

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

**Gyors folyadékkromatográfiás fordított fázisú
állófázisok kémiai és kinetikai jellemzése**

PhD értekezés

Zelenyánszki Dóra

Témavezető:

Dr. Felinger Attila

egyetemi tanár



PÉCS, 2021

Tartalom

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	7
3. Célkitűzések	9
4. Gyors folyadékkromatográfia létrejötte – állófázisok és készülékek fejlődése	11
4.1. Töltetek fejlődése	12
4.1.1. Szilikagél alapú állófázisok	12
4.1.2. Állófázisok típusai	15
4.1.2.1. Teljesen porózus töltetek	15
4.1.2.2. Héjszerkezetű (tömörmagvú) töltetek	16
4.1.2.3. Monolit típusú állófázisok	17
4.2. Folyadékkromatográfias készülékek fejlődése	18
5. Állófázisok kémiai jellemzése	19
5.1. A Tanaka-teszt	21
5.1.1. A hidrofób retenció (alkilláncok mennyisége)	21
5.1.2. A felületi borítottság (hidrofobicitás)	22
5.1.3. Alakszelektivitás	22
5.1.4. Hidrogénkötő kapacitás	22
5.1.5. A szilanolhatás	23
6. A kromatográfias oszlop heterogenitásának és kialakításának hatása a hatékonyságra	25
6.1. Az oszlopon létrejövő sávszélesedés	26
6.2. Az oszlopon kívüli sávszélesedés	30
6.3. Oszlopforgatás	31
6.3.1. A módszer	31
6.3.2. Elméleti háttér	31
7. Kísérleti körülmények	34
7.1. Állófázisok kémiai jellemzése – Tanaka-teszt	34
7.1.1. Készülék	34
7.1.2. Oszlopok	34
7.1.2.1. GL Sciences InertSustain C ₁₈ és InertSustainSwift C ₁₈	34
7.1.2.2. GL Sciences InertCore C ₁₈ , Phenomenex Kinetex C ₁₈ és Kinetex EVO C ₁₈	34
7.1.2.3. GL Sciences Monotower C ₁₈	36
7.1.3. Felhasznált vegyszerek	36
7.1.4. Alkalmazott mérési paraméterek	39

7.1.4.1.	A hidrogénkötő kapacitás mérésének módszere	39
7.1.4.2.	Módszer a hidrofobicitás, a sztérikus szelektivitás és az alkilláncok mennyiségének mérésére.....	39
7.1.4.3.	A szilanol hatás mérésének módszere	39
7.2.	A kromatográfiás oszlop heterogenitásának és kialakításának hatása a hatékonyságra – Oszlopforgatás	40
7.2.1.	Az oszloptöltés hatása a töltetheterogenításra – mérési körülmények....	40
7.2.2.	Oszlopforgatásos mérések kivitelezése a pórusok hatásának kizárásával – mérési körülmények.....	41
7.2.2.1.	Taylor-Aris diszperzió makromolekulák esetén	41
7.2.3.	Számítások alapja az oszlopforgatásos mérések esetében.....	43
7.3.	Elektronmikroszkópos vizsgálatok.....	43
8.	Eredmények és megvitatásuk	44
8.1.	A Tanaka-teszt eredményei és a szilanolhatás vizsgálatának eredményei....	44
8.2.	Az oszlopforgatás eredményei.....	56
8.2.1.	Az oszloptöltés hatása a töltetheterogenításra	56
8.2.2.	Oszlopforgatás kivitelezése a pórusok hatásának kizárásával	64
8.3.	Elektronmikroszkópos vizsgálatok eredményei.....	68
9.	Összefoglalás.....	69
9.1.	Állófázisok kémiai jellemzése	69
9.2.	Az oszlopforgatás	70
9.2.1.	A kromatográfiás oszlop heterogenitásának és kialakításának hatása a hatékonyságra	70
9.2.2.	Oszlopforgatásos mérések kivitelezése a pórusok hatásának kizárásával	71
9.3.	Vizsgálatok elektronmikroszkóppal.....	72
10.	Tézispontok	73
	Megjelent közlemények	76
	A PhD értekezés alapjául szolgáló publikációk	76
	A PhD értekezés témájában készült nem referált konferencia absztraktok	77
	A PhD értekezés témáján kívül készült nem referált konferencia absztraktok	80
	Köszönetnyilvánítás	81
	Irodalomjegyzék.....	82

1. Rövidítések jegyzéke

A	A-tag a van Deemter, Knox és Giddings-egyenletben
B	B- tag a van Deemter, Knox és Giddings-egyenletben
C	C- tag a van Deemter, Knox és Giddings-egyenletben
D_{eff}	effektív diffúziós együttható
D_m	molekuláris diffúziós együttható
D_L	axiális diffúziós együttható
D_p	pórusbeli diffúziós együttható
d_p	szemcseátmérő
E	E-tag a Giddings-egyenletben
F	fázisarány
F_v	áramlási sebesség
H	elméleti tányérmagasság
H_{ext}	a külső anyagátadási gátlás hozzájárulása az elméleti tányérmagassághoz
H_L	az axiális diszperzió hozzájárulása az elméleti tányérmagassághoz
H_{min}	elérhető legkisebb elméleti tányérmagasság
H_p	a pórusbeli diffúzió hozzájárulása az elméleti tányérmagassághoz
h	redukált tányérmagasság
h_{min}	elérhető legkisebb redukált tányérmagasság
k	retenciós tényező
k_{AB}	hidrofób retenció (alkilláncok mennyiségére utaló retenciós érték)
K	adszorpciós egyensúlyi állandó
k_{ext}	külső (szemcsefelületi) sebességi állandó
L	oszlophossz
M_w	molekuláris tömeg
N	elméleti tányérszám
T	abszolút hőmérséklet
t_R	retenciós idő
t_0	holtidő
t_p	parkolási idő a csúcsparkoltatásos méréseknél

u_0	a mozgófázis szabad keresztmetszeti felületre vonatkoztatott lineáris sebessége
u_h	a mozgófázis intersticiális, azaz a szemcsék közötti sebessége
V_R	retenciós térfogat
BEH	ethylene bridged hybrid
FIB SEM	kétsugaras pásztázó elektronmikroszkóp (Focussed Ion Beam Scanning Electron Microscope)
FTIR	Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia
GRM	általános sebességi modell, General rate model
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
LC	folyadékkromatográfia
LC-MS	folyadékkromatográf-tömegspektrométer
MS	tömegspektrométer
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia
SEM	pásztázó elektronmikroszkóp (Scanning Electron Microscope)
UHPLC	ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
USP T_f	aszimmetria érték (USP tailing factor)
vHPLC	gyorsfolyadékkromatográfia
α	elválasztási tényező
$\alpha_{(CH_2)}$	felületi borítottság
$\alpha_{t/o}$	sztérikus szelektivitás
$\alpha_{C/P}$	H-hidas kötéskapacitás
γ	obstrukciós (tortuozitási) faktor
ΔP	nyomásesés
ϵ_e	külső térkitöltési tényező
ϵ_p	belső térkitöltési tényező
η	dinamikai viszkozitás
θ	állófázis áramlási ellenállása
μ_1	kromatográfias csúcs első abszolút momentuma
μ_2'	a kromatográfias csúcs második centrális momentuma

v	redukált mozgófázis sebesség
σ^2	csúcsvariancia
σ^2_t	időbeli variancia
σ^2_v	térfogatbeli variancia
σ^2_z	hosszirányú variancia
σ^2_{total}	teljes csúcsvariancia
σ^2_{park}	parkolásból eredő csúcsszélesedés
σ^2_{system}	rendszer csúcsszélesítő hatása
σ^2_{bed}	töltetágy csúcsszélesítő hatása
σ^2_{end}	oszlopvégek csúcsszélesítő hatása

2. Bevezetés

Az interdiszciplináris tudományok egyik legújabb és legdinamikusabban fejlődő területeként ismeretes az elválasztástudomány. Az analitikai, vagy preparatív elválasztástechnikai módszerek a tudományos kutatás és az ipar szinte valamennyi területén érvényesülnek.

Az elválasztástechnikai eljárások közül az egyik leggyakrabban alkalmazott analitikai módszerré vált a folyadékkromatográfia (LC), mind a kutatás, mind a rutinvizsgálatok során. Az utóbbi évek során számos technikai fejlesztésnek köszönhetően az eddig elérhető nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) készülékek mellett egyre nagyobb teret nyert az ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (UHPLC) készülékek használata is. Az alapvető különbség a két műszer között, hogy míg a HPLC-nél a felső nyomás korlátja 400 bar volt, addig az UHPLC készülékek 1000-1200 barig is üzemelnek.

A nyomásesés a kolonnán a következő összefüggéssel írható le:

$$\Delta P = \frac{\eta L v}{\theta d_p^2} \quad 2.1.$$

ahol η a mozgófázis viszkozitása, L a kolonna hossza, v az áramlási sebesség, θ az állófázis áramlási ellenállása, d_p pedig a töltet szemcseátmérője.

A 2.1. egyenlet (Darcy-törvény) alapján jól látható, hogy ha kisebb szemcseátmérőjű ún. szub-2 μm (2 μm alatti) tölteteket használunk, akkor a nyomás növekedni fog, ennek mérséklése érdekében UHPLC-s rendszereknél általában 2,1 mm belső átmérőjű és rövid (5 cm hosszú) folyadékkromatográfiás oszlopokat használnak (1-4).

Így az elemzési idő is csökkenthető az elválasztások során a rövidebb oszlopkialakítás és az alkalmazható magasabb optimális lineáris sebességeknek köszönhetően, emellett azonban az oszlop hatékonysága nem feltétlenül nő. Az elválasztás hatékonyságának növelése érdekében hosszabb oszlopokra van szükség, melyek használata magasabb elméleti tányérszámot eredményez, de ebben az esetben ismét számolnunk kell a nyomás, illetve a mozgófázis súrlódási hőjének növekedésével, így az oszlop és a készülék korlátaival (5-7).

A készülékek fejlődésével párhuzamosan az állófázisok területén is folyamatos újításokkal állnak elő a gyártók a felhasználók igényeinek kielégítésére.

A részecskeméretetek folyamatos csökkentése mellett fontos megemlíteni, hogy a nem-porózus, a perfúziós (8) és a teljesen porózus töltetek mellett megjelentek a héjszerkezetű (mag-héj) és az monolit típusú állófázisok is (9-10).

Az állófázisok szerkezetének fejlődése mellett nagy hangsúlyt fektetnek még arra, hogy a töltetek szélesebb pH tartományban is használhatóak legyenek, erre a célra először a Waters fejlesztett olyan szilikagél alapú állófázist (XTerra), amely a vázában metilencsoportokat is tartalmazott (5). Ezek az oszlopok bázikus körülmények között sokkal stabilabbnak bizonyultak, mint a korábbi szilikagélek. Később szintén a Waters használt etilénnel kapcsolt trietoxi-szilánt a szol-gél kialakításához. Ezeket az oszlopokat XBridge néven hozták forgalomba (5).

Kirkland és munkatársai két szomszédos szilanolcsoport segítségével egy speciális kötésű fázist fejlesztettek ki (11). Ezt a terméket az Agilent Technologies Zorbax Extend néven forgalmazza és számos oszlopkonfigurációban kapható. A Phenomenex is kifejlesztett egy eljárást, hogy állófázisaik kiterjesztett pH tartományon belül is alkalmazhatóak legyenek. A szilikagél gyártásának utolsó szakaszában egy szerves réteggel új kompozit részecskét hoznak létre. Így a részecske mechanikai szilárdsága és hatékonysága megmarad, miközben a szerves héj megvédi a részecskét.

Az is fontos fejlesztési szempont volt, hogy bázikus vegyületek elválasztása is lehetséges legyen fordított folyadékkromatográfiai körülmények között. Ehhez ma már rendelkezésünkre állnak az ún. bázis-deaktivált fordított fázisú állófázisok, melyeknél a szilikagél felületi módosítása során hátramaradt szabad szilanolcsoportok számát utószilanizálással (end capping eljárással) csökkentik minimálisra (12).

3. Célkitűzések

Számos módszer létezik folyadékkromatográfiai állófázisok kémiai jellemzésére. Munkám első részeként különböző típusú fordított fázisú C₁₈-as (teljesen porózus, héjszerkezetű és monolit) gyorsfolyadékkromatográfiai állófázisok tulajdonságainak vizsgálata volt a cél, különös tekintettel a szilanolhatásra.

Kutatási céljaim ezen területen a következőképpen írhatóak le:

1. Minden egyes oszlop esetén a Tanaka-teszt lépéseit követve meghatározzuk az állófázison a hidrofób retenciót (k_{AB}), a felületi borítottságot ($\alpha_{(CH_2)}$), a sztérikus szelektivitást ($\alpha_{t/o}$) és a H-hidas kötésekre való hajlamot ($\alpha_{C/P}$).
2. Az állófázisokon visszamaradt szilanolcsoportok hatása különböző tesztvegyületek segítségével vizsgálható. A hagyományos tesztek esetén egyre jobb eredményeket produkálnak ezek az új típusú, bázis-deaktivált (base-deactivated) állófázisok, éppen ezért érdemes több tesztkomponenst kiválasztani a vizsgálatok során, amelyek érzékenyebbek a szilanolcsoportokra. A retenció (k) és aszimmetria ($USP T_f$) értékeket mindegyik oszlop esetében meghatározásra kerülnek.
3. A kapott értékek alapján összehasonlítom a különböző típusú állófázisokat.

További munkám során ugyancsak gyorsfolyadékkromatográfiai oszlopok vizsgálatát folytatom, viszont más aspektusból. Ezúttal az oszlopok kialakításának, töltésének a hatását vizsgálom a folyadékkromatográfiai elválasztás hatékonyságára és a töltetanyag heterogenitására.

4. 3-3 teljesen (5, 10, 15 cm) porózus és héjszerkezetű töltettel rendelkező oszlopot vizsgállok oszlopforgatásos módszer segítségével:
 - első lépésként az oszlopok hatékonyságának vizsgálata (H_{min}), az optimális áramlási sebesség meghatározása
 - a mintakomponens (kismolekula) diffúziós együtthatójának megállapítása „peak parking”, vagyis csúcsparkoltatásos/megállított áramlásos módszerrel

- oszlopforgatásos mérések elvégzése az oszlopok különböző „szeleteinél”
 - a csúcsszélesítő hatások összevetése a különböző oszlopok esetében (töltetagy heterogenitása, oszlopvégek hatása)
 - összefüggést keresek az oszloptöltés hatása és a töltetagy heterogenitása között
5. Héjszerkezetű oszlop esetében vizsgálni fogom, hogy az oszlopforgatásos módszer kivitelezhető-e nagy molekulákkal is. Ezzel ki tudnám zárni a pórusokon belüli diffúzió hatását a csúcsszélesedésre.
6. Korábban már használt oszlopok fritjeit fogom vizsgálni elektronmikroszkóppal, hogy kiderítsem van-e bármilyen roncsoló hatása a töltésnek a fritek szerkezetére és a szemcsék épségére.

4. Gyors folyadékkromatográfia létrejötte – állófázisok és készülékek fejlődése

A folyadékkromatográfia műszerezettségének kialakulása az 1960-70-es évekre tehető (13-14). Ekkor már elérhetőek voltak az 5 μm szemcseátmérőjű töltetek, melyek már gömbszimmetrikus szilikagél alapú részecskékkel rendelkeztek, a korábbi szabálytalan szemcséjű állófázisokhoz képest (15). Ez idő tájt terjedtek el a 4,6 mm átmérőjű kolonnák, melyek 15 vagy 25 cm hosszúak voltak. A folyadékkromatográfia műszerezettsége is az ilyen paraméterű kolonnák igényeihez volt igazítva. Ezáltal az akkori mintaadagolási térfogat 10-100 μl közé esett, a detektorok cellatérfogata 10 μl , az összekötő kapillárisok belső átmérője pedig 0,25 mm volt.

Ezek után hosszú ideig inkább csak a számítógépes vezérlésben és az adatgyűjtés területén történtek fejlesztések, míg nem egyre nagyobb lett az igény arra, hogy a mérések reprodukálhatósága terén is javulás mutakozzon. A reprodukálhatóságot nehezítette, hogy a fordított fázisú szilikagél alapú állófázisok magasabb fémion tartalommal rendelkeztek és viszonylag magas szilanol aktivitást is mutattak a kismértékű borítottságuk miatt. Emellett a kolonnák felületi, fizikai-kémiai tulajdonságai is szarzsra változtak. Így újfent előtérbe került a kolonnatechnológia fejlesztésének kérdése.

Ezeket a fejlesztéseket a 1990-es évek végére, 2000-es évek elejére sikerült is megvalósítani. Megjelentek az 5 μm szemcseátmérőjű alatti töltetek. Használatuk során a kromatográfias csúcsok szélessége is jelentősen csökkent, ezáltal nőtt a technika hatékonysága is, így nőtt a kolonnák csúcselektív kapacitása is.

Ebben az esetben még HPLC készülékekről beszélünk, melyeknek a felső nyomástartomány 400 bar körüli. Az elemzési idők mintától függően 5-60 percesek voltak, még viszonylag nagy csúcselektív értékek mellett.

Következő lépésként jelentek meg a gyorsabb kromatográfias módszerek iránt az igények, ahol kisebb sávcszélesedési értékek érhetőek el.

Ezt a célt többféleképpen lehetett megvalósítani. Az egyik ilyen opció a kolonnaátmérők, illetve a szemcseátmérők további csökkentése volt. Ezáltal ma

már elérhetőek az ún. szub-2 μm -es állófázisok is. A másik lehetőség a hőmérséklet növelése volt az elválasztások során, illetve a harmadik fejlesztési mód a nagyobb permeabilitású kolonnák kifejlesztése volt. Így jelentek meg a héjszerkezetű (tömörmagvú) és monolit típusú állófázisok.

A 2 μm alatti töltetek megjelenése és a magasabb hőmérséklet alkalmazása viszont megkövetelte a készülékek újítását is (16-17).

4.1. Töltetek fejlődése

Kezdetben a folyadékkromatográfias mérések adszorpción (18) vagy folyadék-folyadék (19) megoszláson alapultak, melyekhez szabálytalan alakú, nagy szemcseátmérőjű tölteteket használtak. Ahogy már említésre került, az 1970-es évektől jelentek meg a kisebb szemcseátmérőjű szilikagél állófázisok, majd pedig a szilikagél alapú, de kémiaailag módosított felületű fordított fázisú állófázisok, melyeken különböző hidrofób jellegű csoportok biztosítják az elválasztást, ezzel kiküszöbölve a folyadék-folyadék megoszlásos kromatográfia több problémáját is (15).

Mára az ilyen típusú fordított fázisú töltetek lettek a legelterjedtebbek a gyakorlatban (90%-os részarány), így dolgozatomban is csak ilyen típusú állófázisok vizsgálatáról ejtek majd szót, közöttük is az ún. C_{18} -as, oktadeciláncsal módosított felületű szilikagél alapú töltetekről.

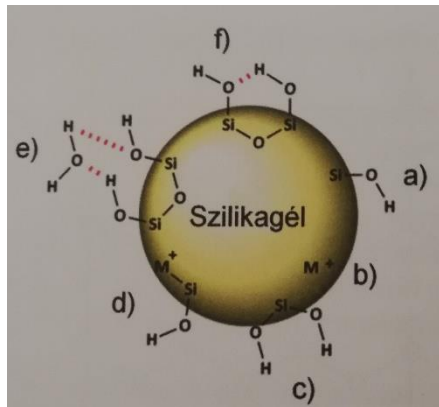
4.1.1. Szilikagél alapú állófázisok

A kromatográfias célokra használt szilikagélek porózus szerkezetűek, ennek köszönhetően nagy a fajlagos felületük (akár $500 \text{ m}^2/\text{g}$), mely kedvez az adszorpció kölcsönhatásoknak és emellett nyomásállóságuk is alkalmassá teszi őket a HPLC-s mérések során kialakult nagy nyomásesés tűrésére. Azt is meg kell említeni, hogy az oldószerek összetételének változtatásának hatására nem duzzadnak meg, így alkalmasak gradiens elúciós elválasztásokra is.

A szilikagél előállításának körülményei nagyban befolyásolják annak porozitását és a felületi tulajdonságait (20).

Az elválasztás során a retenciós mechanizmust a szilikagél felületén a szilanolcsoportok befolyásolják, de amint kémiaailag módosított felületű fordított fázisú szilikagélekről beszélünk, esetükben a felületi borítottság mértéke, a fajlagos felület és a porozitás lesz a meghatározó (21).

A kromatográfiai elválasztásokra a hidratált felületű szilikagél a legalkalmasabb, mely felületén szilanol (-Si-OH) és sziloxán (-Si-O-Si-) csoportok is előfordulnak.



1. ábra: A szilikagél felületén található szilanolcsoportok (17)

A szilícium atomhoz egy vagy két szilanolcsoport (1.ábra/ c) is kapcsolódhat (geminális helyzet), bár a két szilanolcsoport kapcsolódását még nem sikerült eddig egyértelműen bizonyítani (17). Két szilícium atom távolsága, melyek egy-egy szilanolcsoportot tartalmaznak, befolyásolja a csoportok aktivitását. Ha olyan geometriai helyzetben vannak, hogy nem lehetséges a H-hidas kölcsönhatás, akkor beszélünk izolált vagy szabad szilanolcsoportokról (1. ábra/ a). Ha a két szilanolcsoport tud H-hidas kötést létesíteni, akkor vicinális szilanolcsoportokról beszélhetünk (1. ábra/ f).

Ha a szilanolcsoportok vízzel hoznak létre H-hidas kötést, akkor ezeket dezaktivált szilanolcsoportoknak nevezzük (1. ábra/ e). A szilikagélbe beépülő féimonok az 1. ábra b) és d) helyein láthatóak. Ha szilanolcsoport közelében vannak (1. ábra/ d), akkor polarizálják az elektroneloszlást, így a proton könnyebben disszociálódik a szilanolcsoportból, így savas szilanolcsoport jön létre. Az ún. szilanolát (Si-O⁻) kationcserélő helyként funkcionál ebben az esetben (17), (22).

A szilikagéleket a szilanolcsoportjaikon keresztül módosítják leggyakrabban szilanilázási reakcióval.

A fordított fázisú kromatográfiában leggyakrabban -C₂,...-C₃₀ szénláncokat visznek fel a szilikagél felületére. A legelterjedtebb ezek közül az oktadecilcsoporttal módosított szilikagél csoportja. Ezek mellett azonban még számos, nem alkilánccal módosított szilikagél alapú állófázis is létezik, jellemzően fenil,

pentafluorozott-fenil és ciano fázisok, illetve poláris csoportot is tartalmazó alkil módosítású, polimer módosítású és átmeneti módosítású fázisok is.

