293
piruvát	0,163	0,299	0,339	0,330	0,315
oxalát	0,159	0,702	0,669	0,492	0,370
malonát	0,183	0,683	0,666	0,487	0,371
szukcinát	0,202	0,697	0,711	0,525	0,385
adipát	0,193	0,753	0,789	0,582	0,424
pimelát	0,207	0,834	0,898	0,666	0,485
fumarát	0,349	0,909	1,015	0,771	0,553
maleát	0,236	0,681	0,684	0,505	0,370
tartarát	0,422	1,263	0,704	0,438	0,330
citrát	0,784	3,021	2,479	1,224	0,641
TFA	0,294	0,840	1,107	1,183	1,116
BCA	0,379	1,077	1,446	1,515	1,434
benzoát	0,914	1,954	2,630	2,747	2,540
ftalát	0,365	1,071	1,185	0,896	0,636
szalicilát	5,282	13,463	21,300	23,996	-
RSD% átlag	0,66	0,46	0,29	0,14	0,07

12. táblázat. Karbonsav anionok kriptand állófázison mért retenciós tényező értékei LiOH mozgófázis esetén.

Komponens	Mozgófázis koncentráció [mM]				
	1,0	5,0	15,0	30,0	50,0
	Mozgófázis aktivitás [mM]				
	0,96	4,61	13,0	24,5	38,6
formiát	0	0,029	0,073	0,119	0,137
acetát	0,043	0,075	0,124	0,139	0,158
laktát	0,037	0,072	0,121	0,139	0,166
propionát	0,051	0,081	0,122	0,151	0,185
piruvát	0,045	0,076	0,092	0,150	-
oxalát	0,008	0,038	0,084	0,124	0,148
malonát	0,016	0,039	0,092	0,089	0,141
szukcinát	0,016	0,043	0,091	0,127	0,154
adipát	0,014	0,044	0,093	0,131	0,157
pimelát	0,018	0,046	0,096	0,136	0,162
fumarát	0,010	0,040	0,090	0,133	0,159
maleát	0	0,040	0,086	0,128	0,143
tartarát	0,016	0,043	0,091	0,127	0,154
citrát	0	0,029	0,073	0,119	0,137
TFA	0,084	0,113	0,197	0,255	0,431
BCA	0,106	0,142	0,228	0,330	0,552
benzoát	0,191	0,256	0,405	0,613	0,786
ftalát	0,011	0,045	0,101	0,144	0,161
szalicilát	0,790	0,827	-	1,885	-
RSD% átlag	0,30	0,05	0,08	0,14	0,20

13. táblázat. Kriptand állófázison mért és becsült retenciós tényező értékek egyezőségét jellemző korrelációs egyenesek meredeksége az egyes komponensek esetén.

	<i>klorid</i>	<i>bromát</i>	<i>nitrit</i>	<i>bromid</i>	<i>nitrát</i>	<i>szulfát</i>	<i>foszfát</i>	
KOH	0.9573	0.9745	0.9388	0.9115	0.8815	1.0199	1.0678	
NaOH	0.9579	0.9750	0.9623	1.0023	0.7853	-	0.9292	
	<i>formiát</i>	<i>acetát</i>	<i>laktát</i>	<i>propionát</i>	<i>piruvát</i>	<i>TFA</i>	<i>BCA</i>	
KOH	1.0144	1.0706	1.0717	1.0636	1.0304	0.8163	0.8332	
NaOH	1.0011	0.8713	0.7944	0.8958	0.6915	0.5192	0.5112	
LiOH	0.4894	0.6846	0.7468	1.1204	0.8757	1.9076	2.0859	
	<i>oxalát</i>	<i>malonát</i>	<i>szukcinát</i>	<i>adipát</i>	<i>pimelát</i>	<i>fumarát</i>	<i>maleát</i>	<i>tartarát</i>
KOH	1.0410	1.0219	1.0190	1.0221	1.0065	1.0038	1.0181	1.0737
NaOH	0.7736	0.8244	0.8305	0.7602	0.7235	0.7713	0.8352	1.1249
LiOH	0.9995	0.7897	1.1474	1.0771	1.1889	1.0954	0.3417	1.1474
	<i>citrát</i>	<i>benzoát</i>	<i>ftalát</i>	<i>szalicilát</i>				
KOH	0.9287	0.9046	1.1045	-				
NaOH	1.0518	0.7556	0.6947	0.8651				
LiOH	0.4993	1.9915	0.9505	0.9988				