

Pécsi Tudományegyetem
Kémia Doktori Iskola

**A folyadékkromatográfiás mérések hatékonyságát
meghatározó anyagátadási folyamatok vizsgálata.**

tézisfüzet

Lambert Nándor Csaba

témavezető:
Dr. Felinger Attila
egyetemi tanár

Pécs, 2018

1. Bevezetés

Az elmúlt évtizedben számos új, különböző típusú és átmérőjű teljesen porózus és tömörmagvú szemcsékkel, vagy monolit típusú állófázissal töltött folyadékkromatográfiás oszlop jelent meg a piacon. Az újabb keletű ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiában (UHPLC) leginkább a rövid, kis belsőátmérővel rendelkező (2,1 mm × 50 mm), 3 μm vagy akár 2 μm átmérő alatti szemcsékkel töltött oszlopok terjedtek el leginkább [1–4]. A folyadékkromatográfiás mérések hatékonyságát a mintasáv oszlopban történő kiszélesedésén keresztül, számos különböző hatás együttesen szabja meg, ideértve a diszperziót a mozgófázisban, a szemcsék felületén fellépő külső anyagátadási gátlást, valamint a szemcsebeli diffúzió és az adszorpció-deszorpció folyamata során fellépő csúcshévesedést [5].

A tömörmagvú szemcsés töltetek használatával a gyors-folyadékkromatográfiás rendszerek hatékonysága tovább növelhető, ezen szemcsék tipikus átmérője 2,5 és 5 μm között van. Amellett, hogy a szemcsék közepében elhelyezett átjárhatatlan tömör mag jelentősen lecsökkenti a szemcsebeli diffúzió úthosszát, a korábbi tanulmányok alapján ezekben a töltetekben az örvénydiffúzió mértéke is szokatlanul kis mértékű. [6, 7].

A minta szemcsebeli diffúziója, a pórusok hálózatát kitöltő mozgófázisbeli diffúzióknak illetve a mintamolekulák adszorbeált állapotában az állófázis felületén történő diffúziójának együttes hatásaként adható meg. Az utóbbi hatás nagymértékben meghatározó a makromolekulák, úgymint a fehérjék vagy más biomolekulák szemcsebeli diffúziója során. Mivel ezen molekulák diffúziós állandója meglehetősen kicsi a nagy méretük miatt, mozgásuk a szűk pórusokban erősen gátolt [8].

A jól ismert szemcsés töltetek mellett a monolit típusú szilikagél állófázisok fejlesztése nyújt lehetőséget a teljesítmény növelésére. Ebben az esetben megfelelő hatékonyság érhető el kis nyomásesés és nagy áramlási sebesség – így rövid analízis idő – fenntartása mellett, köszönhetően a nagy makropórus méretekhez társuló finom szilika váznak [9–13].

A szemcsékkel töltött oszlopokban a töltési eljárásból adódóan a töltetanyag nem teljesen homogén, az oszlopban szorosan és lazán töltött részek váltják egymást, ami a lokális mozgófázis sebesség különbségeket okoz az oszlop mentén [14]. Tanaka és kutatócsoportja a mintasáv jelentős mértékű diszperzióját írta le a töltetes oszlopokban elhelyezett porózus frittben, illetve a töltetanyag heterogenitása miatt az oszlopvégek közelében. Ez a hatás főleg a kis retencióval bíró komponensek esetén ($k < 2$) jelentős ahol a mozgófázis diszperzió a meghatározó csúcshévesítő hatás [15].

Adott oszlop geometria mellett – adott oszlop hossz és belső-átmérő mellett – az oszlop hatékonyság növelése a szemcseátmérő csökkentésével érhető el [16, 17]. Mindamellett, hogy az oszlopon elérhető legnagyobb tányérszám fordítottan arányos a szemcsemérettel, a működéshez szükséges ellennyomás négyzetesen nő a szemcseátmérő csökkenésével. A megemelkedett ellennyomás miatt a mozgófázisban tetemes sűrűlódási hő keletkezik, ami hőmérséklet különbségekhez, így az eluens viszkozitásának és sebességének heterogenitásához vezet az oszlopban [18]. A kromatográfiás mérések során a reprodukálhatóság fenntartásának érdekében az oszlopot ál-

landó hőmérsékleten tartjuk, azaz folyamatosan hőt vonunk el a az oszlop falán keresztül. Ez egy radiális hőmérsékleti gradiens kialakulásához vezet az oszlopban. Ennek következtében az oszlop közepén a mozgófázis sebessége nagyobb lesz, mint a falhoz közeli térrészekben, jelentős csúcscsúszéledést, és ezzel hatékonyság veszteséget okozva [19, 20]. Az oszlop hőszigetelésével és a radiális hőmérsékleti gradiens megszüntetésével a fent említett hatás mértéke leírható.

Munkám során többféle teljesen porózus valamint tömörmagvú, és egy monolit típusú fordított fázisú szilikagél állófázis hatékonyságát vizsgáltam a kromatográfia általános sebességi modelljének segítségével, kitérve a súrlódási hő, a töltet heterogenitás és a szemcsebeli diffúzió csúcscsúszéledő hatásaira [5].