A szénlánc kapcsolásához a szilanizálási reakciót hagyományos esetben monofunkciós klór-szilánokkal valósítják meg, mely során sósav kilépése közben a kívánt alkil-csoport a szilanolcsoportra köthető (17). Ez a reakció hozzávetőleg 40-50%-os hatékonysággal valósítható meg, mivel a felületre felvitt ligandumok árnyékolják a fennmaradó szabad szilanolcsoportokat. Ezek a szabad szilanolcsoportok erősen befolyásolni fogják a kromatográfiás elválasztást, mivel erősebb kölcsönhatást tudnak kialakítani (H-hidas), mint a hidrofób pl. oktadecil alkilcsoportok (diszperziós).

A nem reagált szilanolcsoportok számának csökkentésére utószilanizálási reakciót szoktak végrehajtani, mely során ún. end-capped fázisok jönnek létre (17). Létezik egyszer, kétszer, illetve ma már elérhetőek a háromszor utószilanizált töltetek is. Erre a célra általában trimetil-klórszilánt használnak, mely kis mérete miatt könnyebben hozzáfér a szabad szilanolcsoportokhoz.

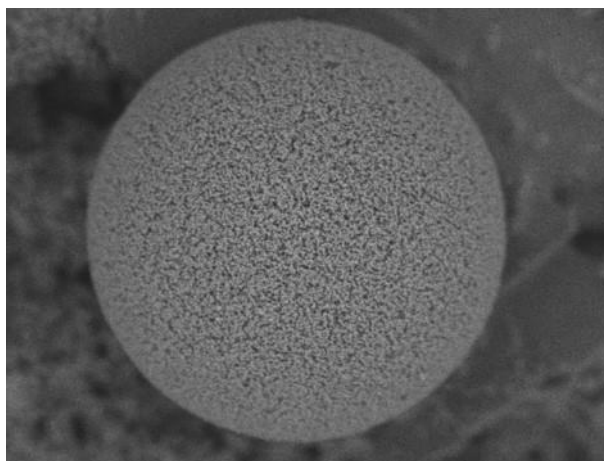
A szilikagél alapú állófázisok alkalmazhatóságát nagymértékben befolyásolja még az oldhatóságuk is, mely pH 8-9-es tartományban növekszik meg jelentősen. Ezen a magasabb pH tartományon érdemes az ún. hibrid tölteteket alkalmazni, melyek nem csak –Si-O-Si- kötéseket tartalmaznak, hanem szilíciumhoz felváltva kapcsolódik metil és szilanolcsoport is, vagy pedig etilén csoport épül be a kötésbe. Az ilyen hibrid fázisok esetében az alkalmazható felső pH érték már 10-12 körüli. Alacsony pH-n viszont a felületre felvitt csoportok hidrolízise nő meg, így az alsó pH határ 1-2 között van. Ha ilyen alacsony pH-n kell dolgoznunk érdemes olyan állófázist választani, ahol a sziloxán kötés árnyékolva van. A fémionok jelenléte ugyancsak a módosító csoportok hidrolizációját erősíti. Ezt a kellemetlen hatást a gyártás során igyekeznek minél kisebb értékre szorítani. Ma már 1 ppm alatti fémionszennyezésű állófázisok is elérhetőek a korábbi 200 ppm tartalmúakhoz képest (17, 21).

4.1.2. Állófázisok típusai

A szilikagél alapú állófázisok többféle töltetszerkezetben is elérhetőek. Ezek közé tartoznak például a teljesen porózus, a héjszerkezetű és a monolit típusú töltetek is.

4.1.2.1. Teljesen porózus töltetek

A teljesen porózus állófázisok esetében a fejlődés egyértelműen abban mutatkozott meg, hogy egyre kisebb szemcseátmérőjű töltetek kerültek forgalomba. Elsőként a Waters cég állt elő az ún. BEH (ethylene bridged hybrid) típusú állófázissal, melynek átlagos szemcseátmérője 1,7 μm volt. Ahogy ezt a bevezetés során már említettem a szemcseátmérő csökkenésével négyzetesen nő a nyomásesés mértéke (23), így az ilyen típusú állófázisok használata megkövetelte a folyadékkromatográfias rendszerek fejlesztését illetve a rövidebb kolonnák használatát is. Így az új típusú állófázisok megjelenésével egy időben került piacra a Waters cég első UPLC készüléke is, mely 1000 barig volt működőképes és emellett kis rendszertérfogattal is rendelkezett. Ma már a többi gyártónál is elérhetőek a 2 μm alatti szemcseátmérőjű töltetek (16).



2. ábra: 1,7 μm -es BEH töltet SEM felvétele
(Kevin D. Wyndham, Waters Chemistry Technology Center)

A szub-2 μm -es szemcseátmérőjű állófázisokkal jó tányérmagasság (H_{min}) értékeket lehet elérni, viszont azt is meg kell említeni, hogy a redukált tányérmagasság értékük elmarad a korábbi nagyobb szemcseátmérőjű töltetektől, így hatékonyságuk is elmarad az elméletileg elvárhatótól. A redukált

tányérmagasság (h) érték egy dimenziómentes szám, aminek segítségével a különböző szemcseátmérőjű töltetek hatékonyságát vethetjük össze (16).

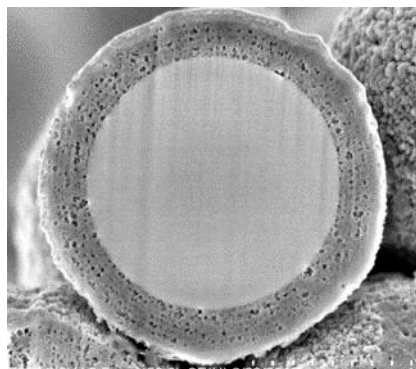
$$h = \frac{H}{d_p} \quad 4.1.$$

4.1.2.2. Héjszerkezetű (tömörmagvú) töltetek

A héjszerkezetű töltetek nem újkeletűek, már az 1960-as évek végén megjelent az első generációjuk. Horváth és Lipsky ekkor már bevezette az ún. pellikuláris tölteteket, melyek magja egy üvegyöngy volt és egy 1 μm vastagságú szerves polimer alapú ioncserélő réteg vette körül (24), ezt pedig Kirkland tömör szilikamagú állófázisai követték (25).

Kezdetben az ilyen típusú töltetek nem voltak népszerűek, ami az aránytalanul nagy belső magnak volt köszönhető, hiszen ezáltal csökkent az oszlopok terhelhetősége és a visszatartás is csökkent.

Az áttörés 2007-ben következett be, amikor már 3 μm alatti szemcseátmérőket sikerült elérni olyan kéregvastagsággal, ami a szemcse teljes átmérőjének a mintegy 25%-át tette ki. Ezáltal csökkent a diffúziós úthossz, ami gyorsította az anyagátadási folyamatokat az elválasztások során.

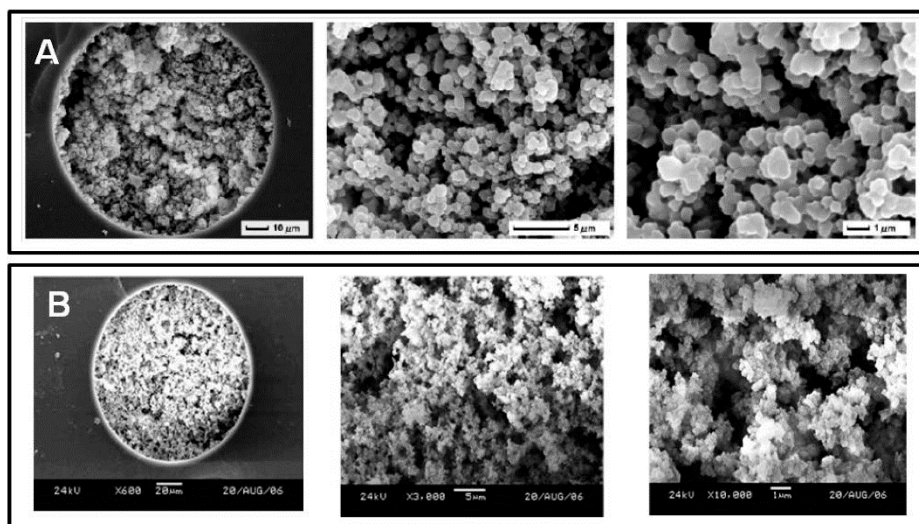


3. ábra: Cortecs héjszerkezetű szemcse (1,6 μm -es tömör mag)
FIB SEM felvétele
(Kevin D. Wyndham, Waters Chemistry Technology Center)

Míg a teljesen porózus töltetknél $h_{min} = 2,0$ a jelenleg elérhető legkisebb redukált tányérmagasság, addig a héjszerkezetű töltetek esetében ez a szám elérheti az 1,2-1,5 közötti értéket is (16, 26).

4.1.2.3. Monolit típusú állófázisok

A monolit típusú állófázisok különlegessége, hogy a töltetet egyetlen egybefüggő „rúd” alkotja. Ezen a területen több irányban is folytak a kutatások és a publikációk ez irányban szinte egy évtizeden belül születtek a különböző kutató műhelyeknél hidrofil, hidrofób típusú polimer és szilikagél alapú monolit kolonnákról (27-29). A szerkezetükről a 4. ábrán (30) látható keresztmetszeti felvétel.



4. ábra: Szerves polimer alapú (A) és szilikagél alapú (B) monolit kolonnák keresztmetszeti SEM felvétele

Az ún. első generációs szilikagél alapú monolit oszlopok 2000-ben, míg a második generációs kolonnák 2011-ben jelentek meg. A két generációs típus között a makro-és mezopórusaik méretében van különbség. A monolit típusú kolonnák porozitása sokkal nagyobb a szemcsés töltetű kolonnákéhoz képest, így az oszlop áramlási ellenállása (permeabilitása) is sokkal kisebb, melyből következően ugyanolyan áramlási sebesség mellett sokkal kisebb nyomásesés tapasztalható. Az első monolit oszlopok 10 cm hosszúak voltak és nagy áramlási sebesség mellett használták őket az elemzési idő csökkentése érdekében, ezért nem feleltek meg az MS-sel csatolt technikákhoz. Időközben azonban az oszlopok hossza, majd belső átmérője is csökkent, ezáltal ezek a kolonnák már UHPLC készülékekben használva alkalmasak LC-MS módszerekhez is. Azt viszont meg kell említeni, hogy a fehérje analitikában inkább a szerves polimer alapú monolitok az elterjedtebbek, jó pH és hőstabilitásuk miatt, illetve az így elkerülhető másodlagos kölcsönhatások miatt. Viszont a mezopórusok

hiánya csökkenti felbontóképességüket és terhelhetőségüket egy szilikagél alapú monolit oszlopéhoz viszonyítva (17, 28, 31).

4.2. Folyadékkromatográfiás készülékek fejlődése

A fentiekben részletezett változások a kromatográfiás állófázisok területén együtt járt a készülékek modernizálásával. A kisebb szemcseméreték és ezáltal a lényegesen megnövekedett nyomás miatt szükség volt az UHPLC készülékek megjelenésére, melyek akár 1000 bar felett is képesek üzemelni.

A korábbi 4,6 mm-es kolonnaátmérők és az oszlopok hossza is lecsökkent, ugyancsak a részecskeméreték változása folytán.

A készülékek további paraméterei is ehhez a változáshoz igazodtak, hogy az oszlopon kívüli csúcsszélesítő hatások is arányosak és minél kisebbek legyenek. Az alábbi táblázat tartalmazza a főbb műszerezettségi változásokat (16, 23, 32).

1. táblázat: UHPLC és HPLC rendszerek főbb paraméterei (16)

	UHPLC	HPLC
Nyomás teljesítmény (bar)	1000-1400	400
Kolonna töltet átmérő (μm)	1-3	3-10
Kolonna hossz (cm)	3-10	10-25
Kolonna belső átmérő (mm)	1-3	3-8
Alkalmazott térfogatáram (ml/min)	0,02-2	0,1-10
Injektált mintatérfogat (μl)	0,1-5	5-200
Detektor cellatérfogat (μl)	0,5-2	5-10
Detektor mintavételi frekvencia (Hz)	20-100	5-20
Gradiens késési térfogat (ml)	0,1-0,7	0,5-3
Oszlopon kívüli variancia (μl^2)	1-25	40-200

5. Állófázisok kémiai jellemzése

Annak ellenére, hogy a szilikagél korlátozott pH-stabilitással rendelkezik és a bázikus vegyületek elválasztása során kedvezőtlen ún. „tailinges”, elhúzódó kromatográfiás csúcsokat kapunk, a fordított fázisú folyadékkromatográfiában mégis a leggyakrabban használt állófázisok a kémiailag módosított felületű szilikagél alapú állófázisok. Ezért a kedvezőtlen hatásért a szilikagél felületén maradt szilanolcsoportok felelősek, amelyek hozzáférhetők a felületi módosítás után is (21-33). Számos lehetőség áll ma már rendelkezésre szilanolcsoportok számának csökkentése érdekében a fejlettebb („base-deactivated”) állófázisok előállításához. A különféle alkil-szililezett (C₄, C₈, C₁₈) állófázisokon kívül, más típusú ligandumokat is használnak a szilikagél felületének módosítására, például fenil-étert, pentafluor-fenil-, ciano- vagy aminocsoportot.

Egy adott elválasztás megvalósításához a felhasználók számára szükséges és elengedhetetlen az oszlopok jellemzése, hogy a megfelelő állófázis kerüljön kiválasztásra. A kromatográfusok speciális információt kaphatnak az állófázisok szelektivitására vonatkozóan, ha szükséges választhatnak egy más tulajdonságokkal rendelkező oszlopot, ha az első nem működött megfelelően a mérések során. Ezen kívül az állófázisok közötti különbségek ismerete hasznos lehet a módszerfejlesztésben, és az elméleti szakemberek számára is, akik többet szeretnének tudni a minta, a mozgó fázis és a töltet közötti kölcsönhatásról (34).

Számos analitikai kémiai technikát használnak erre a célra, például FTIR (Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia), NMR (mágneses magrezonancia spektroszkópia), elektron-, és atommikroszkópos vizsgálatok, valamint termokémiai és termogravimetricus módszereket. Ezek a felsorolt módszerek azonban károsíthatják az állófázist az elemzés során, viszont számos kromatográfiás vizsgálat is létezik, melyek segítségével jellemezhetők az állófázisok roncsolása nélkül is. Ezek a módszerek a tesztvegyületek és az állófázisok közötti intermolekuláris kölcsönhatásokon alapulnak (35). Több állófázis tesztet és értékelési módszert vezettek be, amelyek általában empirikus módszerek és a megfelelő mintavegyületek közötti a relatív retenciós értékeken alapulnak (36-37). Knox és Bristow voltak az elsők, akik adott komponensek keverékét használták a HPLC-s állófázisok kinetikai tulajdonságainak

tesztelésére (35). A leginnovatívabb és legteljesebb koncepció Snyderhez és kutatócsoportjához kapcsolódik, amely azon alapult, hogy felismerték az állófázis változatos szelektivitásának szerepét a fordított fázisú elválasztásokban. Az állófázisok jellemzésének másik népszerű módszere a Tanaka módszer, amelyet Euerby is széles körben alkalmazott, illetve az amerikai gyógyszerkönyv is a Tanaka protokollt tartalmazza (34).

Tanaka és munkatársai által bevezetett módszer a C₁₈-as fordított fázisú állófázisok jellemzésére használható. A módszer segítségével megbecsülhető a töltet alkilánccainak mennyisége, hidrofób jellege, sztérikus szelektivitása és a hidrogén-hidas kötési képessége (38).

Számos kutató vizsgálta még a szilikagél felületéhez kötött funkciós csoportok sztérikus szelektivitását, a felületi módosítás során megmaradó szilanolcsoportok hatását a bázikus komponensek elválasztására és az új típusú állófázisok szerkezetének hatását az elválasztás hatékonyságára (34).

Sander és munkatársai egy új molekuláris modellezést is készítettek a hosszú láncú állófázisok sztérikus szelektivitásának jellemzésére (39-40).

Más kutatók szintén vizsgálták az állófázis szelektivitásának egyes elemeit, az aminok és a szilanolok kölcsönhatására összpontosítva (41-42).

Jandera és munkatársai egy új típusú kolonnatesztet javasoltak a fordított fázisú folyadékkromatográfiához, amely kevésbé függ a mozgó fázis összetételétől, mint a korábbi klasszikus tesztek. Naftalinszulfonsavakat használtak tesztvegyületként tisztán vizes, nátrium-szulfátos mozgófázisban. A kísérletek során erős kölcsönhatások voltak megfigyelhetők a retenciós értékek alapján, amelyeket az állófázis felületén visszamaradt szilanolcsoportok jelenléte okozott (43).

A fent említett módszereken túl egyéb lehetőségek is rendelkezésünkre állnak a fordított fázisú állófázisok jellemzésére.

Ez a terület folyamatosan fejlődik és számos összehasonlító teszt és áttekintés is született az évek során, amelyek hasznosak lehetnek, hogy kiválasszuk a számunkra a legmegfelelőbb módszert a fordított fázisú álló fázisok jellemzésére (34, 37, 42, 44).

5.1. A Tanaka-teszt

Tanaka és munkatársai 1989-ben megjelent munkája alapján vált elterjedté C₁₈-as fordított fázisú kromatográfiás állófázisok jellemzésére ez a módszer (38). Az alább ismertetett állandók minden egyes állófázisnál más-más értéket vesznek fel, így tudjuk velük jellemezni a tölteteket bizonyos tulajdonságaik alapján.

- k_{AB} - hidrofób retenció (alkil láncok mennyiségére utaló retenció érték)
- $\alpha_{(CH_2)}$ - felületi borítottság (hidrofobicitás)
- $\alpha_{t/o}$ - alakszelektivitás (sztérikus szelektivitás)
- $\alpha_{C/P}$ - hidrogénkötő kapacitás

Az állandók a következőképpen határozhatók meg:

$$k_{AB} = k(\text{pentilbenzol}) \quad 5.1.$$

$$\alpha_{(CH_2)} = \frac{k(\text{pentilbenzol})}{k(\text{butilbenzol})} \quad 5.2.$$

$$\alpha_{t/o} = \frac{k(\text{trifenilén})}{k(\text{o-terfenil})} \quad 5.3.$$

$$\alpha_{C/P} = \frac{k(\text{koffein})}{k(\text{fenol})} \quad 5.4.$$

Ahol az adott komponensek k értéke a retenció, α értéke pedig az elválasztási tényező.

5.1.1. A hidrofób retenció (alkilláncok mennyisége)

Az állófázis felületéhez kötött alkilláncok mennyisége meghatározható pentilbenzol minta injektálásával, mivel ez a molekula egy semleges hidrofób tulajdonságokkal rendelkező szénhidrogén és a retenció tényezője (k_{AB}) kifejezi a töltet hidrofobicitásának mértékét és megbecsülhető belőle a töltet felületének széntartalma (38).

5.1.2. A felületi borítottság (hidrofobicitás)

A szilikagél hidrofób csoportokkal való felületi borítottságának mértéke fontos paraméter a fordított fázisú folyadékkromatográfiában, mert ez határozza meg a töltet hidrofób szelektivitását. Az állófázis szelektivitása megbecsülhető az ún. metilénszelektivitása ($\alpha_{(CH_2)}$) alapján, mivel minden egyes hozzáadott metiléncsoport növeli a visszatartást. A sztérikus kölcsönhatások ez esetben minimális szerepet játszanak.

A hidrofobicitást éppen ezért különböző hosszúságú alkilánccal rendelkező alkilbenzolok segítségével tudjuk meghatározni.

Az alkilbenzolok retenciója - csak egy metiléncsoportban különböző (mint például a pentilbenzol/ butilbenzol) - a szilikagél felületéhez kötött oktadecilcsoportok sűrűségétől függ, azaz a felületi borítottság mértékétől. A sűrűbb felületi lefedettség nagyobb különbséget eredményez a vegyületek visszatartása között, így ez esetben nagyobb $\alpha_{(CH_2)}$ -értéket fogunk kapni a mérések során. A felületi borítottság a poláris csoportokkal rendelkező vegyületek elválasztására is hatással van. Általában az alacsony $\alpha_{(CH_2)}$ -érték jelzi, hogy az oszlop előnyösebb poláris vegyületek elemzéséhez (38).

5.1.3. Alakszelektivitás

Az állófázisok azon képessége, hogy megkülönböztessék a hasonló szerkezetű, hidrofób jellegű, de eltérő sztérikus tulajdonságokkal rendelkező vegyületeket, az alakszelektivitásukból ($\alpha_{t/o}$) adódik. Az alakszelektivitás becsléséhez o-terfenil és trifenilén alkalmazható, mint mintavegyület. Mivel az o-terfenil rugalmasabb molekula és megcsavarodhat, míg a trifenilén szerkezete merevebb, így a megkötődés során eltérő módon viselkedhetnek (38).

5.1.4. Hidrogénkötő kapacitás

Több poláris vegyület (pl. a koffein vagy a teofillin) visszatartását nagymértékben befolyásolhatja a felszínen lévő reagálatlan szilanolcsoportok mennyisége. Esetünkben a koffein fenolhoz viszonyított retenciós tényezőjének mérése felhasználható az állófázis hidrogénkötési képességének meghatározására. Ebben az esetben a fenol szolgál referenciaként, mivel visszatartását kevésbé befolyásolják az állófázissal való poláris kölcsönhatások. Az alacsony $\alpha_{C/P}$ - érték

azt mutatja, hogy az állófázis felületén kevesebb szilanolcsoport érhető el, kevesebb H-hidas kötés tudott létrejönni. Tehát ez az érték jellemzi az állófázison végrehajtott „end-capping” folyamatok sikerességét (38).

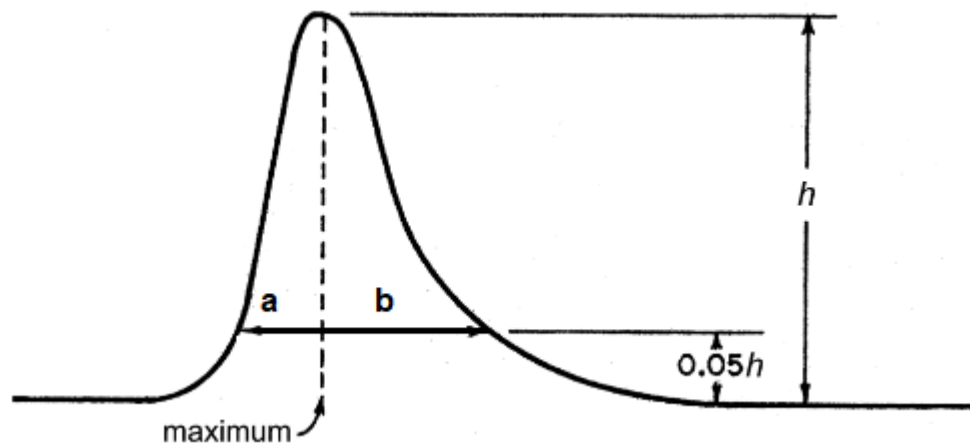
5.1.5. A szilanolhatás

Ideális esetben a kromatográfiai mérések során a mintakomponensek csúcsainak tökéletesen szimmetrikus Gauss-görbe alakúaknak kellene lenniük, de valós esetben a csúcsok mindig kissé aszimmetrikusak. Ha a csúcs első fele mutat aszimmetriát, akkor „frontingos”, ha a második fele, akkor „tailinges” csúcsalakról beszélünk (45).