Az utóbbi évek technikai fejlődésének köszönhetően, a szuperkritikusfluidim-kromatográfia (SFC) mind az elméleti kutatók, mind a felhasználók figyelmének középpontjába került [21–27]. Az SFC esetén a mozgófázis szuperkritikus állapotú gáz. Legelterjedtebben szén-dioxid gáz használatos, mivel könnyen elérhető, nem korrozív, valamint alacsony nyomású és hőmérsékletű kritikus ponttal rendelkezik. A szuperkritikus állapotú gáz mozgófázisként történő alkalmazásának legnagyobb előnye az elhanyagolható viszkozitásából adódik, ami lehetővé teszi nagy áramlási sebességek használatát nagyon finom szemcsékkel töltött állófázisokon is, elhanyagolható nyomásesés és gyors szemcsebeli anyagátadási jellemzők mellett.

Mivel a szuperkritikus-fluidum sűrűsége erősen függ a nyomás és hőmérséklet körülményektől, a mintakomponensek retenciója változik az oszlopban [28–31].

Disszertációmban helyet kapott az SFC és az UHPLC technikák összehasonlítása a kromatográfia sztochasztikus modelljének segítségével. [16, 32–35]. A modell a molekulák véletlenszerű vándorlásával és véletlenszerűen bekövetkező adszorpciójával írja le az elválasztás folyamatát. Mivel a hagyományos HPLC oszlopok használhatók SFC módban is, két kromatográfias mód direkt összehasonlítása megvalósítható ugyanazon oszlopon.

2. Kutatási célkitűzések

1. A súrlódási hő hatásának vizsgálata a hatékonyságra.
 - (a) A hatékonyság mérése kis molekulák segítségével az oszlop termosztálása és szigetelése mellett.
 - (b) A különböző geometriai paraméterek, térkitöltési tényezők meghatározása a vizsgált tömörmagvú és teljesen porózus oszlopokban teljes póruszárásos módszerrel.
 - (c) A külső obstrukciós faktor meghatározása csúcsparkoltatásos módszerrel.
 - (d) A különböző csúcsszélesítő hatások becslése, és levonása kísérletileg meghatározott adatokból, a súrlódási hő okozta tányérmagasság meghatározásának céljából.
2. Gyors folyadékkromatográfias oszlopok hatékonyságának összehasonlítása.
 - (a) A vizsgált oszlopok (monolit, teljesen és részlegesen porózus szemcsékkel töltött) hatékonyságának meghatározása azonos körülmények között, kis molekulák segítségével.
 - (b) A vizsgált oszlopokon megfigyelt hatékonyságkülönbségek felderítése és leírása.
 - (c) Az oszlopvégek lokális hatékonyságának meghatározása oszlopforgatásos módszerrel.
3. Makromolekulák szemcsebeli diffúziójának vizsgálata.
 - (a) Teljesen porózus és tömörmagvú HPLC oszlopok hatékonyságának mérése inzulinnal.
 - (b) A mozgófázis diszperzió csúcsszélesítő hatásának becslése, majd kivonása a mért csúcsvariációkból.
 - (c) A szemcsebeli diffúzió csúcsszélesítő hatásának meghatározása és leírása.
4. Az UHPLC és az SFC technikák anyagátadási jellemzőinek összehasonlítása.
 - (a) Ugyanazon kromatográfias oszlop hatékonyságának meghatározása alkilbenzolok segítségével a fent említett két kromatográfias módban.
 - (b) A sztochasztikus modell által szolgáltatott anyagátadási tényezők számítása és összehasonlítása a kísérletileg meghatározott csúcsok segítségével.

3. Anyag és módszer

3.1. A teljes póruszárás módszere

A teljes póruszárásos módszer során az állófázis pórusait hidrofób oldószerekkel telítve, azzal nem elegyedő minta elúciós idejéből a szemcsék közötti mozgófázis térfogata meghatározható. A kísérletek során a póruszárásra oktánt illetve dodekánt használtunk a teljesen porózus illetve a tömörmagvú szemcsékkel töltött oszlopok esetén. Az apoláris oldószert ammónium-formiát puffer segítségével hajtottuk ki a szemcsék közötti térből. Az injektált minta tiokarbamid volt.

3.2. A csúcsparkoltatásos módszer

Csúcsparkoltatás során egy retenció nélküli komponenst injektálunk a vizsgált oszlopra. Amint a mintasáv eléri az oszlop közepét, az áramlást adott parkolási ideig ($t_p = 0, 30, 60, 300, 600, 1200, 2400, 3600$ másodperc) szüneteltetjük, mialatt a minta szabadon diffundál axiális irányba. A csúc szélesség és a parkolási idő közötti lineáris összefüggés meredekségéből a minta effektív diffúziós együttható megállapítható.

3.3. Az oszlopforgatásos módszer

Az oszlopforgatásos módszer alkalmas a töltet axiális heterogenitásának vizsgálatára, és így az oszlop végek közötti különbségek felderítésére. A kísérletek során retenció nélküli tiokarbamid mintát injektáltunk adott irányból az oszlopra, amint a mintasáv kívánt távolságba hatolt az oszlopban (1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 vagy 4 cm) az áramlás szüneteltetése mellett, az oszlopot megfordítottuk. Az áramlást visszkapcsolva a minta az oszlop ugyanazon végén eluálódik, amelyen belépett. Az alkalmazott mozgófázis megegyezett a hatékonyság méréséhez használt eluens összetételével, míg az alkalmazott áramlási sebesség $0,2 \text{ cm}^3/\text{perc}$ volt.

Mivel a mintasáv szabadon diffundál hosszanti irányban amíg az áramlás szünetel, a meghatározott varianciaértékeket korrigálni kell a csúcsparkoltatásos mérések segítségével meghatározott effektív diffúziós koefficiensből adódó variancia értékekkel [36, 37].

3.4. A súrlódási hő hatásának vizsgálata UHPLC oszlopok hatékonyságára

A kísérletek során alkilbenzolok homológ sorának tagjait (oktil-, decil-, dodecil-, tetradecil-, és oktadecil-benzol) $0,5 \text{ mg}/\text{cm}^3$ koncentrációban tartalmazó mintakeveréket adagoltunk több, $0,2$ és $0,9 \text{ cm}^3/\text{perc}$ közötti áramlási sebesség mellett. A standardok és az eluens a Sigma-Aldrich-tól (Schnelldorf, Németország) kerültek beszerzésre. A minta oldószere, és mozgófázis tiszta metanol volt. A méréseket Waters Aquity I-class UPLC (Waters Corporation, USA, Milford) készülék segítségével végeztük UV detektálás mellett. A vizsgált oszlopok egy teljesen porózus Waters BEH ($50 \times 2,1 \text{ mm}$, $1,7 \mu\text{m}$ szemcseátmérő,) és egy tömörmagvú Waters Cortecs

($50 \times 2,1$ mm $1,7 \mu\text{m}$ szemcseátmérő,) oszlopok voltak. A méréseket elvégeztük az $25 \text{ }^\circ\text{C}$ -on történő termosztálás és közel adiabatikus szigetelés mellett is, míg mozgófázist mindkét esetben előmelegítettük $25 \text{ }^\circ\text{C}$ -ra. A szigeteléshez az oszlopok méretéhez igazított polisztirol habszivacs tömböt alkalmaztunk.

3.5. Gyors-kromatográfiás állófázisok hatékonyságának összehasonlítása

A vizsgált oszlopok hatékonyságának mérését Waters Acquity I-Class UPLC készülék segítségével végeztük. Az injektált minta acetanilid, acetofenon, propiofenon, butirofenon, benzofenon, valeriofenon, hexanofenon, heptanofenon és oktanofenon (Agilent Technologies, USA, Palo Alto) $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ koncentrációjú keverékét tartalmazta, míg a mozgófázis minden esetben acetonitril és víz (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Németország) 65:35 v/v keveréke volt. A holtterfogatok meghatározásához tiokarbamidot használtunk. Az oszlopokat állandó 40°C -os hőmérsékleten termosztáltuk. A készülék összekötő kapillárisainak optimalizálása során a rendszer holtterfogatót $1 \mu\text{L}$ -re csökkentettük. Öt különböző típusú, de azonos geometriai paraméterekkel bíró ($50 \times 2,1$ mm) fordított fázisú (C_{18}) oszlop (GLSciences és Phenomenex) hatékonyságát mértük a fent említett mintamolekulák segítségével, széles ($0,05$ - $1,0 \text{ cm}^3/\text{perc}$) áramlási sebesség tartományban.

3.6. Makromolekulák szemcsebeli diffúziójának vizsgálata

A makromolekulák szemcsebeli diffúziójának leírása során $1,0 \text{ mg}/\text{cm}^3$ koncentrációjú inzulin mintát (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Németország) használtunk. A mintát a mozgófázisként is alkalmazott trifluor-ecetsavas acetonitril-víz keverékben oldottuk. A kísérletek során öt különböző oszlopot vizsgáltunk: teljesen porózus töltetű Agilent Zorbax ($100 \times 4,6$ mm; $3,5 \mu\text{m}$ szemcseátmérő) és Waters Xselection ($100 \times 2,1$ mm; $2,5 \mu\text{m}$ szemcseátmérő) oszlopokat, valamint tömörmagvú Phenomenex Kinetex ($100 \times 4,6$ mm; $2,6 \mu\text{m}$ szemcseátmérő), Phenomenex Aeris Peptide ($100 \times 4,6$ mm; $3,6 \mu\text{m}$ szemcseátmérő), és Phenomenex Aeris Widepore ($100 \times 4,6$ mm; $3,6 \mu\text{m}$ szemcseátmérő) oszlopokat. A mozgófázis összetételét, illetve az áramlási sebességet úgy választottuk meg, hogy a minta retenciója és a mozgófázis lineáris sebessége hasonló legyen a különböző oszlopok esetén.