Az USP tailing faktor (továbbiakban T_f) értéke az állófázissal történő kölcsönhatásoktól függ.

$$T_f = \frac{a+b}{2a} \quad 5.5.$$

ahol T_f a tailing faktor (a csúcsmagasság 5%-ánál mérve), „ b ” a távolság a csúcs középpontjától a leszálló ág végéig, „ a ” pedig a csúcs felszálló ágának elejétől a csúcs középpontjáig terjedő távolság (5.ábra).



5. ábra: Az aszimmetria megállapítása a csúcsmagasság 5%-ánál

Általában a tailinges csúcsalakot két vagy több különféle típusú adszorpciós kölcsönhatás okozza a mintamolekulák és az állófázis között. Az egyik ilyen hatás a „normál adszorpciós kölcsönhatás”, amely a fő kromatográfiai mechanizmusért felelős. A kölcsönhatások másik típusa a „tailinges csúcsalakot okozó hatás”, amely kevésbé számottevő, de lassú a deszorpciós sebessége. Ezeknek a hatásoknak köszönhetően a mintamolekulák kis része erősebb

visszatartással rendelkezik, mint a többi, és csak néhány molekula lép kölcsönhatásba a szilikagél felületén maradt szabad szilanolcsoportokkal. Ezért két különböző retenciós mechanizmus fordul elő ugyanazon vegyületnél, és ez okozza, hogy végül nem Gauss-görbe alakú csúcsot kapunk a mérések eredményeképpen (46-47).

A másodlagos kötőhelyek mellett a nem megfelelő mérési körülmények is okozhatnak tailing-es csúcsalakot, mint például a pontatlan injektálás (túl nagy injektálási térfogat, üres mintahurok) vagy a lassú detektorválasz is (48). Éppen ezért fontos az állófázisok jellemzésénél figyelmet fordítani a szilikagél felületi aktivitására. A szilanolcsoportok ismertek szabad, geminális és vicinális formában, ezek közel azonos erősségű kötéseket tudnak létrehozni (36, 49). Ez az elfogadott hipotézis, habár kísérletileg lehetetlen megkülönböztetni a szilanolcsoportokat egymástól (50-51).

Számos fizikai és kémiai módszer alkalmas a szilanolcsoportok mennyiségének becslésére (21, 49). Emellett pedig számos szilanolcsoport blokkolási lehetőség is ismert. Például különböző szerves vagy szervetlen aminosavakat lehet módosító anyagként a mozgófázis részeként alkalmazni.

A szilanolcsoportok blokkolása hatással lehet az oszlop hatékonyságára és a mintakomponensek visszanyerésére egyaránt, ami leginkább az analitikai kromatográfiában, de esetenként a preparatív kromatográfiában is fontos szereppel bír (49, 52-53).

A gyakorlatban a szilikagél alapú állófázisok felületén maradt szilanolcsoportok aktivitása erős hatást vált ki a bázikus vegyületek - például aminok vagy más gyógyszerhatóanyagok - elválasztása során, mivel ezekkel a mintakomponensekkel erős kölcsönhatás alakulhat ki.

Az állófázisok ezen jellemzőinek ismeretében könnyebb kiválasztani a megfelelő kromatográfiás oszlopot a mérésekhez, melyek során így elfogadható és szimmetrikus csúcsokat kaphatunk.

Mivel a napjainkban használt szilikagélek nagy tisztaságúak, így az állófázisok csökkent szilanolaktivitást mutatnak a hagyományos tesztkomponensek esetében, így mindenképpen érdemes érzékenyebb tesztvegyületeket kiválasztani az ilyen ún. bázis-deaktivált állófázisok szilanolcsoportjainak pontosabb jellemzése érdekében (12, 42).

6. A kromatográfias oszlop heterogenitásának és kialakításának hatása a hatékonyságra

Az állófázisok kémiai jellemzése mellett fontos tényező még a hatékonyság szempontjából, hogy az adott kromatográfias oszlop töltete mennyire homogén illetve, hogy maga az oszlop kialakítása milyen hatást gyakorol az elválasztás során a csúcsszélesedésre.

Töltetes oszlopok esetén a leghatékonyabb és a legszélesebb körben alkalmazott technika erre a nagynyomású, nedves eljárás, mely során ún. zagyot juttatnak az oszloptestbe. Ezen módszer alkalmazása során az állófázis szuszpenziója egy tartályban van, amely csatlakozik az oszlophoz. Az oszloptöltéshez használt oldószert nagy nyomáson és nagy áramlási sebességgel vezetik át a tartályon keresztül, hogy a zagyot az oszlopba tolja (54-56).

Az eljárást folyamatosan optimalizálták, ahol többek között a viszkozitást, nedvesíthetőséget, sűrűséget, és a diszpergálóképességet tesztelték (11, 57-59).

Wong és munkatársai vizsgálták az ilyen eljárással készült kromatográfias oszlopok axiális heterogenitását. Azt állapították meg, hogy az oszlopban a töltetanyag legkevésbé homogén része a gyártók ajánlott használati irány bemeneti szakaszánál található, az ágy hosszától függetlenül (60).

Lambert és munkatársai a kromatográfias oszlopban található fritek hatását és a töltetanyag heterogenitását tanulmányozták töltetes oszlopok és monolit oszlopok esetében az ún. „oszlopforgatás” módszerével. Megállapították, hogy egy megfelelően töltetes oszlopban egy nemkötődő komponens esetén a homogén töltetanyag és az oszlopvégek okozta hatás sávszélesedés mértékére közel azonos (61).

Gritti és munkatársai (62) egy egyedileg készített, alacsony diszperziós rendszert terveztek és építettek két, 50 nl-es optikai érzékelő cellából, amelyek közvetlenül az oszlop előtt és után helyezkedtek el, hogy javítsák az elméleti tényérmagasság mérések pontosságát. Az ún. „áramlás megfordításos” technikát alkalmazták kromatográfias oszlopok töltetanyagának sugárirányú és axiális szerkezeti heterogenitásának meghatározására. Gritti és Gilar a közelmúltban tanulmányozták a kromatográfias oszlop végeinél található fritek

diszperziójának hatását a gradiens elúciós kromatográfiában (63). Megállapították, hogy a kimeneti oldalon lévő „outletfrit” jelenléte jelentősen korlátozza az elért hatékonyságot. Így számos már számos eredmény támasztja alá azt a feltételezést, hogy a frittechnikát újra kell vizsgálni (61-63).

6.1. Az oszlopon létrejövő sávszélesedés

Van Deemter és munkatársai (64) leírták, hogy az elméleti tányérmagasság (H) egy konvex görbével leírható a lineáris sebesség (u) függvényében. Ennek a függvénynek az általános alakja a következő:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad 6.1.$$

ahol A az örvénydiffúziós, B a hosszirányú diffúziós, C pedig az anyagátadásra vonatkozó tag.

Ezt az egyenletet többen is tovább gondolták azóta. A teljesség igénye nélkül például egy másik széles körben használt egyenlet a Knox-féle egyenlet, mely a következőképpen írható fel redukált értékek segítségével:

$$h = Av^{1/3} + \frac{B}{v} + C_s v \quad 6.2.$$

A van Deemter egyenlettől eltérően a Knox-egyenlet szerint az A tag függ a redukált áramlási sebességtől (v) (65).

A Giddings egyenlet, mely magába foglalja a sokcsatornás diszperziós hatást is a következőképpen írható fel (46):

$$H = \frac{A}{1+E/u} + \frac{B}{u} + Cu \quad 6.3.$$

ahol E az elválasztási ellenállás.

A kromatográfiás ún. tányérmodell alapján - mely úgy kezeli az oszlopot, mint véges számú elméleti tányérok sorozatát - egy elméleti tányér magassága (H) az oszlop hossz, L , és az elméleti tányérok számának, N , hányadosaként adható meg. Mindegyik tányér esetén az egyes fázisok között pillanatnyi egyensúlyok alakulnak ki (66-67).

$$N = \frac{L}{H} \quad 6.4.$$

Számos kinetikai modell írja le a kromatográfiás elválasztásokat, ezek közül az általános sebességi modell (general rate model, GRM) a legösszetettebb kinetikai modell. Mivel ez a modell túl komplex, ezért lehetetlen a parciális differenciálegyenleteket időtartományban megoldani, de Laplace-tartományban meg lehet oldani, és így a statisztikai momentumok kifejezhetők (68).

Az oszlop hatékonysága a kromatográfiás csúcsok momentumainak meghatározásával is megadható.

$$H = \frac{\sigma^2}{L} = L \frac{\mu'_2}{\mu_1^2} \quad 6.5.$$

ahol σ^2 a csúcscs szélességet jellemző hosszirányú variancia, L az oszlop hossza, illetve μ_1 a csúcs első abszolút momentuma és μ'_2 a második centrális momentuma. A momentumok a kromatográfiás csúcs integrálásából számolhatók (69).

Az első momentum:

$$\mu_1 = \frac{L}{u_h} (1 + Fa) = \frac{L}{u_h} (1 + k_1) \quad 6.6.$$

$$a = \varepsilon_p + K(1 - \varepsilon_p) \quad 6.7.$$

$$k_1 = Fa \quad 6.8.$$

$$F = \frac{1 - \varepsilon_e}{\varepsilon_e} \quad 6.9.$$

ahol L az oszlop hossza, u_h a mozgófázis lineáris sebessége, ε_e külső térkitöltési tényező, ε_p belső térkitöltési tényező, K az adszorpció egyensúlyi állandó.

A második centrális momentum a következő módon adható meg:

$$\mu'_2 = \frac{2L}{u_h} \left[\frac{D_L}{u_h^2} (1 + k_1)^2 + \frac{Fa^2}{u_h} \left(\frac{r_p}{3k_{ext}} + \frac{r_p^2}{15D_p} \right) \right] \quad 6.10.$$

ahol D_L az axiális diszperziós együttható, k_{ext} a külső (szemcsfelületi) sebességi állandó, D_p a pórusbeli diffúziós együttható és r_p az átlagos szemcsesugár.

Az általános sebességi modellből meghatározott momentumok alapján a következő tényérmagasság egyenlet írható fel:

$$H = L \frac{\mu'_2}{\mu_1^2} = \frac{2D_L}{u_h} + \frac{2u_h}{F} \left(\frac{k_1}{k_1+1} \right)^2 \left(\frac{r_p}{3k_{ext}} + \frac{r_p^2}{15D_p} \right) \quad 6.11.$$

A tányérmagasság értéke a következő tagokból tevődik össze:

$$H = H_L + H_{ext} + H_p \quad 6.12.$$

ahol H_L az axiális diszperziós tag

$$H_L = \frac{2D_L}{u_h} \quad 6.13.$$

és H_{ext} és H_p a szemcse felszínén és a szemcse pórusaiban kialakuló anyagátadási gátlás járuléka a tányérmagassághoz, úgy, mint

$$H_{ext} = \frac{2u_h}{F} \left(\frac{k_1}{k_1+1} \right)^2 \frac{r_p}{3k_{ext}} \quad 6.14.$$

$$H_p = \frac{2u_h}{F} \left(\frac{k_1}{k_1+1} \right)^2 \frac{r_p^2}{15D_p} \quad 6.15.$$

k_{ext} kifejezhető a Wilson-Geankoplis egyenlet (70) segítségével a következőképpen:

$$k_{ext} = \frac{1,09}{\varepsilon_e} u_h^{1/3} \left(\frac{D_m}{d_p} \right)^{2/3} \quad 6.16.$$

ahol D_m a molekuláris diffúziós együttható. Becslésére számos egyenlet áll rendelkezésünkre. Kis molekulák esetén folyadék fázisban történő meghatározására legelterjedtebben alkalmazott egyenlet a Wilke-Chang egyenlet (71):

$$D_m = \frac{7,4 \times 10^{-8} (\phi_m M_B)^{1/2} T}{\eta_b V_A^{0,6}} \quad 6.17.$$

ahol M_B az oldószer moláris tömege, ϕ_m az oldószer asszociációs faktora, T az oszlop abszolút hőmérséklete, η_b a dinamikus viszkozitása (cP), V_A a mintamoláris térfogata a normál forráspontján (cm³/mol).

Young és munkatársai (72) a fehérjék molekuláris diffúziójának meghatározására dolgoztak ki egy összefüggést:

$$D_m = 8,31 \times 10^{-8} \frac{T}{\eta M_w^{1/3}} \quad 6.18.$$

ahol D_m mértékegysége cm^2/s , a dinamikus viszkozitásé, η , cP, M_w , molekuláris tömegé gramm, és T az abszolút hőmérsékleté K.

A molekuláris diffúzió nagyon érzékeny a kísérleti körülményekre (hőmérséklet, oldószer összetétel, nyomás). A D_m értéke pontosan meghatározható egy HPLC-rendszerben. Knox és McLaren (73) vezette be egy módszert gázkromatográfiában, melyet *arrested flow*, azaz *megállított áramlásos technikának* is neveznek.

Később ezt a technikát kezdték alkalmazni LC-rendszerek kinetikai tulajdonságainak meghatározására is, melyet Miyabe és munkatársai (74-75) a későbbiekben úgy neveztek, hogy *peak parking*, azaz *csúcsparkoltatásos módszer*.

A módszer lényege, hogy a mozgófázist addig áramoltatjuk, míg a mintasáv eléri a folyadékkromatográfiás oszlop közepét, ekkor az áramlást megállítjuk, és hagyjuk a mintát diffundálni egy adott ideig (parkolási idő), majd újraindítjuk a mozgófázist. A parkolási idő alatt bekövetkező sávszélesedést a csúcsvariancia értékének növekedése mutatja, melyért az axiális diszperzió a felelős:

$$d\sigma^2 = 2D_L dt_p \quad 6.19.$$

ahol D_L a minta axiális diszperziója a mozgófázisban, ami egyenlő D_m -mel, abban az esetben ha a kísérletet csőben végezzük. Ha az áramlási csatornák kanyarulatosak a töltetben, az hatással van a D_m -re is. Ilyenkor D_L az obstrukciós faktoron (γ) keresztül arányos a D_m -mel az alábbi összefüggés szerint:

$$d\sigma^2 = 2D_m \gamma dt_p \quad 6.20.$$

$$D_{eff} = D_m \gamma \quad 6.21.$$

A molekuláris diffúziós együttható és az obstrukciós faktor szorzatából kaphatjuk meg az ún. effektív diffúziós együtthatót, D_{eff} .

6.2. Az oszlopon kívüli sávszélesedés

A kisebb szemcseméreteknek (2 μm -nél kisebb), a részecskeszerkezetnek és a keskenyebb oszlopoknak köszönhetően, a folyadékkromatográfiás oszlopok új generációja sokkal élesebb és keskenyebb csúcsokat produkálnak, mint a korábbi generációk.

A térfogatbeli csúcsvariancia (σ_V^2) gyengén kötődő komponensek esetén csak néhány μl^2 -es nagyságrendű ezeknél az új generációs 2,1 \times 50 mm-es oszlopoknál, míg a modern műszerek oszlopon kívüli csúcsszélesítő hatása 5–40 μl^2 -ig (1.táblázat 4.2.-es fejezet) terjedhet (76). Emiatt a gyártóknak javítaniuk kellett a műszerezettségén is (az injektoron, az összekötő kapillárisokon, a detektor cellán), hogy az oszlopon kívüli diszperziós hatást minimalizálják (32, 63, 77-78).

Általában az oszlopon kívüli sávszélesítő hatást tanulmányozzák és tárgyalják az irodalomban. Emellett viszont külön meg kell említeni a töltetágyon kívüli, de az oszlopon történő sávszélesedést is, amit nem a homogénnek tekinthető állófázis okoz, hanem az oszlopvégek. Ez a porózus fritek jelenlétéből és a közelükben kialakult töltetszerkezetből tevődik össze (61-63).

A frit szerepe az, hogy az állófázist az oszlopban tartsa, és az eluens szabadon áramolhasson rajta. Számos megoldást kerestek a fritek által okozott diszperzió minimalizálására, de a fritek sávszélesítő hatásának vizsgálata egy kevésbé tanulmányozott területnek tűnik. Cheong hasznos áttekintő cikket tett közzé a frittechnikákról és a frit nélküli kromatográfiás technikákról (79).

A kereskedelemben beszerezhető 2,1 \times 50 mm-es oszlopok, melyek 1,6 μm -es héjszerkezetű szemcsékkel (Cortecs C₁₈, Waters) vannak töltve, a redukált tányérmagasság értékük 1,45. Az oszlop bemeneti és a kimeneti oldalán található fritek miatt ekkora ez az érték, a diszperzió korrekcióját követően a töltetágy redukált tányérmagassága 0,75, amely közel áll az elméletileg elérhető legkisebb értékhez. Következésképpen a hatékonyság jelentős része elveszik a két oszlopvég hatása miatt (80). Ezért fontos, hogy pontosan meghatározzuk a fritek hatását a sávszélesedésre.

Broyles és munkatársai vizsgálták a frit átmérőjének, vastagságának és porozitásának hatásait a mintasáv alakjára nézve egy 17 \times 100 mm-es oszlopban. Különböző friteket teszteltek és egyértelmű hatást sikerült kimutatni

az elválasztás hatékonyságára. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a töltetes oszlopokkal kapcsolatos „művészet” kiterjeszhető a fritek kiválasztásának és gyártásának „művészetére” is (81-82).

6.3. Oszlopforgatás

Az „áramlás-visszafordításos” vagy „oszlopforgatásos” módszert az irodalomban elvétve tárgyalják. Ezt alkalmazták például egymásra illesztett membránokkal készített kromatográfias oszlopok elméleti tényérmagasságának és a folyadék fázisú áramlási profil torzulásának meghatározására preparatív folyadék kromatográfias oszlopok esetében (83-85).

Ahogy azt a fejezet elején már említettem, Lambert és munkatársai, illetve Gritti és munkatársai az oszlopforgatásos technikát alkalmazták kromatográfias oszlopok töltetágyának sugárirányú és axiális szerkezeti heterogenitásának meghatározására és a fritek csúcsszélesítő hatásának vizsgálatára (61-63).

6.3.1. A módszer

Az áramlás-visszafordítási/oszlopforgatásos módszer alkalmas a töltetágy heterogenitásának vizsgálatára és az oszlopvégek sávszélesítő hatásának megállapítására. A módszer használata során a mozgófázis áramlását megállítjuk, amikor az adott mintánk elér az oszlopban egy bizonyos távolságot. Miközben nincs áramlás az oszlopot megfordítjuk a parkolási idő alatt. Az áramlás újraindítása után a minta ugyanazon oszlop végen fog eluálódni, mint ahol belépett.

Az oszloptöltési eljárás sajátosságai miatt feltételezhető, hogy az oszlop bemeneti és kimeneti oldala eltérő szerkezettel bír és más hatékonyságot fog mutatni. Éppen ezért a rendelkezésre álló oszlopokat be-és kimeneti irányból is teszteltük a lokális tényérmagasság értékeket és az oszlopvégek csúcsvariációját a 6.28. egyenlet alapján határoztuk meg.

6.3.2. Elméleti háttér

A sávszélesedést különféle egységekben használatos az elválasztástudományban. A kromatográfias csúcsok második centrális momentuma (μ_2) adja meg a sávszélesedés értékét, mely időskálán mérhető. Ez esetben beszélünk időbeli csúcsvariációról (σ_t^2).

A hosszirányú variancia (σ_z^2) jellemzi az oszlopban történő sávszélesedést, melyet az időbeli varianciából lehet származtatni:

$$\sigma_z^2 = \sigma_t^2 u_z^2 \quad 6.22.$$

ahol u_z^2 a mozgófázis szabad keresztmetszeti felületre vonatkoztatott lineáris sebessége.

Az oszlopon kívüli hatást általában térfogatbeli varianciával (σ_V^2) adjuk meg, ami a következőképpen számolható:

$$\sigma_V^2 = \sigma_t^2 F_V^2 \quad 6.23.$$

Azt mindenképp meg kell jegyezni, hogy a sávszélesedés értékét korrigálni kell az oszlopon kívüli csúcsszélesítő hatással, mielőtt az oszlopforgatásos mérések számításait elvégeznék. A különféle hozzájárulások a zónaszélesedéséhez a következőképpen írhatók fel:

$$\sigma_{t \setminus V}^2 = \sigma_{system}^2 + \sigma_{park}^2 + \sigma_{end}^2 + \sigma_{bed}^2 \quad 6.24.$$

ahol $\sigma_{t \setminus V}^2$ időbeli vagy térbeli variancia, σ_{system}^2 az oszlopon kívüli csúcsszélesítő hatás, σ_{park}^2 a diffúzió által okozott sávszélesedés a parkolási idő alatt, σ_{end}^2 az oszlopvégek inhomogenitásából és a friték keverési hatásából adódó variancia, σ_{bed}^2 pedig a töltetágy hozzájárulása a zónaszélesedéshez.

Ha az oszlopon kívüli csúcsszélesedéssel korrigálunk, akkor a következő összefüggést kapjuk:

$$\sigma_{t \setminus V, korr}^2 = \sigma_{park}^2 + \sigma_{end}^2 + \sigma_{bed}^2 \quad 6.25.$$

Ahogy a minta az oszlopban vándorol, csúcsvarianciája lineárisan növekszik a megtett távolsággal. Ez alapján a hosszirányú variancia a következőképpen fejezhető ki:

$$\sigma_{bed}^2 = Hz \quad 6.26.$$

ahol H lokális tányérmagasság, z pedig a minta által megtett úthossz.

a A hosszirányú sávszélesedés növekedését a parkolási idő (t_{park}) alatt a következőképpen írhatjuk le:

$$\sigma_{park}^2 = 2D_{eff}t_{park} \quad 6.27.$$

ahol D_{eff} az effektív diffúziós együttható, melyet a csúcsparkoltatásos mérések (74-75.) eredményeinek ábrázolásával kaphatunk meg. Ha ábrázoljuk az egyre növekvő csúcsszélesedési értékeket (σ_z^2) a növekvő parkolási idők függvényében, az egyenes meredeksége fogja megadni az effektív diffúziós együtthatót.

Az oszlopforgatásos mérések során megfigyelt csúcsszélesedési értékeket a töltetegyben megtett távolság függvényében ábrázolva ugyancsak egy egyenest fogunk kapni, melynek a meredeksége megadja a töltetegy lokális tányérmagasságát, tengelymetszete pedig a parkolásból adódó csúcsszélesedést, illetve az oszlopvégek hatását (46, 61).

$$\sigma_{z,app}^2 = \sigma_{z,end,app}^2 + 2D_{eff}t_{park} + 2Hz \quad 6.28.$$

7. Kísérleti körülmények

7.1. Állófázisok kémiai jellemzése – Tanaka-teszt

7.1.1. Készülék

A kromatográfiai méréseket egy Waters Acquity I Class UPLC készüléken végeztük el.

A rendszer egy kettős szivattyúból, automata mintaadagolóból (átfolyótűs), oszloptermosztátból, egy diódasoros UV-detektorból (220 nm hullámhosszon, míg a kinuklidin esetén 200 nm hullámhosszon használtuk) és egy számítógépes adatgyűjtő részegységből (Empower 2 szoftverrel) épül fel.

7.1.2. Oszlopok

Munkánk során hat fordított fázisú (C₁₈) oszlopot teszteltünk, melyeket két gyártó (GL Sciences, Phenomenex) biztosított számunkra. Mindegyik oszlop mérete azonos (2,1 × 50 mm), de az állófázisok típusa különböző volt. Három tömörmagvú (héjszerkezetű), kettő teljesen porózus és egy monolit oszlop retenciós viselkedését vizsgáltuk. Az oszlopok tulajdonságai a 2. táblázatban láthatóak.

7.1.2.1. GL Sciences InertSustain C₁₈ és InertSustainSwift C₁₈

A GL Sciences egy új típusú szilikagélt fejlesztett ki, melynek neve „Evolved Surface Silica” (ES). Az InertSustain és az InertSustainSwift oszlopokat teljesen porózus, 2 µm-es ES állófázissal töltik, de ez a két állófázis típus is különböző paramétereket mutat, a felület, a pórusméret és a széntartalom terén is (2. táblázat).

7.1.2.2. GL Sciences InertCore C₁₈, Phenomenex Kinetex C₁₈ és Kinetex EVO C₁₈

Ez a három oszlop tömörmagvú részecskékkel töltetes, ahol egy nem porózus szilárd magot porózus rétegek vesznek körül. A két Kinetex oszlop közötti különbség a szilikagél felépítésben keresendő. A Kinetex C₁₈ egy utószilanizált C₁₈-as állófázis (TMS - trimetilszililezett), mely nagyobb retenciós értéket mutat a poláris bázikus vegyületeknél.

2. táblázat: A kísérletekhez használt fordított fázisú állófázisok tulajdonságai

	részecske típusa	részecske mérete (µm)	fajlagos felület (m²/g)	pórusméret (Å)	utószilanizálás	széntartalom (%)
InertSustainSwift C ₁₈	teljesen porózus	1,9	200	200	teljes	9
InertSustain C ₁₈	teljesen porózus	2	350	100	teljes	14
InertCore C ₁₈	tömörmagvú	2,4 (1,8)*	100	90	igen	4
Kinetex C ₁₈	tömörmagvú	2,6 (1,9)	200	100	TMS***	12
Kinetex EVO C ₁₈	tömörmagvú	2,6 (1,9)	200	100	TMS	8
MonoTower C ₁₈	monolit	1,8**	340	110	igen	18

* zárójelben a tömör mag mérete

** az átjárható pórus és a váz együttes átmérője

*** trimetilszililezett

A Kinetex EVO C₁₈ –as állófázis is trimetilszilillel árnyékolt, de ez az oszlop különbözik még az alap szilikavázban is, mely etán keresztkapcsolásokat tartalmaz, így biztosítva a nagyobb inert felületet és pH-stabilitást tágabb pH-tartományban (pH 1–12).

7.1.2.3. GL Sciences Monotower C₁₈

Ezt a monolit típusú oszlopot a GL Sciences fejlesztette ki. A monolit szilikagél állófázisokat új szol-gél eljárással készítik, mely alkoxi-szilánok és vízdoldható polimerek hidrolízisén és polikondenzációján alapul. A kapott szilikagél egyetlen porózus darabból áll meghatározott pórusszerkezettel. Az ilyen típusú monolitoszlopok nagyobb porozitásúak, mint a teljesen porózus szilikagél oszlopok. Ezek az oszlopok lehetővé teszik a nagy áramlási sebesség használatát, miközben a hatékonyságot megtartják, és így az elemzési idő csökkenni fog (22, 86-87).

7.1.3. Felhasznált vegyszerek

A mozgófázis 0,02 mol/dm³-es vizes foszfát-puffer (pH 7) és acetonitril vagy metanol (Sigma-Aldrich, Németország, Schnelldorf) keveréke volt a tesztek során. A puffert dikálium-hidrogén-foszfát oldatból és kálium-dihidrogén-foszfátból (Sigma-Aldrich) állítottuk elő. A mozgófázist 0,2 µm × 47 mm-es nylon 66 membránon szűrtük (Supelco Analytical, USA). A mintákat a Sigma-Aldrich analitikai standardjaiból készítettük. Mindegyik minta tartalmazott tiokarbamidot, mint nem kötődő markert az oszlop holtterefogatának meghatározásához, és fenolt referenciamarkerként. A minták koncentrációja 100 µg/ml volt a hidrogénkötő kapacitás, a hidrofobicitás és a sztérikus szelektivitás jellemzésére (lásd 3. táblázat).

A szilanolhatás meghatározására a tesztvegyületeket feloldottuk, hogy 0,5 mg/ml koncentrációt kapjunk, és ezeket a törzsoldatokat meghatározott koncentrációra hígítottuk (lásd 4. táblázat). A mintaoldószerek összetétele megegyezik a mérések során alkalmazott eluens összetételével. A tesztvegyületek molekuláris szerkezetét az 6. ábra szemlélteti.

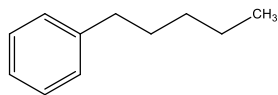
3. táblázat: A minták összetétele a Tanaka-teszthez µg/ml-ben

mintavegyület	k_{AB}	$\alpha_{(CH_2)}$	$\alpha_{t/o}$	$\alpha_{C/P}$
tiokarbamid	100	100	100	100
pentilbenzol	100	100	-	-
butilbenzol	-	100	-	-
o-terfenil	-	-	100	-
trifenilén	-	-	100	-
koffein	-	-	-	100
fenol	-	-	-	100

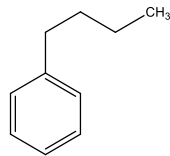
4. táblázat: A minták összetétele a USP tailing értékek meghatározásához µg/ml-ben, kinuklidin esetében mg/ml-ben

mintavegyület	1.	2.	3.	4.	5.	6.
tiokarbamid	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	-
fenol	25	25	25	25	25	-
koffein	20	-	-	-	-	-
piridin	-	100	-	-	-	-
dextrorfán	-	-	100	-	-	-
dextrometorfán	-	-	100	-	-	-
brillantkék	-	-	-	50	-	-
amitriplilin	-	-	-	-	25	-
kinuklidin	-	-	-	-	-	2,5

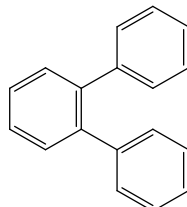
pentilbenzol



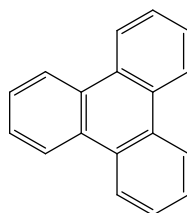
butilbenzol



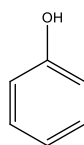
o-terfenil



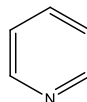
trifenilén



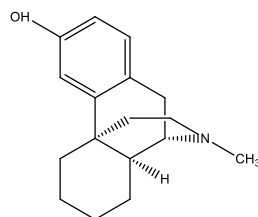
fenol (Ph)



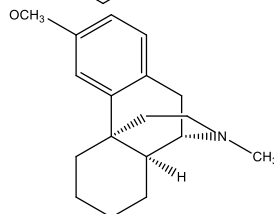
piridin (Pyr)



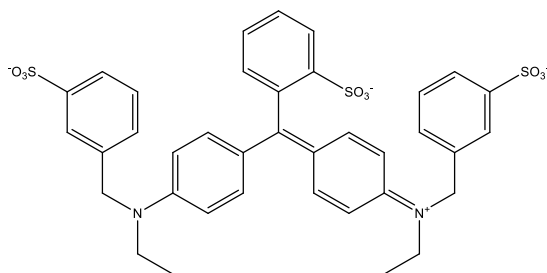
dextrorfán (Dpht)



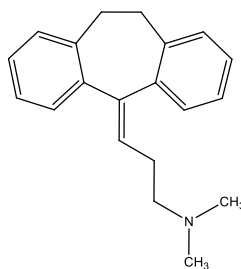
dextrometorfán (Dmhbr)



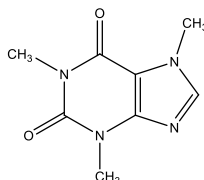
brillantkék FCF (BB)



amitriptilin (Ami)



koffein (C)



6. ábra: A mintamolekulák szerkezeti képlete

7.1.4. Alkalmazott mérési paraméterek

7.1.4.1. A hidrogénkötő kapacitás mérésének módszere

A hidrogénkötő kapacitás jellemzésére eluensként metanol és vizes foszfátpuffer keverékét alkalmaztuk 30:70%-os arányban. Az áramlási sebességet 0,3 ml/percre állítottuk be, és az oszlopot 40 ° C hőmérsékletre termosztáltuk. A mintából injektált térfogat 0,5 µL, míg a minta koncentrációja 100 µg/ml volt.

7.1.4.2. Módszer a hidrofobicitás, a sztérikus szelektivitás és az alkil-láncok mennyiségének mérésére

A hidrofobicitást, az alkil-láncok mennyiségét és a sztérikus szelektivitást 80% metanol és 20% vizes foszfátpuffer keverékének felhasználásával vizsgáltuk. Az áramlási sebességet 0,3 ml/percre állítottuk, és az oszlopot 40 ° C hőmérsékletre termosztáltuk. Az injektált térfogat 0,5 µL, míg a minta koncentrációja 100 µg/ml volt.

7.1.4.3. A szilanol hatás mérésének módszere

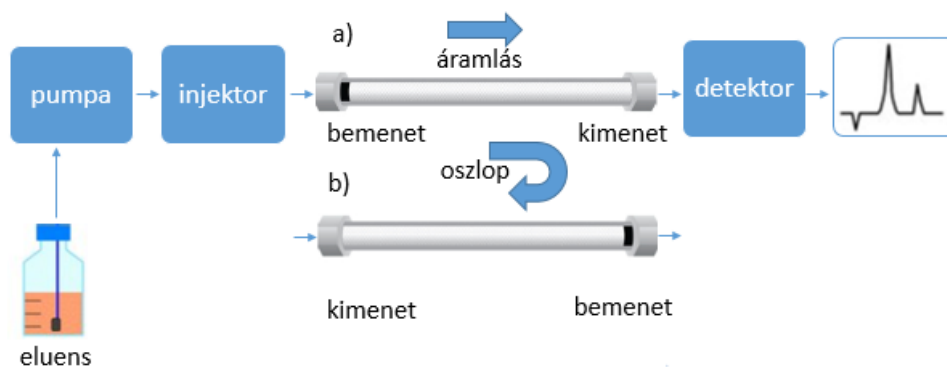
A szilanol-hatás meghatározására 30% acetonitril és 70% vizes foszfátpuffer (pH=7) keverékét használtuk eluensként. Az oszlopot 40 ° C hőmérsékletre termosztáltuk és az injektálási térfogat 0,5 µl volt. Az áramlási sebességet 0,4 ml / percre állítottuk. A kinuklidinnel végzett vizsgálatok során az eluens 90% víz és 10% acetonitril elegye volt; az injektált térfogat ez esetben 2 µL volt. A minták összetételét a 4. táblázat tartalmazza. Számos mintát használtunk a szilanol hatás jellemzésére, hagyományos komponenseket (koffein, piridin, amitriptilin)

és ezeknél érzékenyebb vegyületeket is (dextrometorfán, dextrorfán, brillantkék, kinuklidin). Tiokarbamidot alkalmaztunk az oszlop holtterfogatának meghatározására. A mérések során referenciavegyületként a fenolt használtunk. A többi vegyület relatív retenciós tényezőjét a fenoléhoz viszonyítva határoztuk meg (42).

A mérések során vizsgáltuk a vegyületek retenciós tényezőit és az USP tailing faktor értékeket.

7.2. A kromatográfias oszlop heterogenitásának és kialakításának hatása a hatékonyságra – Oszlopforgatás

Az *oszlopforgatásos mérések* (lásd 7. ábra) során egy retenció nélküli markerrel teszteltük az oszlop be- és kimeneti oldalát a töltet heterogenitása és az oszlophardver hatása szempontjából. A minta injektálása után, amint a sáv elért egy bizonyos távolságot és az áramlást leállítottuk, az oszlopot megfordítottuk a rendelkezésre álló két perces parkolási idő alatt, majd az áramlás újraindítása után a tesztvegyületünk az oszlop ugyanazon végén eluálódott, mint ahol belépett (61).



7. ábra: Az oszlopforgatás sematikus ábrája. a) Az oszlop helyzete forgatás előtt és b) után.

7.2.1. Az oszloptöltés hatása a töltetheterogenitásra – mérési körülmények

Munkánk során hat fordított fázisú C₁₈-as oszlopot - három CORTECS és három XBridge - teszteltünk, amelyek kereskedelmi forgalomban is beszerezhetőek. Az oszlopotokat a cég által optimalizált körülmények között töltötték. Az oszlopok mérete 2,1 × 50, 100 és 150 mm volt. A CORTECS oszlopok esetében a töltet

1,6 μm átmérőjű tömörmagvú részecskékből, míg az XBridge oszlopok esetében 1,7 μm átmérőjű teljesen porózus részecskékből (BEH) állt.

A mérések során – az elméleti tányérmagasságok mérése esetén, a csúcsparkolásos és az oszlopforgatásos kísérletek során is - a mozgófázist HPLC minőségű acetonitril és víz (VWR International) 90:10% arányú (V/V) elegyítésével kaptuk. A minta minden esetben tiokarbamid volt, melyet analitikai tisztaságú sztenderdből készítettünk (Sigma Aldrich). Az oszlop termosztátot 25 °C-ra állítottuk be, miközben az injektált térfogat 0,2 μl volt minden mérésnél. A tiokarbamid koncentrációja 0,01 mg/ml volt, és a minta oldószere megegyezett az eluens összetételével.

7.2.2. Oszlopforgatásos mérések kivitelezése a pórusok hatásának kizárásával – mérési körülmények

A kromatográfias méréseket Shimadzu UFLC XR készülékkel végeztük. A rendszer egy kettős szivattyúból, automata mintaadagolóból, oszloptermostátból, egy diódasoros UV-detektorból (220 nm hullámhosszon) és egy számítógépes adatgyűjtő részegységből (LCSolution szoftverrel) épül fel. Munkánk során egy fordított fázisú Kinetex C₁₈-as oszlopot (4,6 × 100 mm, 2,6 μm -es tömörmagvú részecskék) teszteltünk, amelyet a Phenomenex Inc. bocsátott a rendelkezésünkre (Torrence, Kalifornia, USA).

A mérések során a mozgófázis HPLC minőségű acetonitril és víz keveréke volt (VWR International), melyhez trifluor-ecetsavat (Sigma Aldrich) adtunk ionpárpépző adalékként. A humán inzulin mintákat analitikai tisztaságú sztenderdből készítettük (Sigma Aldrich).

A csúcsparkoltatásos és oszlopforgatásos kísérletek során az eluensösszetétel 65% acetonitril és 35% víz volt, mely 0,1% trifluor-ecetsavat tartalmazott. Az áramlási sebességet 0,05 ml/perc-re állítottuk és az oszlopot 45 °C-ra termosztáltuk. Az injektált mintatérfogat 1,0 μl , míg az inzulin koncentrációja 0,5 mg/ml volt.

7.2.2.1. Taylor-Aris diszperzió makromolekulák esetén

Mivel az inzulin molekuláris diffúziója kb. egy nagyságrenddel kisebb, mint a kis molekuláké az áramlási sebesség jelentős csökkentésére volt szükség (0,05 ml/perc) az inzulin Taylor–Aris diszperziójának megfigyelésére az összekötő kapillárisokban (88), (89).

Amikor az áramlási sebesség olyan nagyságú, hogy az inzulinmolekuláknak nincs idejük a kapillárisok teljes keresztmetszetét bejárni, akkor az oszlopon kívüli sávszélesedés jelentős mértékben megnő.

A következő egyenlet szerint korlátozzuk az áramlási sebességet, hogy a mintánk bejárja a kapilláris teljes keresztmetszetét (90).

$$t_{capillary} > \frac{d^2}{D_m} \quad 8.1.$$

ahol $t_{capillary}$ a minta tartózkodási ideje a kapillárisokban, d a kapillárisok átmérője és D_m a molekula diffúziós együtthatója (90-92).

A Shimadzu készüléken a kapillárisok belső átmérője $d = 0,18$ mm, az inzulin molekuláris diffúziós együtthatója az adott mérési körülmények között $D_m = 2,94 \times 10^{-6}$ cm²/s, tehát az egyenlet a következőképpen alakul:

$$t_{capillary} > 110 \text{ s}$$

Ezért az áramlási sebességet $F_v = 0,05$ ml/percben határoztuk meg, így a kapillárisokban a tartózkodási idő 120 másodpercnek adódott, ami eleget tesz a fenti relációnak.

Ezenkívül hosszabb parkolási időt kellett alkalmazni a csúcsparkoltatásos és oszlopforgatásos kísérletekhez is. Amikor inzulint használtunk a parkolási idő 60 perc volt, ha még ennél is nagyobb fehérjéket (például BSA) használnánk, a parkolási időt még tovább kellene növelni, az áramlási sebességet pedig tovább kellene csökkenteni, mivel a molekuláris diffúziós együttható ($D_m = 9,65 \times 10^{-7}$ cm²/s) ez esetben még egy nagyságrenddel kisebb. Behelyettesítve a fenti egyenletbe 335 s adódik tartózkodási időnek, ami háromszorosa az inzulin esetéhez képest. Ezt viszont már a készülék adottságai sem tették lehetővé, mivel nem képesek a szivattyúk 0,025 ml/percnél kisebb áramlási sebességgel szállítani a mozgófázist.

Azt is meg kell jegyezni, hogy ez az elmélet hosszú, egyenes nyitott kapillárisban lévő mintacsúcsokra vonatkozik. Ha ez a cső rövidebb lesz, mint 30 elméleti tányér, akkor a csúcs nem lesz Gauss alakú és a hosszú kapillárisokra vonatkozó elmélet nem alkalmazható (93).

7.2.3. Számítások alapja az oszlopforgatásos mérések esetében

A vizsgálatok során a kromatográfiás csúcsok első abszolút és második centrális momentumait használtuk a számításokhoz (5.1. szakasz). A momentumokat úgy határoztuk meg, hogy exponenciálisan módosított Gauss (EMG) görbét (94) illesztettünk a mért adatpontokra 4.12. verziójú PeakFit szoftver segítségével. A készülék oszlopon kívüli térfogatát és az oszlopon kívüli sávszélesedést tiokarbamid injektálásával mértük, miközben az oszlopot egy nulla térfogatú összekötővel (zero dead volume union) helyettesítettük. Az oszlopforgatásos mérések esetében az első és a második momentumot is korrigáltuk az oszlopon kívüli hatások teljes kiküszöbölése érdekében.

7.3. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

A mérések során megvizsgáltunk öt már, nem használt oszlop be- és kimeneti fritjét szkennig elektronmikroszkóppal (JSM-6300 Scanning Microscope, Jeol, Japan) a Pécsi Tudományegyetem Központi Elektronmikroszkóp Laboratóriumában, hogy kiderítsük látunk-e bármilyen, a töltés hatásából eredő deformitást az oszlopok fritjein és a töltés szemcséin töredezettséget.

A vizsgált oszlopok jellemzői:

- Kinetex 2,6 μm C₁₈ 100 \times 4,6 mm (Phenomenex)
- Prodigy 5 μm C₁₈ 150 \times 4,6 mm (Phenomenex)
- Ascentis Express 2,7 μm C₁₈ 50 \times 2,1 mm (Supelco)
- Ascentis Express 2,7 μm C₁₈ 150 \times 3 mm (Supelco)
- InertSustainSwift 1,9 μm C₁₈ 50 \times 2,1 mm (GL Sciences)

8. Eredmények és megvitatásuk

Az elválasztástechnikában a fő cél, hogy gyors elválasztásokhoz jussunk, miközben a hatékonyság nem romlik. A folyadékromatográfiában két lehetőség áll a rendelkezésünkre, hogy ezeket a célokat teljesítsük. Az az állófázisok fejlesztése, a másik pedig a készülékek oszlopon kívüli térfogatának csökkentése.

Ma már az úgynevezett UHPLC készülékekkel magas nyomáson (1000 bar) 2 µm alatti szemcseátmérőjű állófázisokon végzett elválasztások ideje 1–2 percre csökkent úgy, hogy az elválasztás hatékonyságából sem veszítettünk.

Munkánk során ilyen új típusú teljesen porózus szemcséjű, tömörmagvú, és monolit C₁₈-as állófázisokat hasonlítottunk össze kémiai tulajdonságaik szempontjából.

Vizsgáltunk különböző oszlopgeometriával rendelkező teljesen porózus és tömörmagvú oszlopokat heterogenitásuk szempontjából és meghatároztuk az oszlophardverek hozzájárulását a csúcscsúszélesedéshez.