A méréseket Agilent 1290 Infinity UHPLC készüléken (Agilent Technologies, USA, Palo Alto,) végeztük Agilent Chemstation szoftver segítségével UV-detektálás mellett, az oszlopok $25 \text{ }^\circ\text{C}$ -on termosztálása mellett.

A vizsgált oszlopok külső és belső térkitöltési tényezőit Bacskay és munkatársai korábbi kutatásaik során méretekizárásos kromatográfia segítségével meghatározták [38], dolgozatomban az általuk leírt értékekkel dolgoztam.

3.7. Az SFC és az UHPLC technikák anyagátadási jellemzőinek összehasonlítása

A kísérleteket Agilent 1290 Infinity UHPLC készülék, illetve Waters Acquity UPC² (Waters Corporation, Milford, MA, USA) SFC készülék segítségével végeztük UV-detektálás mellett. A mérések során ugyanazt a teljesen porózus szemcsékkel töltött Agilent Zorbax (100 × 4,6 mm; 3,5 μm szemcseátmérő) oszlopot használtuk mindkét kromatográfias módban. Az injektálási térfogat 2 μL volt, a méréseket 0,2 és 2,5 cm³/perc közötti áramlási sebesség tartományban ismételtük, állandó 35 °C-os oszlophőmérséklet mellett.

A minta alkilbenzolok homológ sorának tagjait (oktil-, decil-, dodecil-, tetradecil-, és oktadecilbenzol) valamint tiokarbamidot tartalmazott 0,2 mg/cm³ koncentrációban. A minta oldószere az UHPLC mérések során metanol, míg az SFC mérések esetén heptán volt. Két mozgófázis összetételt alkalmaztunk az UHPLC mérések során: metanol és víz 97,5:2,5% v/v keverékét valamint tiszta metanolt.

Az SFC mérések során három különböző mérési körülményt alkalmaztunk. Két esetben a mozgófázis tiszta CO₂ volt, míg az ellennyomást 105 illetve 150 bar-ra állítottuk, míg a harmadik esetben mozgófázisként metanol és CO₂ 9:91% v/v keverékét alkalmaztuk alacsony, 105 bar értékű ellennyomás mellett a szubkritikus állapot kialakítása érdekében.

4. Eredmények

4.1. A súrlódási hő hatásának vizsgálata UHPLC oszlopok hatékonyságára

Két különböző típusú, de hasonló geometriájú UHPLC oszlop hatékonyságát vizsgáltuk az oszlopok termosztálása illetve szigetelése mellett. A kutatás eredményeként igazolást nyert, hogy $2\mu\text{m}$ alatti szemcsékkel töltött oszlopokban a mozgófázis diszperziót jelentősen növeli az oszloppal jó hővezető képességéből adódó hővesztés. A mozgó és az állófázis közötti súrlódásból eredő hőáram jelentős – 0,4 és 1,2 közötti – redukált tányérmagasság növekedéshez vezet nagy áramlási sebességek mellett.

A mozgófázisban kialakuló sugárirányú hőmérséklet különbség hasonló mértékű hatékonyságvesztéshez vezet, mint a külső anyagátadási gátlás és az axiális diszperzió együttes hatása az oszlopban.

A vizsgálatok alapján a kialakuló hőmérsékleti különbségek hasonlóak a tömörmagvú és a teljesen porózus töltetű oszlopokban, a súrlódási hő okozta hatékonyság vesztes tekintetében nincs jelentős különbség a különböző töltet típusok között.

4.2. Gyors-kromatográfiás állófázisok hatékonyságának összehasonlítása

Különböző típusú állófázissal, de azonos oszlop geometriával ($2,1 \times 50\text{ mm}$) rendelkező teljesen porózus valamint tömörmagvú szemcsékkel töltött, illetve egy monolit típusú oszlop hatékonyságát határoztuk meg, széles mozgófázis sebesség tartományban kis molekulák segítségével. A vizsgált oszlopok kisebb-nagyobb eltéréssel hasonló, $H = 5\ \mu\text{m}$ körüli tányérmagasság értéket mutatnak az optimális mozgófázis sebesség közelében.

A nemrégiben megjelent monolit típusú GLSciences MonoTower oszlop a töltetes oszlopokhoz hasonló hatékonyságot produkált jelentősen kisebb nyomásesés mellett. Különösen kiemelkedő teljesítményt ($N=11\ 800$) nyújtott kis retenciójú molekulák esetén, köszönhetően annak, hogy a monolit oszlopoknál nincs szükség frittek alkalmazására a töltet rögzítéséhez az oszlopban, emiatt jóval kisebb mértékű keveredés játszódik le az oszlop végein. Ezt bizonyítja, hogy az oszlop végeihez a kereskedelemben is elérhető fritteket illesztve, a töltetes oszlopokhoz hasonló tányérmagasság értékek mérhetőek a vizsgált retenció tartomány egészében.