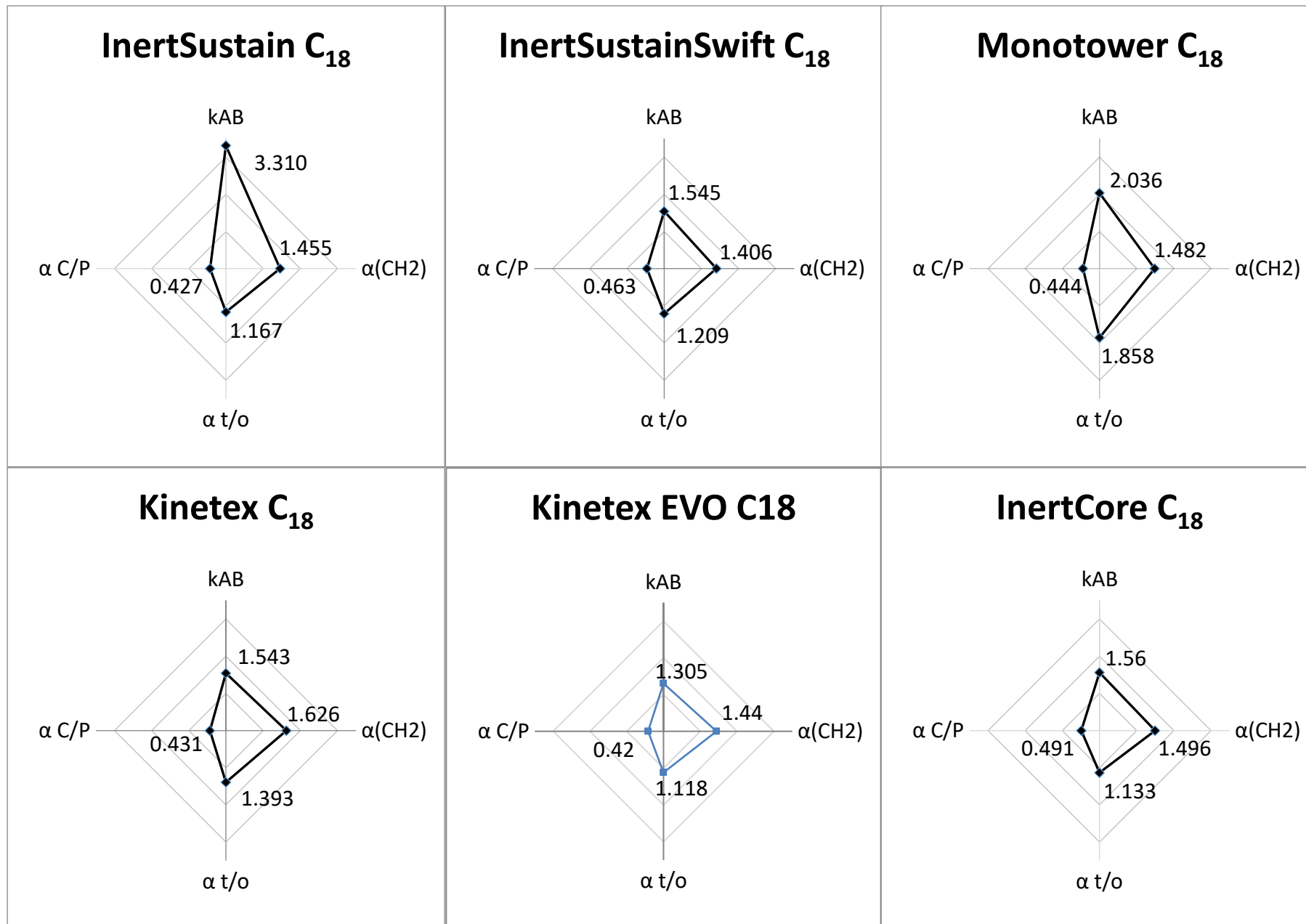
Ezen eredmények ismertetése következik az alábbi szakszokban.

8.1. A Tanaka-teszt eredményei és a szilanolhatás vizsgálatának eredményei

A Tanaka-teszt eredményeit az 5. táblázat és a 7. ábra foglalja össze - retenciósfaktorokat és az adott komponensek közötti elválasztási tényezőket – a hatkromatográfiás oszlop esetében.

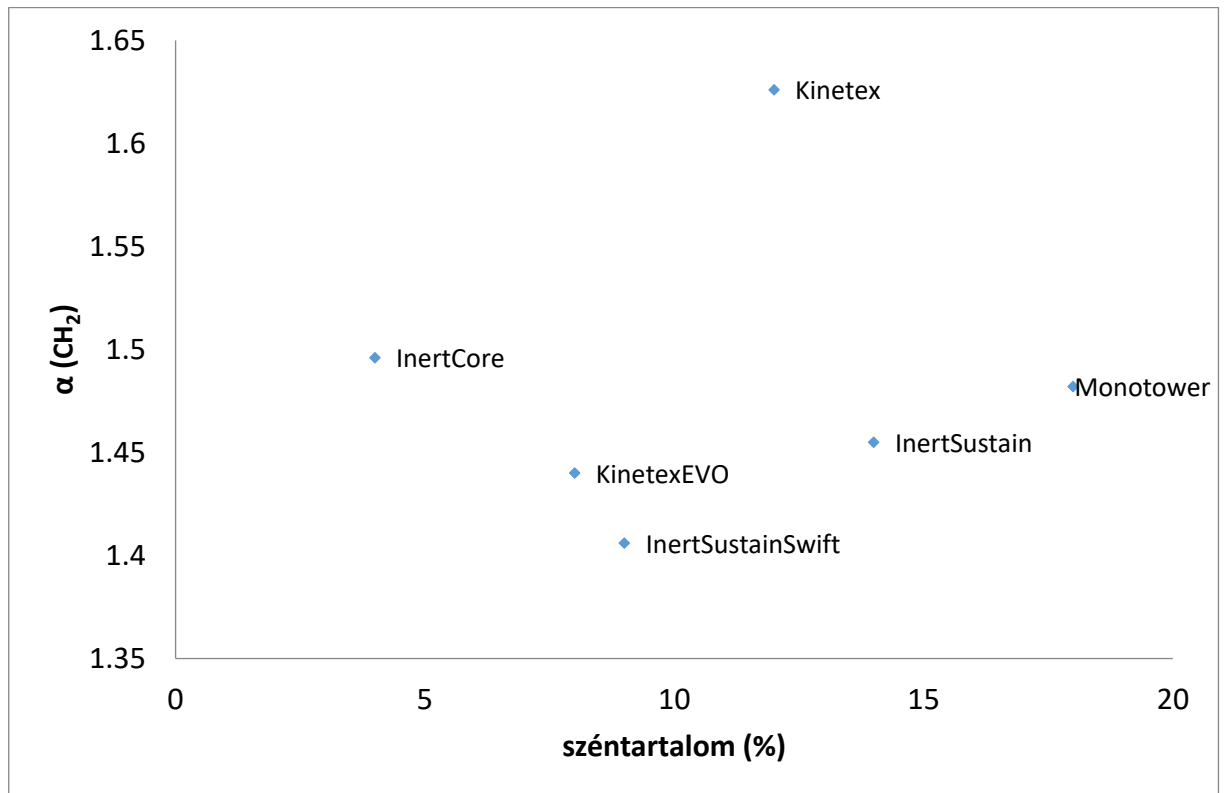
5. táblázat: A megfigyelt állófázis jellemzők

oszlop	k_{AB}	$\alpha_{(CH_2)}$	$\frac{\alpha_t}{\sigma}$	$\frac{\alpha_c}{\bar{P}}$
InertSustainSwift	1,545	1,406	1,209	0,463
InertSustain	3,310	1,455	1,167	0,427
InertCore	1,560	1,496	1,133	0,491
MonoTower	2,036	1,482	1,858	0,444
Kinetex	1,543	1,626	1,393	0,431
Kinetex EVO	1,305	1,440	1,118	0,420



8. ábra: A Tanaka-teszt eredményei

Az állófázisok tulajdonságai közötti különbségek jól láthatók a 8. ábra sugárszerű elrendezése alapján. A 9. ábra az $\alpha_{(CH_2)}$ értékeket mutatja az állófázis széntartalmának függvényében, melynek adatai az 2. és az 5. táblázaton alapulnak.



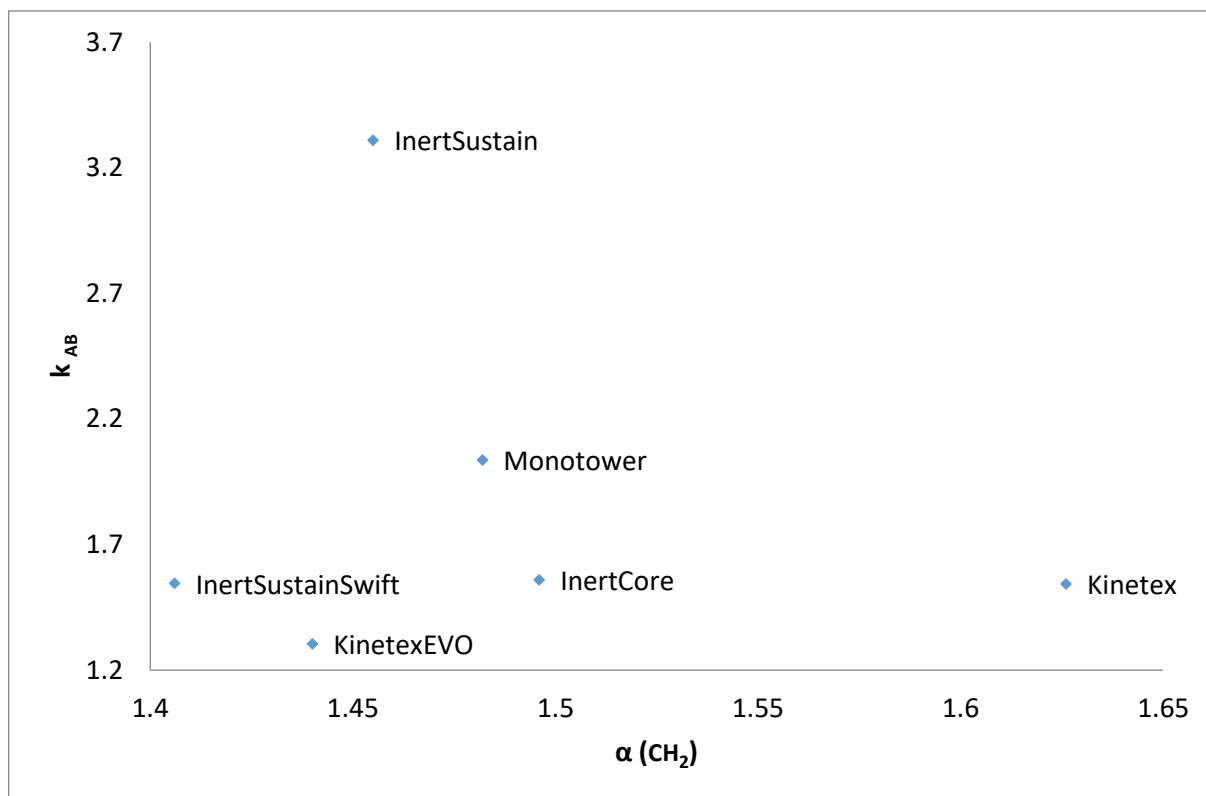
9. ábra: Az állófázis széntartalma a hidrofobicitás függvényében

Az ábra alapján nem tudunk megfigyelni közvetlen összefüggést a széntartalom és az $\alpha_{(CH_2)}$ között. Ez abból adódik, hogy a $\alpha_{(CH_2)}$ értéke a hidrofobicitást pontosabban jellemzi a széntartalomnál, mivel a tesztvegyületünk metilén csoportja minimális sztérikus kölcsönhatást mutat az állófázisokkal. A széntartalom nagyban függ a szilikagél típusától, melyet állófázis előállításához használtak. Az általunk tesztelt állófázisokat különféle típusú szilikagélből készítették, éppen ezért a továbbiakban az $\alpha_{(CH_2)}$ értékét használjuk az állófázisok jellemzésére (38).

Az $\alpha_{(CH_2)}$ (lásd az 5. táblázatot) arányosan változik a felület borítottságával és az „end-capp”-elés jóságával. A nagyobb felületi lefedettséget a nagyobb $\alpha_{(CH_2)}$ értéke jelzi. Mivel a mérések hasonló eredményeket adtak a pentilbenzol és a

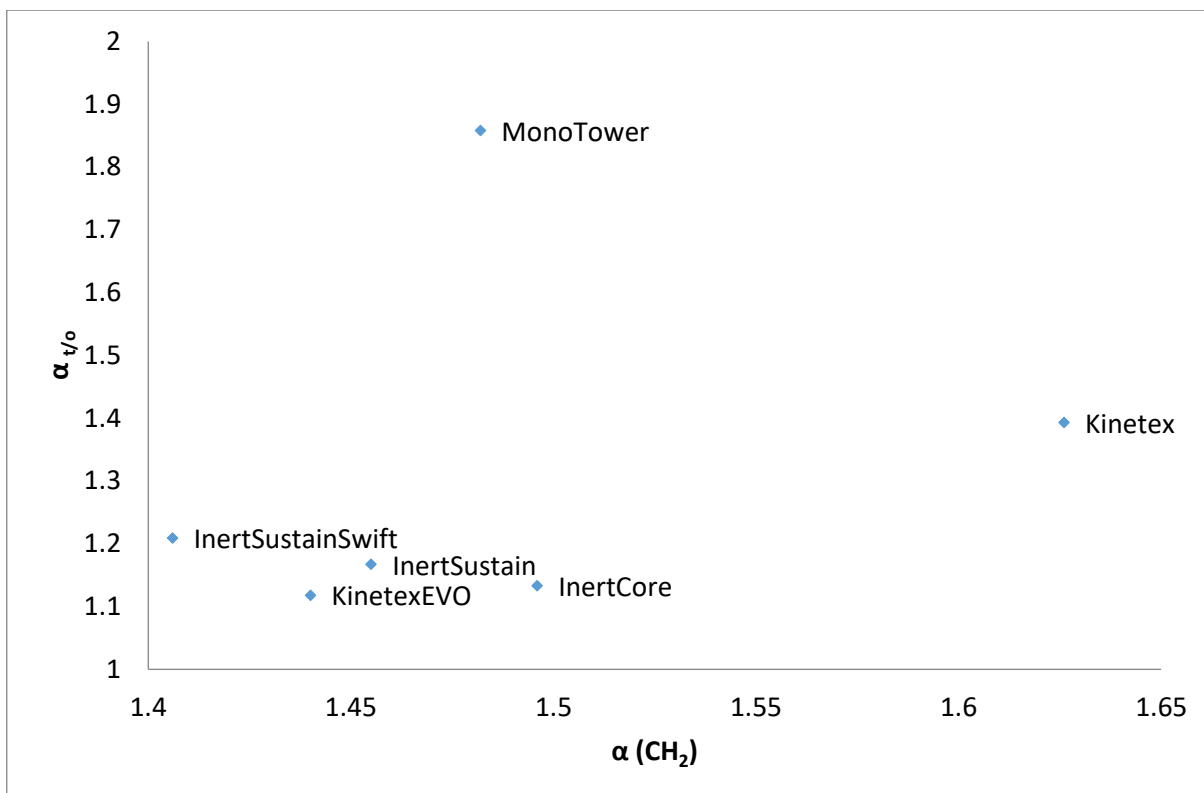
butilbenzol retenciós tényezőjének arányát illetően, hasonló felületi lefedettség feltételezhető ezen hat oszlop esetében.

Az $\alpha_{(CH_2)}$ és a k_{AB} kapcsolata információt hordoz a szilikagél felületéről vagy a hozzá kötött ligandumok (C₁₈-as csoportok) mennyiségéről (lásd 10. ábra) (38). A vizsgált oszlopok közül az InertSustain kimagasló visszatartást mutatott, ami arra utal, hogy ennek az oszlopnak van a legnagyobb felülete.



10. ábra: Az alkil láncok mennyisége (k_{AB}) és a hidrofobicitás ($\alpha_{(CH_2)}$) függvényében

A 11. ábra mutatja a $\alpha_{t/o}$ értékét a $\alpha_{(CH_2)}$ függvényében. A teljesen porózus töltetű oszlopok (InertSustain, InertSustainSwift) és a tömörmagvú töltetek (InertCore, Kinetex, Kinetex EVO) mutattak hasonló sztérikus szelektivitást. A legjobb eredményt azonban a MonoTower oszloppal lehetett elérni.

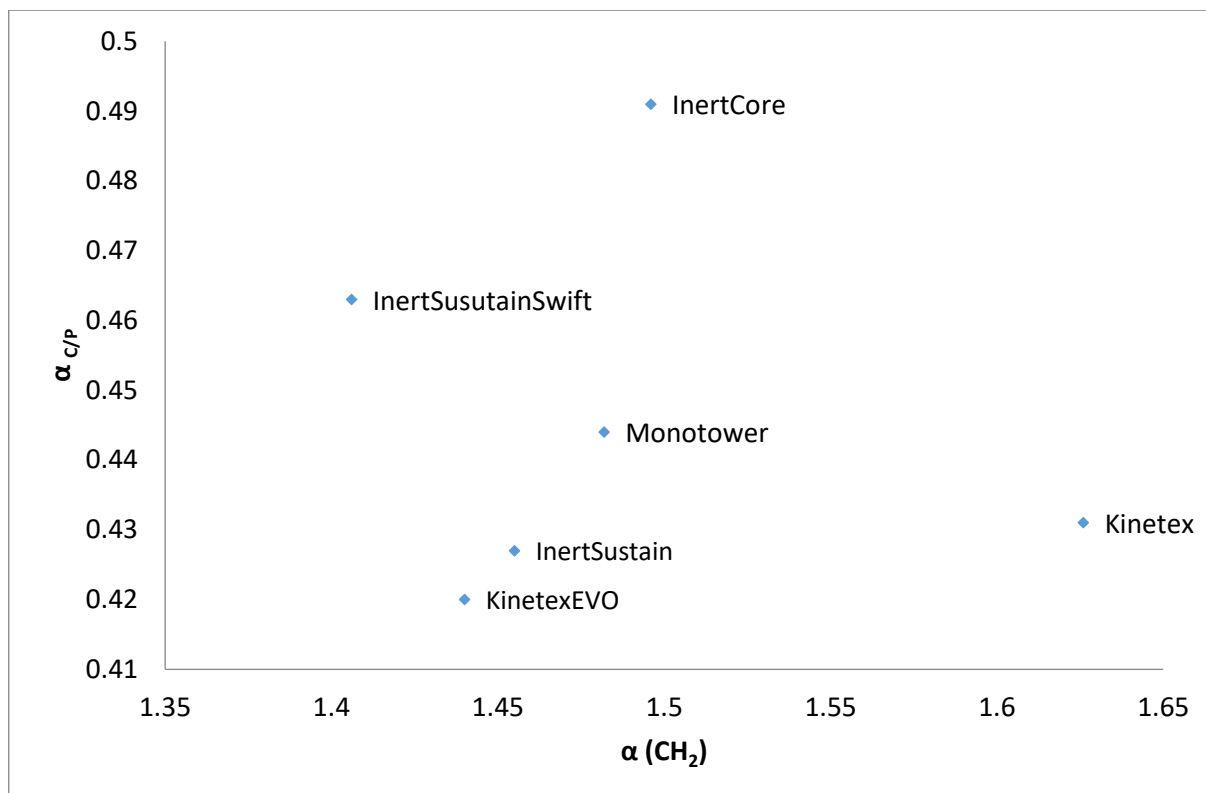


11. ábra: A sztérikus szelektivitás ($\alpha_{t/o}$) a hidrofobicitás ($\alpha_{(CH_2)}$) függvényében

Az oszlopok meglehetősen hasonló hidrogénkötési kapacitást ($\alpha_{C/P}$) mutattak a koffein fenolhoz viszonyított visszatartása alapján. A koffein retenciós értéke információt hordoz a szilika felületén maradt szilanolcsoportok mennyiségéről. A koffein nagyobb visszatartása a fenolhoz viszonyítva nagyobb mennyiségű fennmaradt szilanol jelenlétét jelzi.

A 12. ábra a $\alpha_{C/P}$ -t mutatja az $\alpha_{(CH_2)}$ -vel szemben a különböző oszlopok hidrofób tulajdonságainak meghatározása céljából. A vizsgált oszlopok esetében a hidrofób tulajdonságok meglehetősen hasonlóak.

Mivel ezek az állófázisok bázis-deaktiváltak, ezért mutatnak hasonló $\alpha_{C/P}$ értékeket ezzel a hagyományos vizsgálattal. Emiatt kellett érzékenyebb testvegyületeket kiválasztanunk, hogy pontosan meghatározzuk a szabad szilanolcsoportok hatását.



12. ábra: A hidrogénkötő kapacitás ($\alpha_{C/P}$) a hidrofobicitás ($\alpha_{(CH_2)}$) függvényében

A szilanolhatás vizsgálatához használt minták összetétele a 4. táblázatban láthatóak, az eredményeket pedig a 6. és 7. táblázat és a 13. ábra tartalmazza. A hagyományos tesztvegyületekkel végzett mérések eredményei a következőképpen alakultak. A koffein poláris jellege miatt alkalmas vegyület a szilikagél felületén visszamaradt szilanolcsoportok hatásának vizsgálatára. Valamennyi vizsgált oszlop hasonló eredményt mutatott enyhe tailinggel ($T_f < 2$) koffein esetében és a relatív retenciók faktorok (a fenolhoz viszonyítva) szintén hasonlóak voltak, $\alpha_{C/P} < 0,16$. (Az előző fejezet $\alpha_{C/P}$ értékei az alkalmazott eluens miatt eltérőek. Lásd a 7.1.4. szakaszban.)

A kísérletek során alkalmazott másik komponens a piridin volt. A piridin egy bázis, amely semleges karakterű mozgófázis alkalmazásakor ionizált formában van jelen. A bázis-deaktivált (GL-Sciences) oszlopok feltűnően jó eredményeket mutattak, elhanyagolható tailing értékekkel ($T_f < 2$), miközben a fenolra vonatkoztatott relatív retenciója, $\frac{k_{pyr}}{k_{ph}}$ nagyobbak bizonyult, mint 0,4.

Egy másik szokásos tesztvegyület volt az amitriptilin. Ez a vegyület bázikus jellegű, és hidrofób, hidrophil tulajdonságokkal is rendelkezik. Ezt a vegyületet évtizedeken át használták csúcsalakja alapján a szilanol-hatás jellemzésére (42),

(95). Az összes tesztelt oszlopon az amitriptilin nagy retenciót mutatott, $11 < \frac{k_{Ami}}{k_{Ph}} < 33$. A tailing értékek jónak bizonyultak az InertSustain és a Monotower oszlopoknál ($T_f < 2$), de a Kinetex vagy az InertSustainSwift és az InertCore oszlopok esetében jelentős tailingesedést figyeltünk meg. Ebben az esetben a szilanollokkal való másodlagos kölcsönhatás jelentősebbnek bizonyult. Az InertSustain és a Monotower oszlopok jobb teljesítménye a nagyobb felületüknek köszönhető.

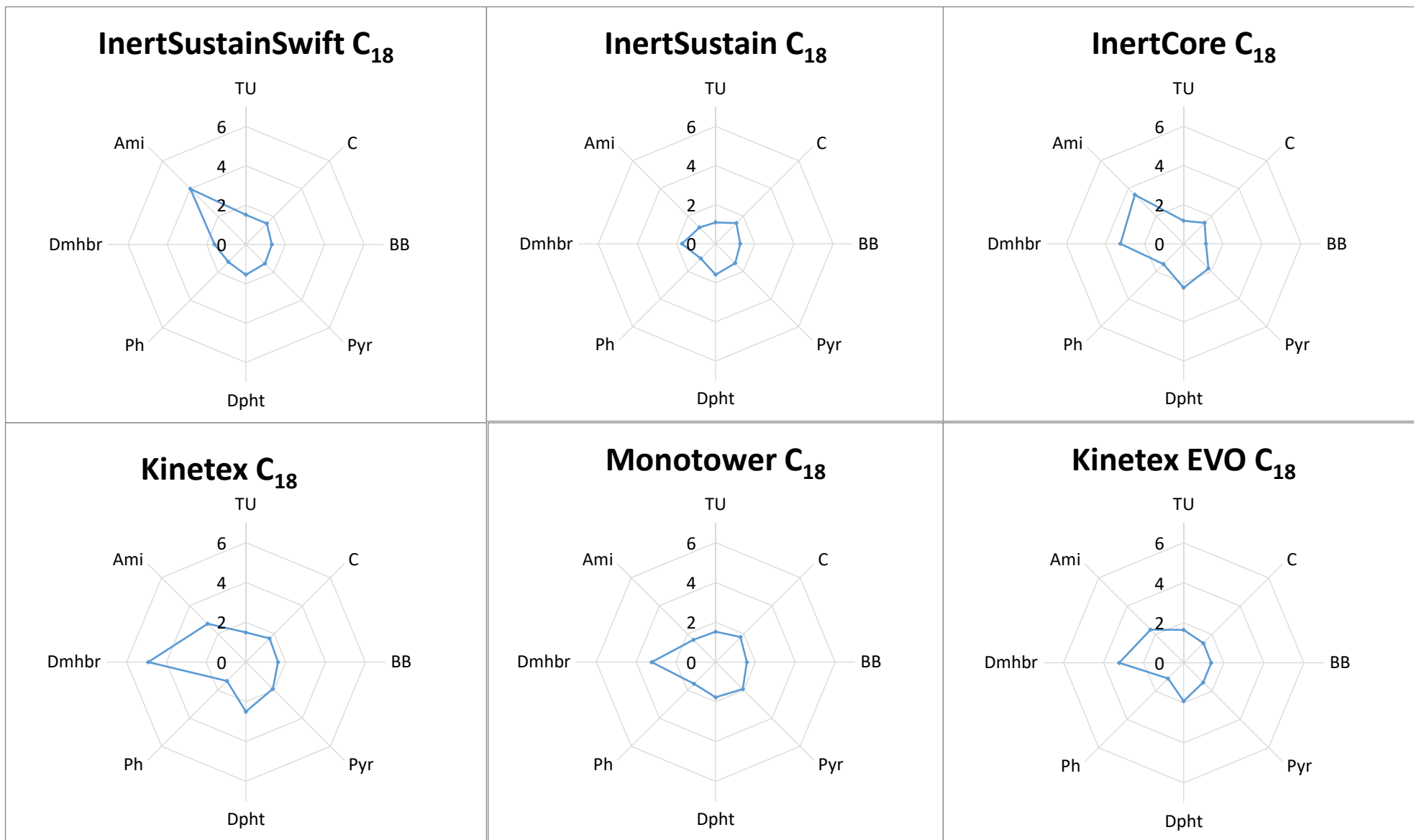
A fent említett eredmények alapján ezek a hagyományos tesztvegyületek nem lesznek túlságosan hasznosak a bázis-deaktivált modern állófázisok jellemzésére, mert az oszlopok túl jó teljesítményt nyújtanak ezekben az esetekben. Az oszlopok közötti különbségtételhez érzékenyebb vizsgálati vegyületeket kell alkalmazni, ezt a következő szakaszban részletezem.

6. táblázat: A 3. táblázatban definiált minták USP tailing értékei a különböző oszlopok esetében

USP T _f	InertSustainSwift C ₁₈	InertSustain C ₁₈	InertCore C ₁₈	MonoTower C ₁₈	Kinetex C ₁₈	Kinetex EVO C ₁₈
tiokarbamid	1,059	1,086	1,175	1,526	1,489	1,645
koffein	1,504	1,487	1,504	1,770	1,687	1,392
brillantkék	1,317	1,259	1,139	1,568	1,612	1,374
piridin	1,373	1,412	1,788	1,920	1,909	1,380
dextrorfán	1,539	1,584	2,254	1,774	2,492	1,912
fenol	1,254	1,072	1,466	1,547	1,353	1,110
dextrometorfán	1,600	1,726	3,234	3,218	4,911	3,223
amitriptilin	3,998	1,173	3,530	1,576	2,723	2,341

7. táblázat: A tesztkomponensek relatív retenciósfaktora (fenolhoz viszonyítva)

USP tailing faktor	$\alpha_{C/P}$	$\frac{k_{BB}}{k_{Ph}}$	$\frac{k_{pyr}}{k_{Ph}}$	$\frac{k_{Dpht}}{k_{Ph}}$	$\frac{k_{Dmhbr}}{k_{Ph}}$	$\frac{k_{Ami}}{k_{Ph}}$	$\frac{k_Q}{k_{Ph}}$
InertSustainSwift C ₁₈	0,156	0,268	0,298	0,432	2,278	11,805	1,590
InertSustain C ₁₈	0,148	0,259	0,332	0,328	2,078	13,123	4,783
InertCore C ₁₈	0,137	0,094	0,325	0,731	3,594	23,425	4,231
MonoTower C ₁₈	0,153	0,153	0,398	2,577	12,931	32,985	18,790
Kinetex C ₁₈	0,146	0,157	0,361	0,493	3,244	15,507	20,964
Kinetex EVO C ₁₈	0,134	0,164	0,298	0,377	2,006	11,395	4,375



13. ábra: USP tailing értékek a különböző tesztkomponensek esetén (6. táblázat alapján)

Érzékenyebb tesztvegyületek esetében az eredmények a következőképpen alakultak. A dextrometorfán és metabolitja, a dextrorfán bázikus vegyületek némi szerkezeti különbséggel (lásd 6. ábra). A dextrorfán hidroxilcsoporttal rendelkezik a dextrometorfánon található metoxicsoport helyett. Ez a különbség okozza molekulák retenciós viselkedésében megfigyelhető eltéréseket. Az elúciós sorrendet a fenolos hidroxilcsoport befolyásolja (taszítás a PhO^- és SiO^- csoportok között), amely a szilanol-hatás csökkentésével befolyásolja (csökkenti) a dextrorfán retenciós tényezőjét. Ezért a dextrometorfán érzékenyebb a szilanolcsoportokra a dextrorfánhoz képest.

A szilanol-hatás mellett a felület nagysága is befolyásolhatja ezen vegyületek retenciós tényezőit (42, 96).

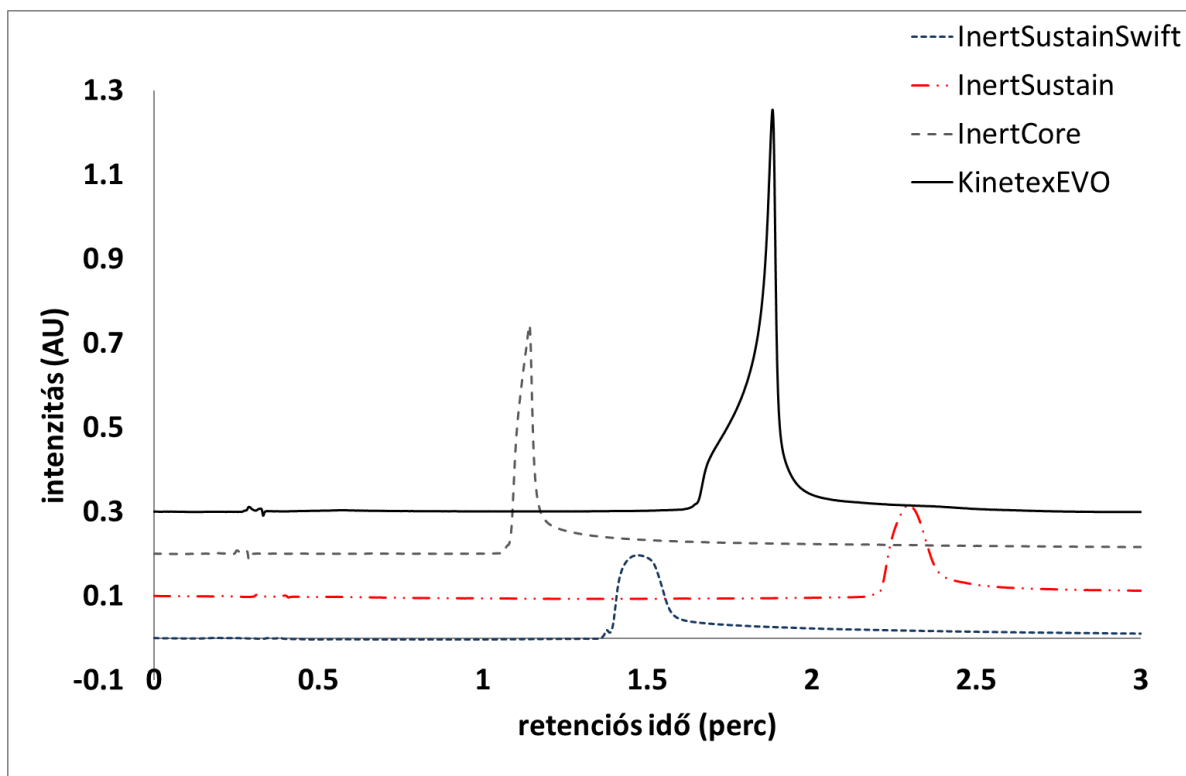
A legjobb csúcsalakokat mindkét vegyület esetén az InertSustain és InertSustainSwift oszlopok produkálták (lásd az 6. táblázat). A MonoTower oszlopon a dextrorfán elfogadható tailing értéket mutatott, azonban a dextrometorfán sokkal rosszabbat, túl nagy retenciós tényező ($k > 12$) mellett.

A másik három maghéj típusú oszlop kevésbé kedvező tailing értékeket mutatott ezen két tesztvegyület esetén a következő sorrend szerint (lásd az 6. táblázat): Kinetex EVO < InertCore < Kinetex.

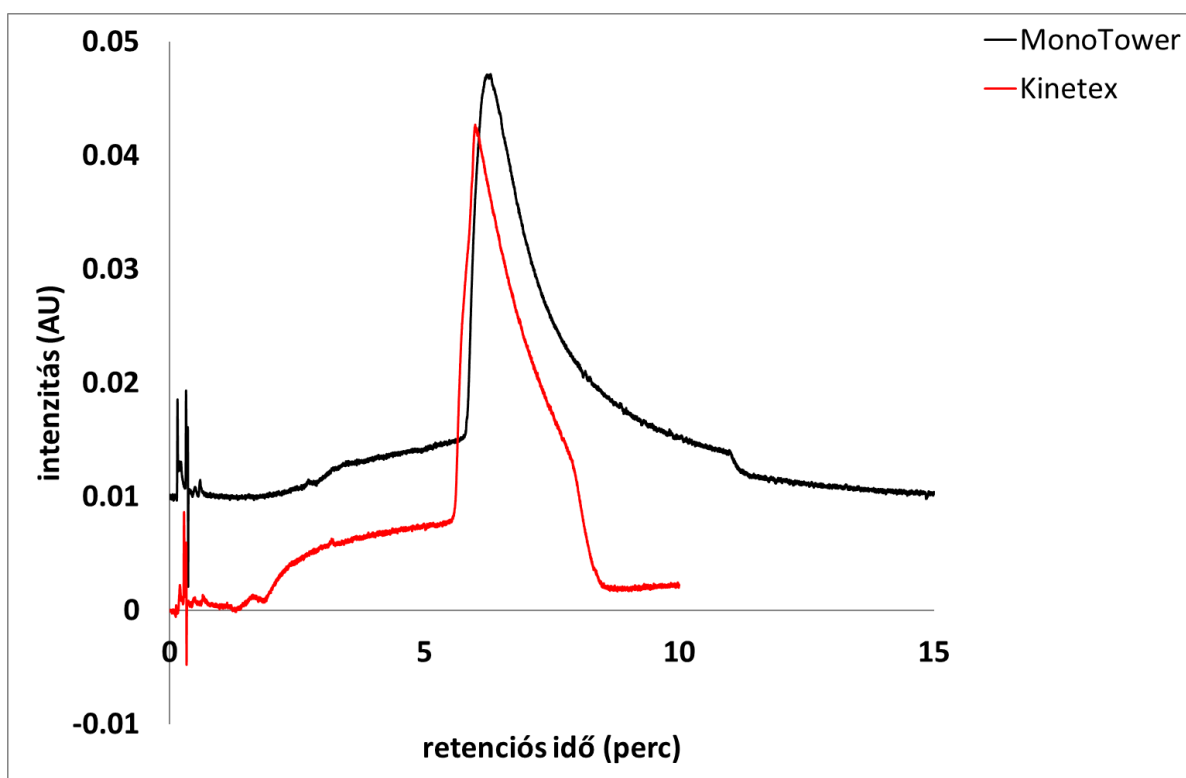
Az oszlopok átfogóbb jellemzése érdekében savas karakterű vegyületet is használtunk a tesztek során annak modellezésére, amikor a savas és a bázikus vegyületek elválasztása egyidejűleg szükséges. Erre a célra savas tesztkomponensként brillantkék FCF-et alkalmaztunk (42). A molekula három szulfonsavcsoportot tartalmaz, ezért ha a szilikagél felülete kissé bázikus, akkor a tailingesedés figyelhető meg. A brillantkéssel végzett mérések jó eredményt mutattak az összes oszlop esetében. Nem mutattak túl nagy retenciót, miközben a csúcsalakok is megfelelőnek bizonyultak minden vizsgált oszlopon. A legjobb csúcsalakokat az InertSustain és az InertSustainSwift oszlopok adták (lásd az 6. táblázat). Bár az InertCore oszlop adta a legkisebb aszimmetriát, túl kicsi volt a retenciós érték is. Ezért a kis aszimmetria értéke az állófázishoz való gyenge kötődésből származhat.

A kinuklidin (1-azabicyclo-[2,2,2]-oktán) számos természetes fiziológiailag aktív anyag és szintetikus gyógyászati készítmény szerkezeti alapja. Ez a vegyület telített biciklusos rendszerű, nitrogénatommal a központjában. Ennek a nitrogénatomnak köszönhetően - amelynek nem kötődő elektronpárja van, és

amelyet a szomszédos hidrogénatom nem árnyékol - a kinuklidinnak szerkezetéből adódóan sajátos jellege van. A szerkezet ezen jellemzői a kinuklidinnak és származékainak számos fizikai és kémiai tulajdonságát magyarázhatják. A tercier aminokkal és az N-szubsztituált piperidinekkel ellentétben a kinuklidinnek merev szerkezete van. A hattagú gyűrűk ebben a szerkezetben rögzített „csónakformával” rendelkeznek, és ezek a gyűrűk nem képesek megváltoztatni relatív helyzetüket a kötéseik körüli elfordulásukkal (97), (98). A többi tesztmolekulával ellentétben a kinuklidinnel végzett méréseink teljesen más eredményeket mutattak. A minta koncentráltabb (2,5 mg/ml) volt, és nem tartalmazott tiokarbamidot, mert ezt a két komponenst nem tudtuk együtt kimutatni. Az irodalomban említik a kinuklidin – tiokarbamid-zárvány vegyület metanolban történő képződését. Lehetséges, hogy ez a zárványvegyület vizes acetonnitrilben is jelen lehet (99). Foszfátpuffer helyett vizet kellett használnunk, mert a kinuklidin UV-abszorpciója csak nagyon alacsony hullámhosszon (190–200 nm) mérhető, és a puffer interferenciát okozhat ebben a tartományban. Ezért a mozgófázis 90% víz és 10% acetonnitril keveréke volt. Az injektált térfogat 2 µL volt. Az áramlási sebesség ugyanúgy 0,4 ml / perc volt, mint a többi mintánál. A 14. és 15. ábrán a csúcsok alakjából látható, hogy túlterheltük az oszlopokat, viszont ha ennél kisebb injektált térfogatot használtunk, nem kaptunk kimutatható csúcsokat. Ilyen csúcsalakok mellett nem értékeltük a kinuklidin tailing értékeit, ebben az esetben csak a retenciós tényezők adtak információt a szilanolokról. Jelentős különbséget tudtunk megfigyelni az oszlopok között. A kinuklidin szempontjából a legjobb csúcsalakokat az InertCore, InertSustain és InertSustainSwift oszlopok adták. A Kinetex EVO mutatta a legnagyobb intenzitást elfogadható csúcsalak mellett. A retenciós tényezők meglehetősen hasonlóak voltak az InertSustain, InertCore és Kinetex EVO oszlopoknál. A MonoTower és a Kinetex oszlopok csúcsalakjai voltak a legrosszabbak, a legkisebb intenzitással és emellett mindkét oszlop nagy retenciót mutatott kinuklidinra. Úgy tűnik, hogy a kinuklidin nagyon érzékeny vegyület a szilanol aktivitásának vizsgálatára, de nem tipikus tesztmolekula, mivel az állófázisokhoz is erősen kötődik.



14. ábra: Kinuklidin esetén tapasztalt csúcsalakok



15. ábra: Kinuklidin esetén tapasztalt csúcsalakok

8.2. Az oszlopforgatás eredményei

8.2.1. Az oszloptöltés hatása a töltetheterogenitásra

A vizsgált oszlopok tesztje során az első lépés a $H - u$ görbék felvétele és azok alapján az optimális tányérmagasság értékeinek meghatározása volt. Mintaként tiokarbamidot használva meghatároztuk az egyes oszlopok optimális áramlási sebességét a későbbi mérésekhez. Az áramlási sebesség 0,05 és 0,6 ml/perc között változott (kivéve a 15 cm hosszú oszlopokat - ebben az esetben a maximális áramlási sebesség 0,35 ml/perc volt, a maximális nyomásértéket szem előtt tartva). A minimális tányérmagasság értékeket és a tányérszámok maximális értékeit a 8. táblázat tartalmazza. A $H-u$ görbék a 17. ábrán láthatóak. Az eredmények alapján a 0,25 ml/perces áramlási sebesség értéket választottuk a további mérésekhez, mivel az oszlopok optimuma 0,2–0,3 ml/perc áramlási sebesség körül volt.

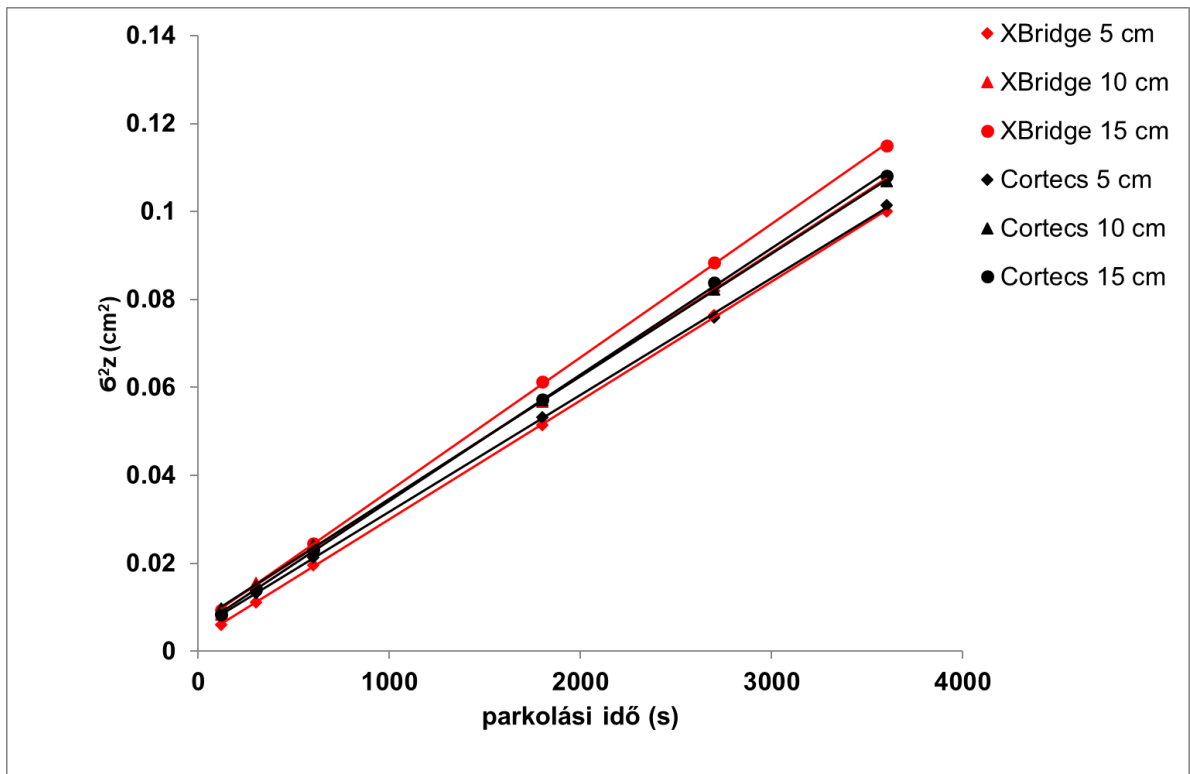
A csúcsparkoltatásos mérések során a mintát miután eluáltuk az oszlopról ($F_v = 0,25$ ml/perc), akkor a mintasáv elérte az oszlop közepét és letelt az ún. parkolási idő (2, 5, 10, 30,45 vagy 60 perc), mely során a mintasáv diffundált az oszlopban.

A csúcsparkoltatásos módszer részletei az 5.3. szakaszban olvashatóak, a kísérletek eredményeit pedig az 16. ábra mutatja.

A különböző oszlopok meglehetősen hasonló effektív diffúziós értékeket mutattak, $D_{eff} = 1,03 - 1,35 \times 10^{-5}$ cm²/s között. A 15. ábra egyenesének egyenlete alapján kiszámítottuk a választott parkolási időhöz tartozó (120 s) $\sigma^2_{V, park}$ értékeket a 5.23. egyenlet segítségével és az eredményeket μ^2 egységekre konvertáltuk.

A további számítások során ezeket a $\sigma^2_{V, park}$ -os értékeket használtuk a többi sávszélesítő hatás meghatározására a 5.25. egyenlet alapján. Az eredményeket a 9. táblázatban foglaltuk össze. Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a csúcsparkoltatásnak körülbelül 50%-kal kisebb a sávszélesítő hatása (μ^2 -ben kifejezve) a tömörmagvú részecskékkel töltött oszlopokban, a teljesen porózus részecskékkel töltött oszlopokhoz képest. Ezeket az eredményeket vártuk, mert az oszlop térfogatának 20%-át tömörmagok töltik ki (lásd a 8. táblázatot), amelyeket nem tud átjárni a mozgófázis, így a gömb alakú magok jelenléte az axiális diffúziót gátolja (100).