A mérések alapján a Phenomenex által forgalmazott $2,6\ \mu\text{m}$ -es tömörmagvú szemcsékkel töltött Kinetex és Kinetex EVO oszlopok a kisebb szemcséjű töltetekkel megegyező hatékonyságot produkálnak.

Az oszlopvégek csúcshővezető hatásának vizsgálata oszlopforgatásos módszer segítségével történt. Ennek eredményeként elmondható, hogy az oszlop két végén minden esetben különböző mértékű minta diszperzió figyelhető meg, bár ez a különbség a monolit oszlop esetén szinte elhanyagolható. Oszlopgyártónként eltérő, hogy az oszlop eleje vagy vége mutat jobb hatékonyságot, ami arra enged következtetni, hogy a különböző gyártók eltérő irányból végzik az

oszlopok töltését. Az oszlopvégek hozzájárulása a teljes csúcsvarianciához $0,78 \mu L^2$ és $1,65 \mu L^2$ között van a töltetes állófázisok esetén, míg a monolit oszlopon átlagosan $0,6 \mu L^2$ körüli érték mérhető.

Az oszlopforgatásos mérések során minden esetben kisebb csúcsvariancia mérhető a retenció nélküli tiokarbamid mintára, mint oszlopforgatás nélkül. Ez arra enged következtetni, hogy az oszlop megfordítása során, a mintamolekulák azonos útvonalon haladnak kifelé az oszlopból mint befelé. Ennek következtében az eltérő térfogatú, és így sebességű szemcsék közötti térrészek okozta örvénydiffúzió jelentős része kompenzálódik.

4.3. Makromolekulák szemcsebeli diffúziójának vizsgálata

Az inzulinnal történt mérések alapján kijelenthető, hogy annak ellenére, hogy a tömörmagvú szemcsékkel töltött oszlopokban a szemcsebeli anyagátadás kissé gyorsabb, nincs jelentős különbség a szemcsebeli diffúziós állandókban a teljesen porózus töltetekhez képest.

Az inzulin retenciójának nyomásfüggése miatt, a szemcsebeli diffúzió és így a felületi diffúzió nagysága függ a mozgófázis sebességétől. A kutatás eredményeként kijelenthető, hogy a felületi diffúzió meghatározó szerepe van a molekulák mozgásában az állófázisban. A szemcsék pórusaiban a makromolekulák mozgása erősen gátolt, ennek következtében a pórusdiffúziós együtthatók értéke legalább egy nagyságrenddel kisebb a felületi-diffúziós állandóknál, melynek értéke $D_s=1,59$ és $3,98 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ között alakul a vizsgált oszlopokon a legnagyobb alkalmazott áramlási sebességek mellett.

Jelentős különbség figyelhető meg a teljesen porózus és a tömörmagvú szemcsékre meghatározott pórusdiffúziós állandókban, melynek oka a pórusok eltérő szerkezetéből, különböző tekervényességéből adódhat. Példaként, a teljesen porózus Agilen Zorbax esetén a pórusdiffúzió értéke $D_p=4,72 \times 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$ volt, míg a megegyező szemcseátmérővel rendelkező tömörmagvú töltetes Phenomenex Kinetex Aeris Peptide esetén $D_p=4,48 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$ érték a jellemző.

4.4. Az SFC és az UHPLC technikák anyagátadási jellemzőinek összehasonlítása

Az SFC és az UHPLC technikák összehasonlítása a kromatográfia sztochasztikus modelljének segítségével történt ugyanazon oszlop használatával a két kromatográfias módban. Ez alapján az anyagátadási jellemzők nagy mértékben változnak szuperkritikus-folyadék kromatográfiában köszönhetően a mozgófázis sűrűség áramlási sebesség függésének.

A vizsgálatok alapján a molekulák mozgó és állófázisban eltöltött ideje két fázisátmenet között erősen függ a mozgófázis sebességétől mindkét kromatográfias módban, bár ennek mértéke kifejezőbb SFC esetén. A molekulák mozgófázisbeli tartózkodási ideje $65,3 \text{ ms}$ -ról $1,2 \text{ ms}$ -ra, míg az állófázisbeli tartózkodási idők $804,9 \text{ ms}$ -ról $6,0 \text{ ms}$ -re csökkennek az áramlási sebesség növelésével kis ellennyomás alkalmazása esetén.

A molekulák állófázisban eltöltött ideje egy adszorpciós/deszorpciós lépés között SFC esetén nagyjából a másfélszerese az UHPLC esetén számítottak az optimális áramlási sebességek mellett, míg a fázis átmenetek száma nagyjából megegyező. A mozgófázisbeli tartózkodási idők hasonló értéket vesznek fel nagy áramlási sebességek mellett, ahogy a mozgófázis sűrűsége és így az átlagos fázisarány egyre hasonlóbb lesz a két kromatográfiás módban.