A fennmaradó 30%-os különbség a tömörmagvú részecskék kisebb porozitásából származhat (101).

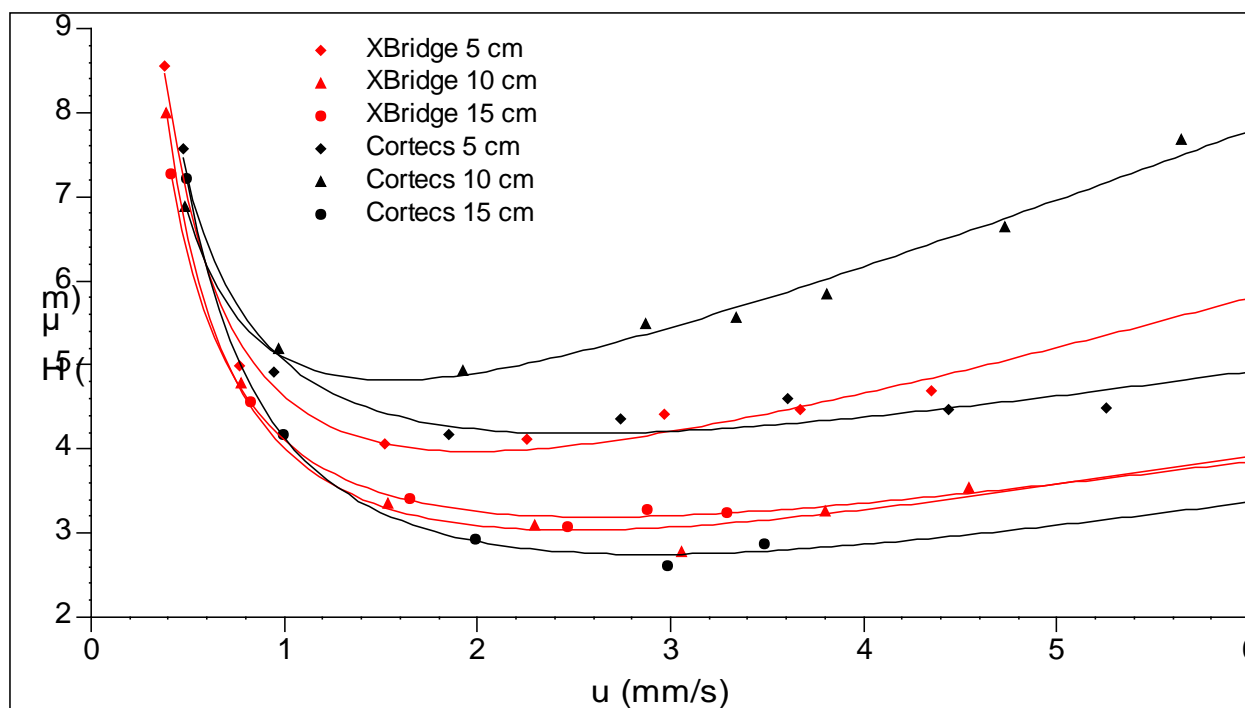


16. ábra: A csúcsparkoltatásos mérések eredményei a különböző oszlopok esetében

Az oszlopforgatást az oszlopok különböző szeleteinél végeztük el az oszlop végeinél (fritek és a közelükben lévő töltet) bekövetkező sávszélesedés jellemzésére. A mért értékeket korigáltuk minden esetben az oszlopon kívüli sávszélesedéssel, mely erre az UPLC rendszerre, az adott mérési körülmények között $0,73 \mu\text{l}^2$ -nek adódott.

8. táblázat: A vizsgált oszlopok jellemzői és kinetikus teljesítményük az alkalmazott eluens-összetételre és áramlási sebességre vonatkozóan

Oszlop	d_p [μm]	Mozgófázis térfogata [μl]	Porozitás	Optimális áramlási sebesség [ml/perc]	N_{opt}	H_{min} [μm]
XBridge 5cm	1,7	97,6	0,56	0,2	12 300	4,1
XBridge 10 cm	1,7	203,6	0,58	0,3	32 300	3,1
XBridge 15 cm	1,7	289,4	0,55	0,3	48 700	3,1
Cortecs 5cm	1,6	78,6	0,45	0,2	12 000	4,2
Cortecs 10 cm	1,6	161,1	0,46	0,2	20 200	4,9
Cortecs 15 cm	1,6	237,9	0,46	0,3	57 300	2,6



17. ábra: A tiokarbamid megfigyelt tányérmagasság értékei a vizsgált oszlopokon 90:10 ACN:H₂O eluens alkalmazásával

Az oszlopforgatásos mérések mellett, forgatás nélkül is elvégeztük a kísérletet két perces parkolási idővel az oszlop be- és kimeneténél egyaránt. Ezen mérések alapján határoztuk meg a teljes sávszélesedési értékeket (σ^2_{total}), melyeket a további számításokhoz használtunk a 6.25. egyenlet alapján.

A mérések során csúcskompressziós hatást figyeltünk meg. A megfordított áramlásnál megfigyelt csúcsok mindig keskenyebbek és szimmetrikusabbak, mint az áramlás megfordítása nélkül kapott csúcsok. Ez a sokcsatornás diszperziós hatás kompenzációjából és az áramlás sugárirányú heterogenitásából származik (46, 61).

Az áramlás megfordításakor a molekulák ugyanazon a csatornán haladnak előre és hátra, a csatornák közötti vándorlás hatása mérséklődik, így lesznek keskenyebbek és szimmetrikusabbak a csúcsok, mint az áramlás megfordítása nélkül kapott csúcsok.

Tiokarbamid esetén két perc parkolási idő elegendő az oszlop teljes keresztmetszetén végbemenő diffúzióhoz és az oszlop megfordításához is. Kis molekulák esetén a parkolási időnek nincs további hatása a méréseinkre. Amikor a hosszirányú varianciát a megtett távolság függvényében ábrázoljuk, a görbék meredekségéből meghatározható az oszlopok lokális tányérmagassága (tisztán a töltetágyra vonatkozó tányérmagasság). A görbék tengelymetszete pedig megadja az oszlopvégek (fitting, fritek és az oszlopközeli töltet heterogenitása) sávszélesedéshez való hozzájárulását (lásd 6.28. egyenlet) a parkolásból eredő sávszélesedéssel való korrigálás után.

Az eredményeket térfogatbeli variancia egységekben (μl^2) fejeztük ki és a 9. táblázatban láthatóak. Az oszlop közepén különböző szimbólummal ábrázolt értéket (σ^2_{total}), akkor kaptuk, amikor az áramlást két percre megállítottuk, de az oszlopot nem fordítottuk meg, ilyenkor kompressziós hatás nem figyelhető meg. Az ábrázolt görbék nagyjából párhuzamosan futnak, azonban a lokális tányérmagasság értékekben minden esetben találtunk különbséget. A legjelentősebb különbségeket a leghosszabb oszlopok (15 cm hosszú XBridge és Cortecs oszlopok) esetében észleltük (18. ábra). Továbbá növekvő tendencia figyelhető meg a lokális tányérmagasságokban (lásd a 19. és 20. ábrát) az oszlopok hosszának növekedésével, kivéve a 10 cm hosszú Cortecs oszlop bemeneti méréseinél, de ez az oszlop szokatlan viselkedést mutatott már a H – u görbék felvételénél is.

Ezek az ábrák a lokális tányérmagasságok közötti különbségeket is mutatják ($H_{forward}$, amikor az oszlopot a gyártó által ajánlott irányban, és $H_{backward}$, amikor az oszlopot az ajánlottal ellentétesen használtuk), amelyeket az oszlopforgatásos módszerrel kaptunk és a teljes tányérmagasság értékeket (ezek tartalmazzák az oszlopvégek hatását is), melyeket a H - u görbe (H_{column}) felvételekor mértünk. Minél rövidebb az oszlop, annál nagyobbak a különbségek a $H_{forward}$ vagy a $H_{backward}$ és a H_{column} értékek között, kivéve a 10 cm hosszú Cortecs oszlop és a 15 -cm hosszú XBridge oszlop esetén. Ezek a különbségek a friték és az oszlop végénél lévő töltet szerkezetének hatását mutatják az oszlop fritjeihez közel, amelyek nagyobbak a Cortecs oszlopoknál. A σ_{bed}^2 értékek sokkal kisebbek voltak a Cortecs oszlopoknál, mint az XBridge oszlopoknál, a teljesen porózus részecskék jellege miatt. Gritti és munkatársai 2015-ben megbecsülték a 2,1 mm-es belső átmérővel rendelkező 5 cm hosszú Cortecs C₁₈ 1,6 μm és az XBridge C₁₈ 1,7 μm oszlopok lokális redukált tányérmagasság értékeit. Ezek értéke 0,7 és 1,2, közé esett nem visszatartott vegyület esetében (78).

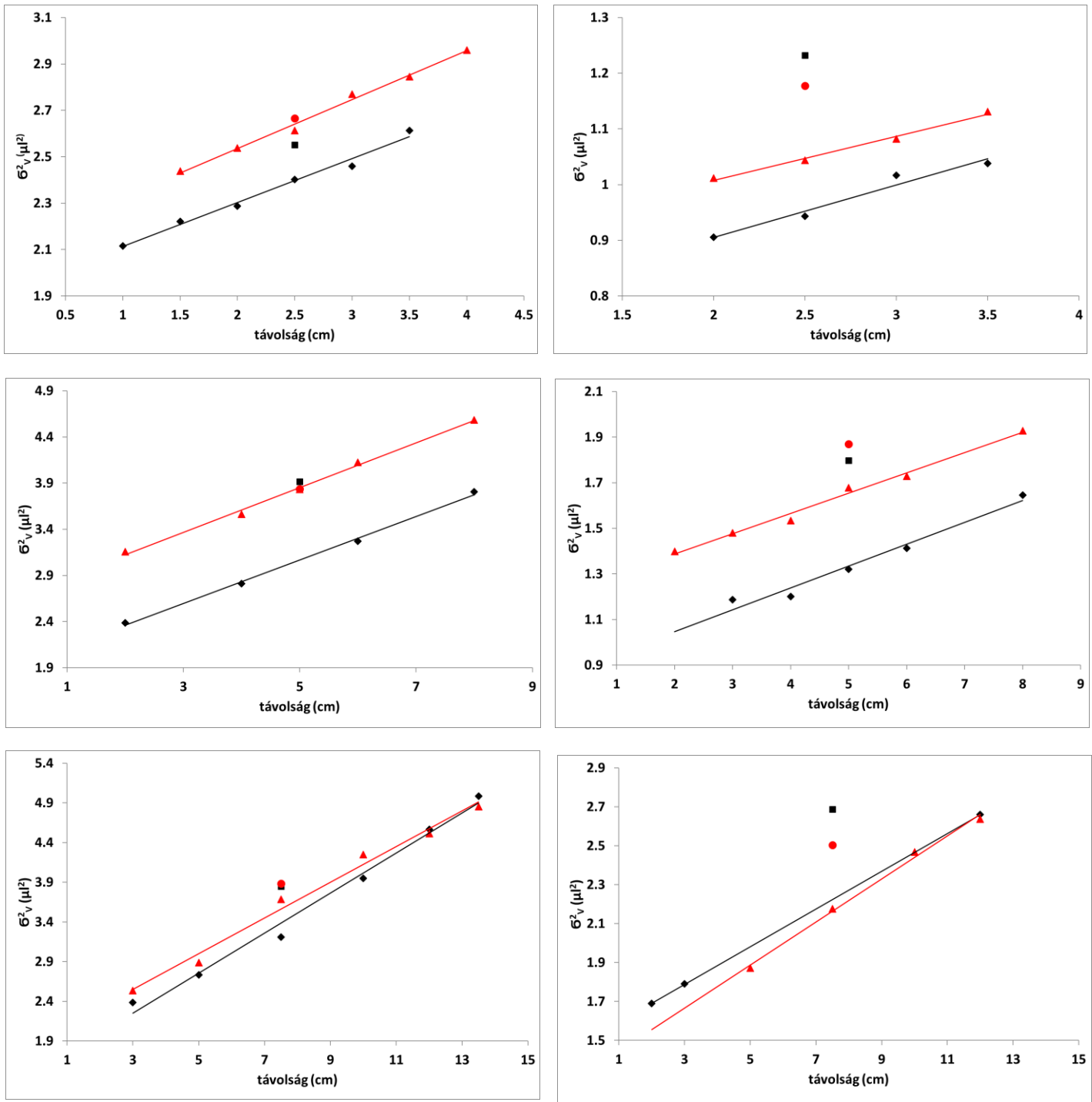
Jelen munkánk megerősítette ezeket az eredményeket, és azt is bizonyítja, hogy a lokális redukált tányérmagasság 5 cm hosszú oszlopok esetében (Cortecs, XBridge) 1,0 és 1,4 közé esik a frit diszperziós hatásának korrekcióját követően (lásd a 9. táblázatot).

A be- és kimenetek σ_{end}^2 értékei minden esetben különböztek, de a különbségek elhanyagolhatóak, ezért nem tudtuk meghatározni, hogy melyik vég nyújt jobb teljesítményt. Kimutatható volt, hogy minél hosszabb az oszlop, annál nagyobb a különbség a két vég között. A σ_{end}^2 érték sokkal kisebb volt a Cortecs oszlopoknál, mint az XBridge oszlopoknál. Ezeket az eredményeket a 9. táblázat tartalmazza. Az eredmények alátámasztják Gritti és munkatársai megállapításait, akik arra a következtetésre jutottak, hogy a sugárirányú heterogenitást látszólag az oszlophossz szabályozza (62).

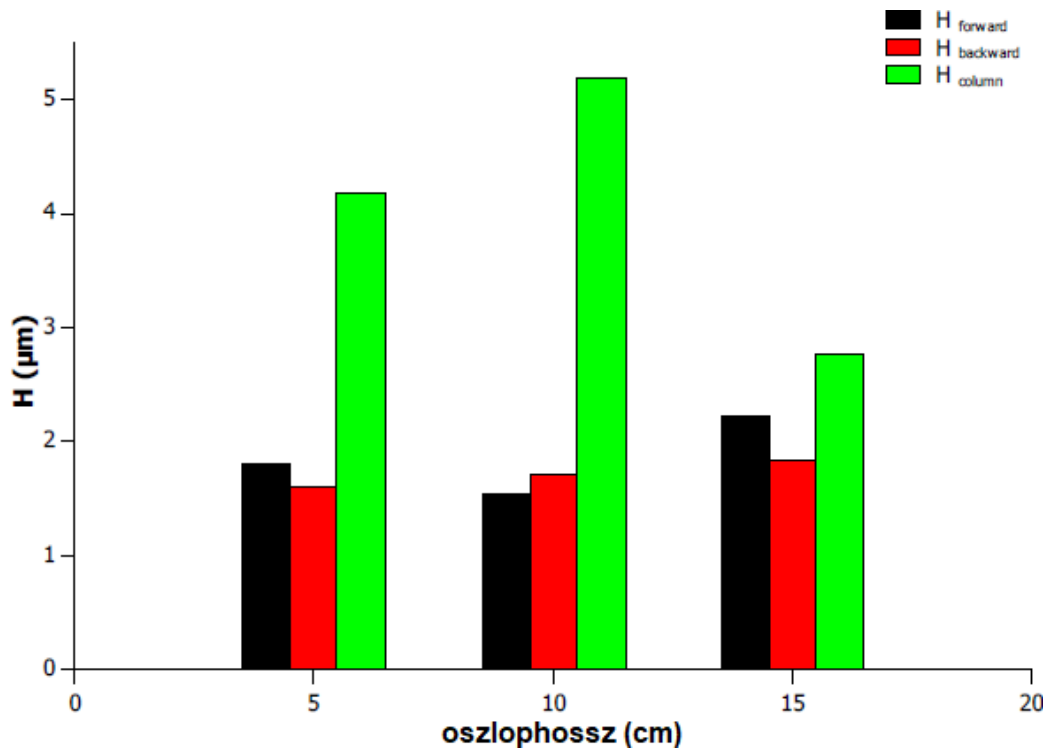
Az eredmények alapján az is megállapítható, hogy a csúcsszélesedés 70-80 %-át a készülék és az oszlopvégek okozzák, míg a maradék 20-30% származik a töltetágyból (ez alól kivételt képez az XBridge 15 cm-es oszlop, ahol ez az arány kb. 50-50%-os).

9. táblázat: A csúcsparkoltatásos és oszlopforgatásos mérések eredményei

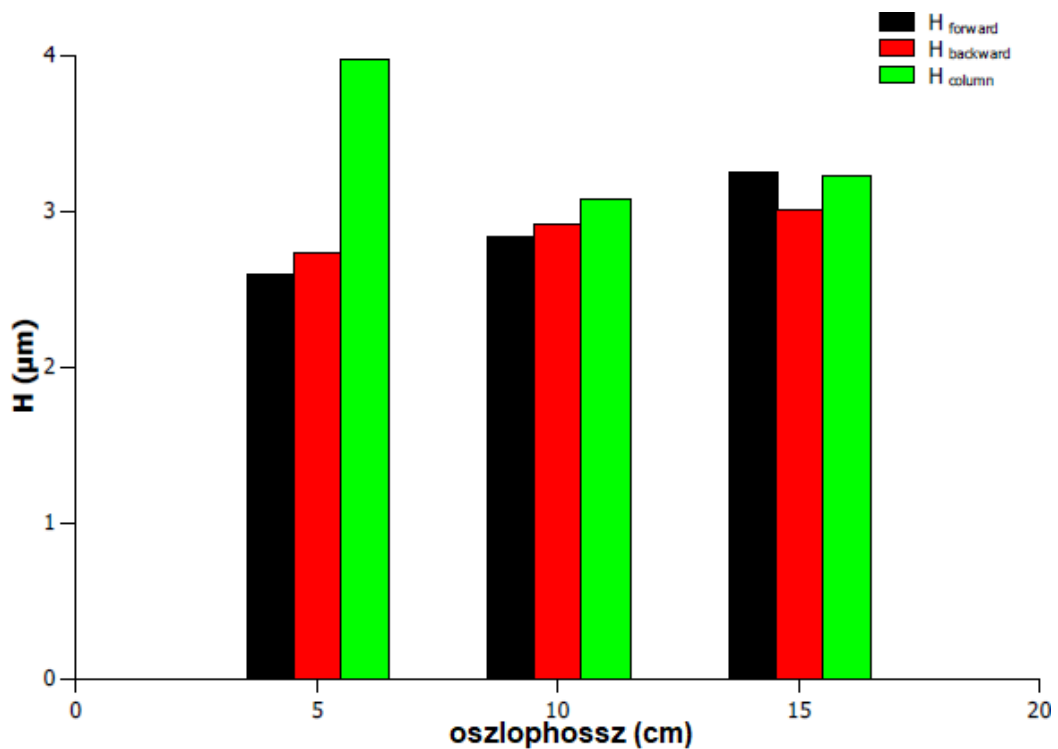
Oszlop	H	H	$\sigma^2_{V, \text{bed}}$	$\sigma^2_{V, \text{bed}}$	$\sigma^2_{V, \text{end}}$	$\sigma^2_{V, \text{end}}$	$\sigma^2_{V, \text{total}}$	$\sigma^2_{V, \text{total}}$	$\sigma^2_{V, \text{park}}$
	forward [μm]	backward [μm]	forward [μl^2]	backward [μl^2]	inlet [μl^2]	outlet [μl^2]	forward [μl^2]	backward [μl^2]	[μl^2]
XBridge 5cm	2,592	2,743	0,494	0,523	0,411	0,454	3,282	3,396	1,235
XBridge 10 cm	2,845	2,920	1,179	1,211	0,736	0,679	4,647	4,565	1,266
XBridge 15 cm	3,255	3,018	1,817	1,684	0,386	0,468	4,579	4,612	1,261
Cortecs 5cm	1,806	1,602	0,223	0,197	0,191	0,182	1,962	1,908	0,615
Cortecs 10 cm	1,546	1,713	0,401	0,445	0,316	0,330	2,528	2,600	0,764
Cortecs 15 cm	2,228	1,839	0,840	0,693	0,527	0,508	3,425	3,122	0,794



18. ábra: Az oszlopforgatás során mért térfogatbeli csúcsvariancia értékek a megtett távolság függvényében. A bal oldali ábrákon az 5, 10, 15 cm-es (lefelé haladva) XBridge oszlopok eredményei, a jobb oldali ábrákon az 5, 10, 15 cm-es Cortecs oszlopok eredményei láthatóak. Az oszlopforgatás során az oszlop bemeneti oldaláról (inlet) mért értékeket a fekete rombuszok, a kimeneti oldalról (outlet) mért értékeket a piros háromszögek jelölik. A forgatás nélkül mért értékek (σ^2_{total}) fekete négyzettel, ill. piros körrel lettek ábrázolva.