A mérések alapján a mozgófázisbeli tartózkodási idők kevésbé, míg az állófázisban eltöltött idők jelentősen függenek az alkalmazott mozgófázis összetételtől és az ellennyomástól. A mérések hatékonyságát legjobban a fázisátmenetek száma határozza meg a kísérletek alapján, melynek értéke $n = 15\,000$ és $20\,000$ között volt nagy áramlási sebességek mellett mindkét kromatográfiás módban. Összességében kijelenthető, hogy nagy mozgófázis sebességek mellett a sztochasztikus modell segítségével meghatározott anyagátadási együtthatók értékei hasonlóak SFC és UHPLC esetén.

5. Tézispontok

1. Munkám során vizsgáltam az UHPLC oszlopokban megjelenő súrlódási hő okozta hatékonyságvesztés mértékét, a különböző csúcsszélesítő hatások azonosításával, meghatározásával és kivonásával a kísérletesen meghatározott csúcsok varianciájából. Ez alapján megállapítottam, hogy a nagy mozgófázis sebességek mellett megjelenő hőmérsékletbeli eltérések, hasonló mértékű csúcsszélesedést okoznak, mint az axiális diszperzió és a külső anyagátadási gátlás együttes hatásából eredő csúcsszélesedés.
2. Meghatároztam különböző gyártóktól származó töltetes és monolit típusú gyors-kromatográfias oszlopok hatékonyságát valamint az oszlopvégek csúcsszélesítő hatását, és azt találtam, hogy a töltetes oszlopok lokális hatékonysága az oszlop két végének közelében eltér egymástól, valamint a töltetágyat általában jellemző hatékonyságtól. Ez az oszloptöltés folyamata során kialakuló töltet heterogenitásból, illetve az oszlopokat lezáró frittek hatásából adódik.

Munkám során azt tapasztaltam, hogy a monolit típusú GLSciences MonoTower oszlop kiemelkedő teljesítményt nyújt kis retenciójú mintakomponensek esetén, köszönhetően a frittek hiánya miatt kisebb mértékben megjelenő mozgófázis diszperzióknak.

3. Összehasonlítottam a teljesen porózus és a tömörmagvú oszlopokon megjelenő szemcsebeli anyagátadási jellemzőket, a mozgófázisbeli diszperzió és a külső anyagátadási gátlás csúcsszélesítő hatásának becslésével és levonásával az oszlopokon inzulinnal mért csúcsvarianciák értékeiből. Ez alapján megállapítottam, hogy makromolekulák esetén a pórusdiffúzió és a felületi-diffúzió együttes hatásaként megadható szemcsebeli diffúzió kialakításában, a molekulák adszorbeált állapotában történő felületi diffúziójának van meghatározó szerepe.
4. Eredményeim alapján kijelenthető, hogy a kromatográfia sztochasztikus modellje alapján hasonló anyagátadási jellemzők figyelhetők meg a szuperkritikus-folyadék kromatográfiában és a fordított fázisú kromatográfiában nagy mozgófázis sebességek mellett. Mindamelllett a mozgófázis sűrűségének változása az alkalmazott áramlási sebesség függvényében, a meghatározott anyagátadási együtthatók, így a fázisátmenetek számának, illetve a mozgó és az állófázisban történő tartózkodási idők nagymértékű változását is okozza. Ez különösen abban az esetben volt jelentős ha az elválasztás során olyan körülményeket alkalmaztam ami közel esett a mozgófázis szuperkritikus pontjához.

6. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Nándor Lambert, Miyazaki Shota, Ohira Masayoshi, Tanaka Nobuo, Attila Felinger
Comparison of the kinetic performance of different columns for fast liquid chromatography, emphasizing the contributions of column end structure
Journal of Chromatography A 1473: pp. 99-108. (2016) IF=3.981

Nándor Lambert, Attila Felinger
Performance of the same column in supercritical fluid chromatography and in liquid chromatography
Journal of Chromatography A 1409: pp. 234-240. (2015) IF=3.926

Nándor Lambert, Ibolya Kiss, Attila Felinger
Mass-transfer properties of insulin on coreshell and fullyporous stationary phases
Journal of Chromatography A 1366: pp. 84-91. (2014) IF=4.169

6.1. Konferencia részvételek

Poszter prezentációk

HPLC 2011

36th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Budapest, Hungary, June 19-23, 2011

Nándor Lambert, Attila Felinger

Study of Axial Dispersion with Peak Parking in Different Columns

ISSSB 2011

11th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Austria, Graz, September 18-28, 2011

Nándor Lambert, Attila Felinger

Study of axial dispersion with peak parking

ISSSB 2012

12th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Cluj-Napoca July 4-14, 2012

Nándor Lambert, Attila Felinger

Mass-transfer kinetics of biomolecules in chromatographic columns with porous or coreshell packing materials

MSB 2012

27th International Symposium on MicroScale Bioseparations and Analyses, Geneva, Switzerland, February 12–15, 2012

Nándor Lambert, Attila Felinger

Study of the effective diffusion in coreshell packed columns under stagnant conditions

HPLC 2013

39th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques, Amsterdam, The Netherlands, June 16-20, 2013

Nándor Lambert, Attila Felinger

Stochastic analysis of mass-transfer properties in Supercritical Fluid Chromatography and in Liquid Chromatography

MSB 2014

30th International Symposium on MicroScale Bioseparations and Analyses, Pécs, Hungary, April 27 - May 1, 2014

Nándor Lambert, Attila Felinger

Evaluation of the mass-transfer properties in chromatographic columns packed with sub-2- μm particles

ISC 2014

30th International Symposium on Chromatography, Salzburg, Austria, September 14-18, 2014,

Nándor Lambert, Attila Felinger

The effect of the frictional heat in chromatographic columns packed with sub-2- μm particles

BS 2015

11th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok, Hungary, September 2-4, 2015,

Nándor Lambert, Attila Felinger, Shota Miyazaki, Masayoshi Ohira, Nobuo Tanaka

Comparison of the kinetic performance of different packing materials for fast liquid chromatography

HPLC 2017

45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Prague, Czech Republic June 18-22, 2017

Nándor Lambert, Attila Felinger.

Analysis of the mass-transfer properties in chromatographic columns using total pore blocking method

Konferencia előadások

CECE 2013

10th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, Pécs, Hungary, April 25-27, 2013

Nándor Lambert, Attila Felinger

Comparison of overall mass-transfer coefficients of Supercritical Fluid Chromatography and Liquid Chromatography

IDK 2013

9th János Szentágothai Interdisciplinary Conference 2013, Pécs Hungary, May 3-4, 2013

Nándor Lambert, Attila Felinger

Determination of overall mass-transfer coefficients in Supercritical Fluid Chromatography and in Liquid Chromatography

IDC 2014

Interdisciplinary Doctoral Conference 2014, Pécs, Hungary, April 15-17, 2014

Nándor Lambert, Attila Felinger

Evaluation of the mass-transfer properties in liquid chromatographic columns

BS 2017

12th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok, Hungary, September 6-8 , 2017 Nándor Lambert , Dóra Zelenyánszki, Attila Felinger

Characterization of Stationary Phases for Fast Liquid Chromatography

Hivatkozások

- [1] K. J. Fountain, U. D. Neue, E. S. Grumbach, D. M. Diehl, Effects of extra-column band spreading, liquid chromatography system operating pressure, and column temperature on the performance of sub-2- μ m porous particles, *Journal of Chromatography A* 1216 (32) (2009) 5979–5988.
- [2] J. Mazzeo, U. Neue, M. Kele, R. Plumb, A new separation technique takes advantage of sub-2- μ m porous particles, *Analytical Chemistry* 77 (23) (2005) 460–467.
- [3] T. H. Walter, R. W. Andrews, Recent innovations in uhplc columns and instrumentation, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 63 (2014) 14–20.
- [4] J. De Vos, K. Broeckhoven, S. Eeltink, Advances in ultrahigh-pressure liquid chromatography technology and system design, *Analytical Chemistry* 88 (2016) 262–278.
- [5] G. Guiochon, A. Felinger, D. G. Shirazi, A. M. Katti, *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, Academic Press, Amsterdam, The Netherlands, 2006.
- [6] F. Gritti, G. Guiochon, Comparison of heat friction effects in narrow-bore columns packed with core–shell and totally porous particles, *Chemical Engineering Science* 65 (2010) 6310–6319.
- [7] F. Gritti, G. Guiochon, Performance of columns packed with the new shell kinetex-c18 particles in gradient elution chromatography, *Journal Chromatography A* 1217 (2010) 1604–1615.
- [8] F. Gritti, I. Leonardis, J. Abia, G. Guiochon, Physical properties and structure of fine core–shell particles used as packing materials for chromatography: Relationships between particle characteristics and column performance, *Journal Chromatography A* 1217 (2010) 3819–3843.
- [9] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, Effect of domain size on the performance of octadecylsilylated continuous porous silica columns in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 797 (1–2) (1998) 121–131.
- [10] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, Effect of skeleton size on the performance of octadecylsilylated continuous porous silica columns in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 762 (1–2) (1997) 135–146.
- [11] F. Gritti, W. Piatkowski, G. Guiochon, Study of the mass transfer kinetics in a monolithic column, *Journal of Chromatography A* 983 (1–2) (2003) 51–71.
- [12] G. Guiochon, Monolithic columns in high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1168 (1–2) (2007) 101–168.
- [13] N. Tanaka, D. V. McCalley, Core–shell, ultrasmall particles, monoliths, and other support materials in high-performance liquid chromatography, *Analytical Chemistry* 88 (2016) 279–298.

- [14] J. Giddings, *Dynamics of Chromatography, Part I: Principles and Theory*, Marcel Dekker, New York, 1965.
- [15] Y. Ma, A. W. Chassy, S. Miyazaki, M. Motokawa, K. Morisato, H. Uzu, M. Ohira, M. Furuno, K. Nakanishi, H. Minakuchi, K. Mriziq, T. Farkas, O. Fiehn, N. Tanaka, Efficiency of short, small-diameter columns for reversed-phase liquid chromatography under practical operating conditions, *Journal of Chromatography A* 1383 (2015) 47–57.
- [16] C. J. Giddings, H. Eyring., Molecular dynamic theory of chromatography, *Journal of Physical Chemistry*. 59 (1955) 416–421.
- [17] G. Kennedy, J. Knox, Performance of Packings in high performance liquid chromatography (HPLC) .1. porous and surface layered supports, *Journal of Chromatographic Science* 10 (9) (1972) 549.
- [18] G. Mayr, T. Welsch, Influence of viscous heat dissipation on efficiency in high-speed high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 845 (1–2) (1999) 155–163.
- [19] K. Broeckhoven, J. Billen, M. Verstraeten, K. Choikhet, M. Dittmann, G. Rozing, G. Desmet, Towards a solution for viscous heating in ultra-high pressure liquid chromatography using intermediate cooling, *Journal of Chromatography A* 1217 (13) (2010) 2022–2031.
- [20] F. Szabolcs, J. Fekete, D. Guillarme, Estimation of the effects of longitudinal temperature gradients caused by frictional heating on the solute retention using fully porous and superficially porous sub-2 μm materials, *Journal of Chromatography A* 1359 (2014) 124–130.
- [21] M. Saito, History of supercritical fluid chromatography: Instrumental development, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 115 (2013) 590–599.
- [22] F. Gritti, G. Guiochon, Effect of methanol concentration on the speed-resolution properties in adiabatic supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1314 (2013) 255–265.
- [23] K. Kaczmarski, D. P. Poe, A. Tarafder, G. Guiochon, Pressure, temperature and density drops along supercritical fluid chromatography columns. II. theoretical simulation for neat carbon dioxide and columns packed with 3- μm particles, *Journal of Chromatography A* 1250 (2012) 115–123.
- [24] A. G.-G. Perrenoud, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, The use of columns packed with sub-2- μm particles in supercritical fluid chromatography, *TrAC Trends Analytical Chemistry* 63 (2014) 44–54.
- [25] P. Vajda, G. Guiochon, Determination of the column hold-up volume in supercritical fluid chromatography using nitrous-oxide, *Journal of Chromatography A* 1309 (2013) 96–100.
- [26] P. Vajda, G. Guiochon, Modifier adsorption in supercritical fluid chromatography onto silica surface, *Journal of Chromatography A* 1305 (2013) 293–299.

- [27] A. Tarafder, P. Vajda, G. Guiochon, Accurate on-line mass flow measurements in supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1320 (2013) 130–137.
- [28] E. Lesellier, Retention mechanisms in super/subcritical fluid chromatography on packed columns, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 1881–1890.
- [29] K. Kaczmarski, D. P. Poe, A. Tarafder, G. Guiochon, Efficiency of supercritical fluid chromatography columns in different thermal environments, *Journal of Chromatography A* 1291 (2013) 155–173.
- [30] M. Le'ko, D. P. Poe, K. Kaczmarski, Modelling of retention in analytical supercritical fluid chromatography for CO₂–methanol mobile phase, *Journal of Chromatography A* 1305 (2013) 285–292.
- [31] A. Tarafder, K. Kaczmarski, M. Ranger, D. P. Poe, G. Guiochon, Use of the isopycnic plots in designing operations of supercritical fluid chromatography: IV. pressure and density drops along columns, *Journal of Chromatography A* 1238 (2012) 132–145.
- [32] F. Dondi, A. Cavazzini, M. Remelli, A. Felinger, M. Martin, Stochastic theory of size exclusion chromatography by the characteristic function approach, *Journal of Chromatography A* 943 (2) (2002) 185–207.
- [33] A. Felinger, Molecular movement in an HPLC column: A stochastic analysis, *LC–GC North America* 22 (2004) 642.
- [34] A. Felinger, Molecular dynamic theories in chromatography, *Journal of Chromatography A* 1184 (1-2) (2008) 20–41.
- [35] L. Pasti, A. Cavazzini, M. Nassi, F. Dondi, Dynamic chromatography: A stochastic approach, *Journal of Chromatography A* 1217 (7) (2010) 1000–1009.
- [36] K. Miyabe, Surface diffusion in reversed-phase liquid chromatography using silica gel stationary phases of different {C1} and {C18} ligand densities, *Journal Chromatography A* 1167 (2) (2007) 161–170.
- [37] K. Miyabe, G. Guiochon, Correlation between surface diffusion and molecular diffusion in reversed-phase liquid chromatography, *Journal Physical Chemistry B* 105 (2001) 9202–9209.
- [38] I. Bacskay, A. Sepsey, A. Felinger, Determination of the pore size distribution of high-performance liquid chromatography stationary phases via inverse size exclusion chromatography, *Journal Chromatography A* 1339 (2014) 110–117.