19. ábra: Az oszlopforgatásos módszerrel kapott lokális tányérmagasságok és az oszlopok teljes tányérmagasság értékeinek összehasonlítása az Cortecs oszlopok esetében

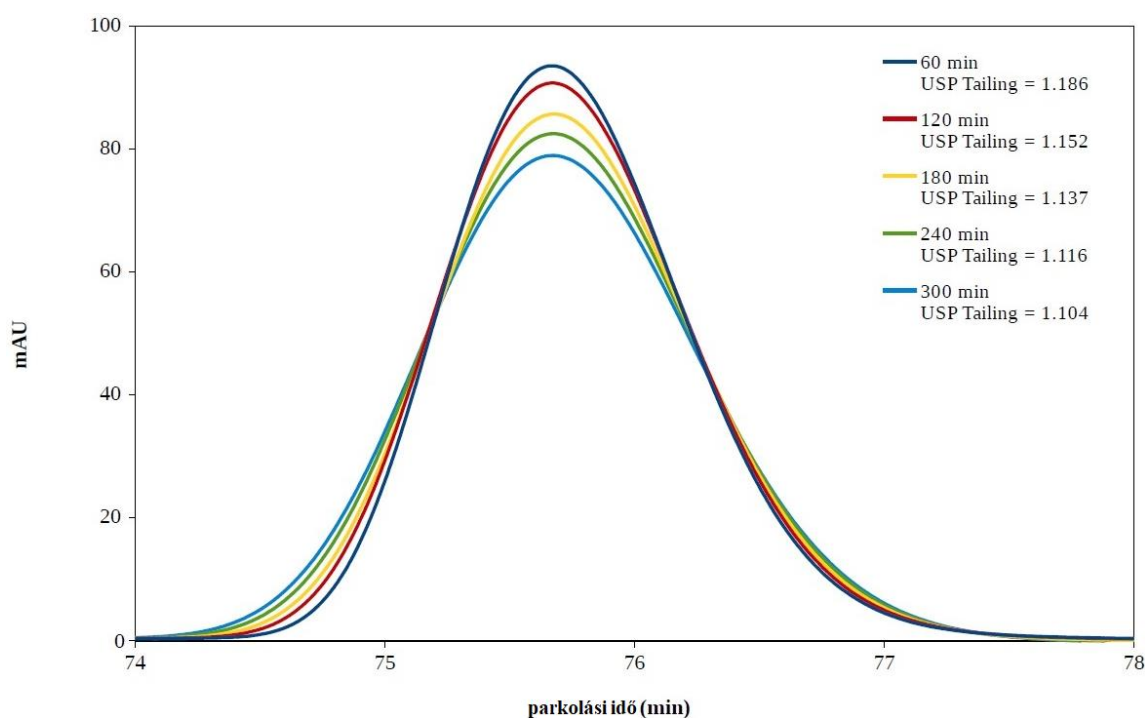


20. ábra: Az oszlopforgatásos módszerrel kapott lokális tányérmagasságok és az oszlopok teljes tányérmagasság értékeinek összehasonlítása az XBridge oszlopok esetében

8.2.2. Oszlopforgatás kivitelezése a pórusok hatásának kizárásával

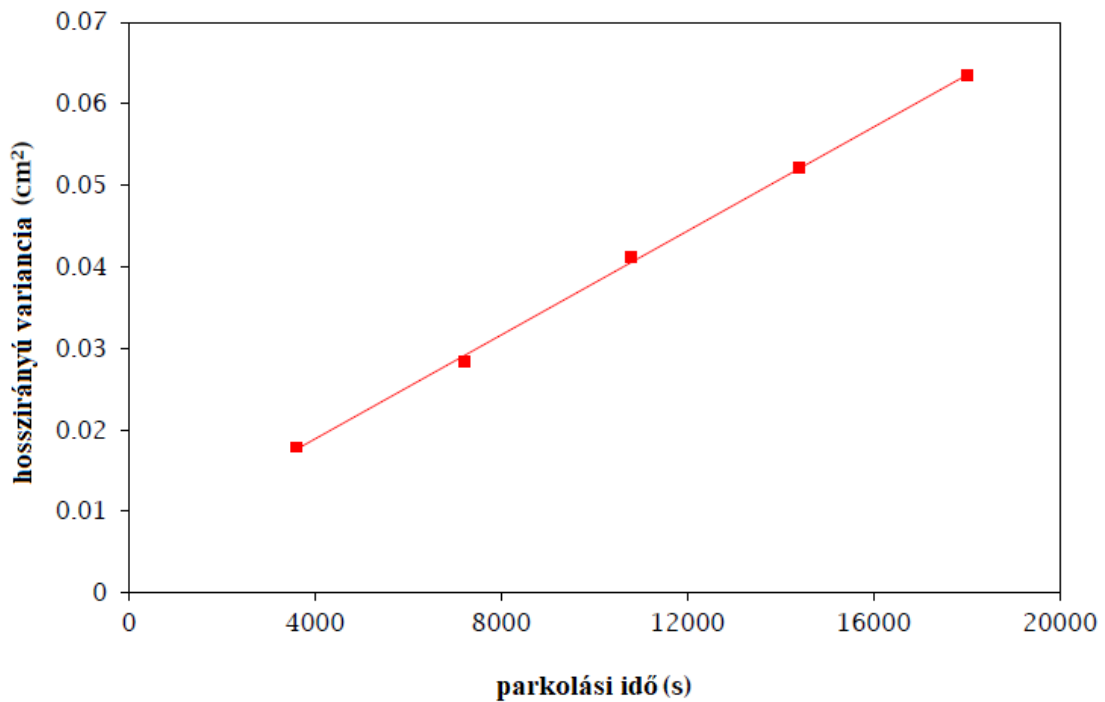
Esetünkben a választott makromolekula a humán inzulin volt. A korábbiakhoz hasonlóan végeztük el a csúcsparkoltatásos és oszlopforgatásos méréseket. Az eredményeket minden esetben korrigáltuk a rendszer csúcsszélesítő hatásával ($500 \mu\text{l}^2$).

Viszont, amíg a kis molekuláknak, például a tiokarbamidnak rövid idő (1, 2, 5, 10 perc) is elegendő a diffúzióhoz a csúcsparkolás során, az inzulinnak sokkal több időre van szüksége ehhez, mivel nagyságrendekkel kisebb a molekuláris diffúziós együtthatója. Így hosszabb parkolási időt kellett alkalmazni a csúcsparkoltatásos és az oszlopforgatásos kísérletekhez egyaránt. Ha hosszú parkolási időkkel dolgozunk (60, 120, 180, 240 és 300 perc), amint azt a 21. ábrán láthatjuk, a csúcsok lineárisan szélesednek és szimmetrikusabbak lesznek a parkolási idő növekedésével.



21. ábra: Az inzulin csúcsalakjai a csúcsparkoltatásos mérések során

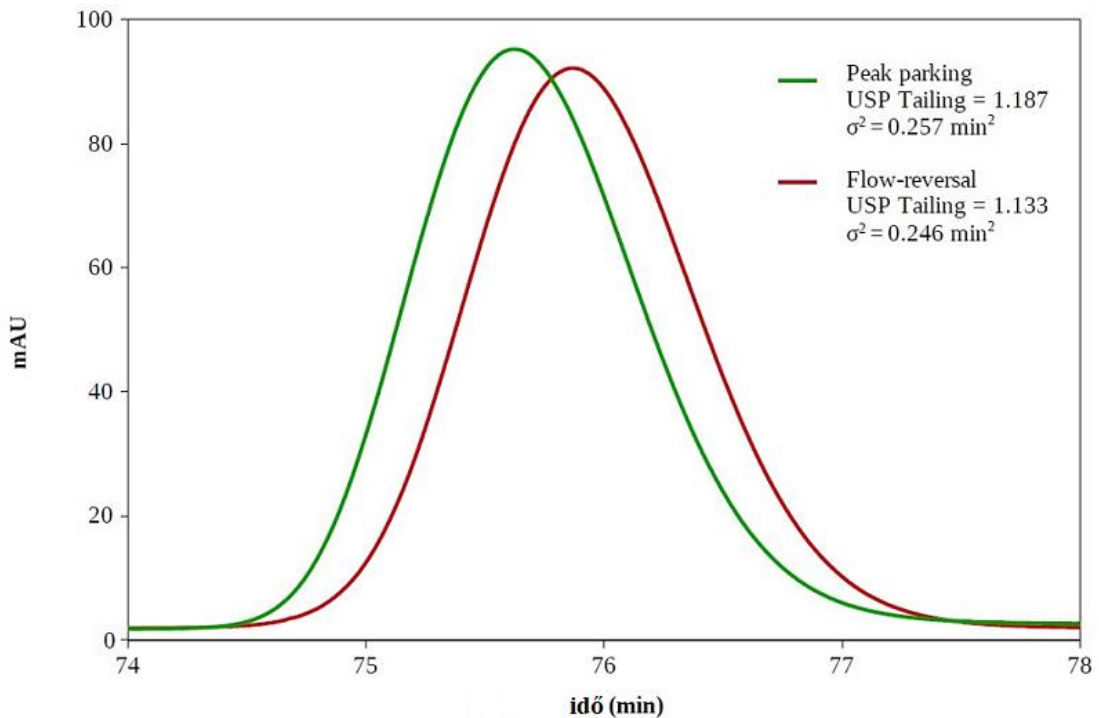
A csúcsparkoltatásos módszer alkalmazásával az inzulin effektív diffúziós együtthatóját a 22. ábrán látható egyenes meredekségéből meghatároztuk, ami így $1,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ -nak adódott. A 5.27. egyenlet alapján a parkolásból eredő variancia $50,3 \mu\text{l}^2$.



22. ábra: A csúcsparkoltatásos mérések során kapott hosszirányú csúcsszélesedési értékek ábrázolása az növekvő parkolási idők függvényében. Az illesztett egyenes meredeksége adja meg $2D_{eff-Et}$.

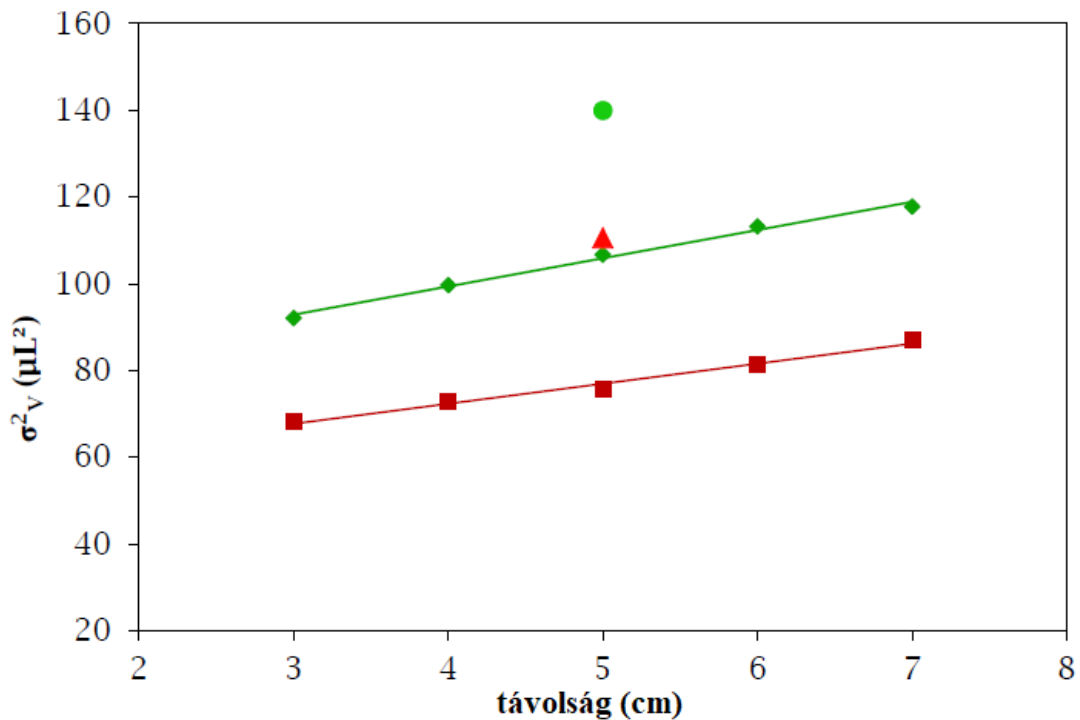
Az oszlopforgatásos méréseket a már korábban ismertetett módon végeztük el, csak 60 perces parkolási idő alkalmazásával.

Amint az a 23. ábrán látható, az oszlopforgatásos módszerrel kissé keskenyebb és szimmetrikusabb csúcsokat kaptunk, mint az áramlás megfordítása nélkül. Bár mindkét csúcs meglehetősen szimmetrikus a 23. ábrán a forgatott csúcs USP tailing értéke, valamivel kisebb. A csúcskompresszió az áramlás megfordulásával kevésbé tűnik jelentősnek, de meg kell jegyezni, hogy a viszonylag nagy oszlopon kívüli csúcsszélesítő hatás ($\sigma_{v, rendszer}^2 = 500 \mu L^2$) megnehezíti az összehasonlítást.



23. ábra: Az inzulin csúcsainak összehasonlítása az oszlopforgatás (flow-reversal) és csúcsparkoltatás (peak parking) esetén

Az áramlás megfordításának kompressziós hatása akkor vált nyilvánvalóvá, amikor az eredményeket korrigáltuk a rendszer hozzájárulásával (lásd a 23. ábrán). Ha az áramlás leáll, amikor a mintasáv 5 cm-t tett meg az oszlopban, a megfigyelt varianciaértékek sokkal kisebbek a parkolási idő letelte után akkor, amikor az oszlopot megfordítottuk. Például, amikor az oszlop bemenetét vizsgáltuk, a variancia $\sigma_v^2 = 139,9 \mu\text{L}^2$ volt abban az esetben, ha az áramlás egyszerűen folyt tovább a parkolási idő letelte után. A variancia viszont lecsökkent $\sigma_v^2 = 106,7 \mu\text{L}^2$ -re, ha az oszlopot megfordítottuk a parkolási idő alatt. Hasonló módon, amikor az oszlop kimenetét tanulmányoztuk, a variancia $\sigma_v^2 = 110,6 \mu\text{L}^2$ -ről, $\sigma_v^2 = 75,6 \mu\text{L}^2$ -re csökkent. Ezek alapján az áramlás megfordításának 24–32% -os fókuszáló hatása van inzulin esetében.



24. ábra: A csúcsparkoltatás és az oszlopforgatás eredményeinek összehasonlításának ábrázolása. Zölddel jelölve az oszlop bemeneti, pirossal pedig az oszlop kimeneti oldalának értékei. Különböző szimbólumokkal pedig az oszlopforgatás nélküli eredmények láthatóak.

A töltetanyag belső lokális tányérmagasságát az illesztett egyenesek meredekségéből határoztuk meg (24. ábra). Megállapítottuk, hogy a bemeneti oldalról mért $H_{forward} = 7,4 \mu\text{m}$ érték nagyobb, mint a kimeneti oldali $H_{backward} = 5,3 \mu\text{m}$. Ez a különbség valamivel jobb hatékonyságot eredményez, abban az esetben, ha az oszlopot a gyártó által javasoltakkal ellentétes áramlási irányban használják. A 23. ábra tengelymetszeteiből kiszámítottuk az oszlopvégek hatását a bemeneti ($\sigma^2_{V,end,in}$) és kimeneti ($\sigma^2_{V,end,out}$) oldalon egyaránt. Az eredményeket a 10. táblázat is összefoglalja. Különbség figyelhető meg a bemeneti és kimeneti oszlopvég varianciája között, a bemeneti $10 \mu\text{L}^2$ -rel nagyobb, mint a kimeneti variancia. Ez a különbség mutatja meg az oszlophardver és az oszloptöltés töltetre gyakorolt hatását a frit közelében. A teljes varianciát vizsgálva kijelenthető, hogy a homogén töltetanyag egyharmadát, a két oszlopvég pedig a maradék kétharmadát adja ki a sávszélesedésnek.

10. táblázat: Az oszlopforgatás összesített eredményei

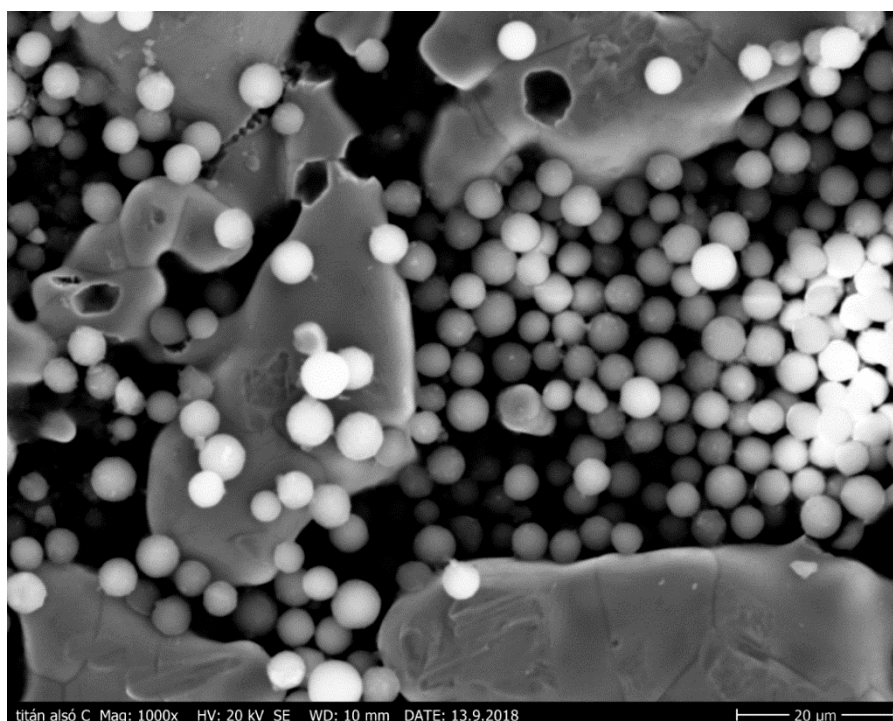
$$\sigma^2_{park} = 50,3 \mu\text{l}^2$$

$$\sigma^2_{system} = 500 \mu\text{l}^2$$

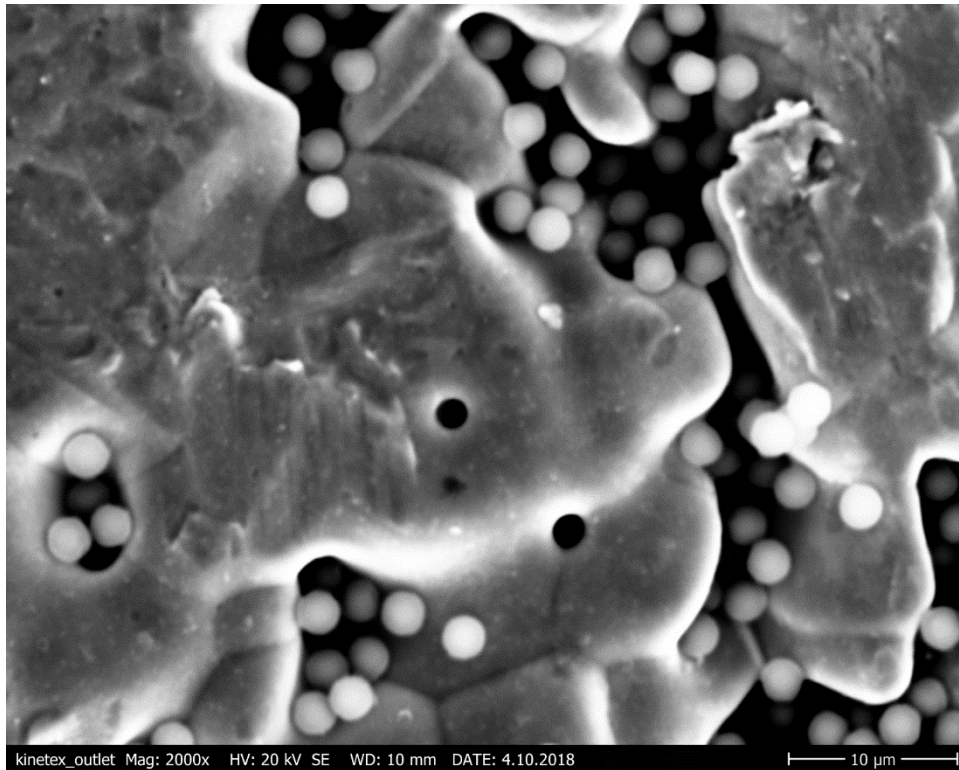
	Bemenet (inlet)	Kimenet (outlet)
σ^2_{total}	639,9 μl^2	610,6 μl^2
σ^2_{column}	89,9 μl^2	60,6 μl^2
σ^2_{end}	28,5 μl^2	18,6 μl^2
σ^2_{bed}	32,6 μl^2	23,1 μl^2
H	7,4 μm	5,3 μm

8.3. Elektronmikroszkópos vizsgálatok eredményei

A méréseknek az volt a célja, hogy lássuk, hogy az oszloptöltési eljárás következtében a friten, illetve a tölteten bármilyen károsodás látható-e. Öt oszloptípus be- és kimeneti fritjét vizsgáltuk. Egyik eset sem mutatott látható sérülést a friteken és a töltetszemcséken sem. Viszont a fritek pórusaiba a szilikagél részecskék jól láthatóan beékelődtek (25-26. ábra) méretük és a préselt frit heterogén szerkezete miatt. A fritbe ágyazódott részecskék felelősek lehetnek a fritek közelében lévő sávszélesítő hatásért is (falhatás). Ezen kívül magának a fritnek és az oszlopvégek illesztéseinek is külön sávszélesítő hatása van.



25. ábra: Phenomenex Prodigy 5 μm , 100 \times 4,6 mm kimeneti fritjének elektronmikroszkópos képe



26. ábra: Kinetex 2,6 μm , 100 \times 4,6 mm kimeneti fritjének elektronmikroszkópos képe

9. Összefoglalás

9.1. Állófázisok kémiai jellemzése

A munkám során végzett hagyományos teszttel (Tanaka-teszt) kapott eredmények szerint a vizsgált fordított fázisú C₁₈-as oszlopok (InertSustain, InertSustainSwift, InertCore, MotoTower, Kinetex, Kinetex EVO) meglehetősen hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek (az alkiláncok mennyiségét, a hidrofóbicitást, a sztérikus szelektivitást, a hidrogénkötési képességet tekintve), bár az állófázisok alapvetően különböznek - mint pl. monolit, tömörmagvú vagy teljesen porózus töltetek. A magasabb $\alpha_{C/P}$ értéke utalna a szilikagél felületén maradt szabad szilanolcsoportokra, de a vizsgált oszlopok esetében ez az érték is meglehetősen hasonló volt. Annak érdekében, hogy helyesen határozzuk meg a szilanolcsoportok mennyiségét, érzékenyebb tesztvegyületeket kellett használni. Ezen mérések segítségével különbséget tudtunk megfigyelni az oszlopok között. A legjobb csúcsalakokat az InertSustain és az InertSustainSwift segítségével sikerült elérni, amelyek teljesen porózus részecskékkel rendelkeznek. A Monotower oszlop is kimagasló eredményeket nyújtott az

érzékenyebb tesztvegyületekkel. Ez valószínűleg annak egyedi pórusszerkezetének köszönhető. A tömörmagvú/mag-héj típusú oszlopok - például az InertCore, a Kinetex és a Kinetex EVO – bizonyultak a legkevésbé eredményesnek a tesztek során.

A legújabb tesztvegyület, a kinuklidin bevezetésével meglehetősen eltérő eredményeket értünk el. Az InertSustain, InertSustainSwift, InertCore és Kinetex EVO oszlopok nagy retenciót és jó csúcsalakokat mutattak, míg a MonoTower és Kinetex oszlopok kevésbé teljesítettek jól.

Ilyen megkülönböztetés nem volt lehetséges a hagyományos tesztvegyületekkel. Habár a kinuklidin nagyon érzékeny vegyület a szilanolaktivitás vizsgálatára, mégsem tipikus tesztmolekula, mivel a funkciós csoportokhoz is erősen kötődik. Az eredmények alapján arra a következtetésre juthatunk, hogy a különböző típusú állófázisok jelentős különbségeket mutathatnak az érzékeny tesztvegyületek alkalmazásakor. Különbségek figyelhetők meg a szilanolcsoportok jelenlétét illetően és a jövőben érdemes lenne más hasznosítható érzékeny tesztvegyületeket is azonosítani.

Mivel gyártónként eltérőek az állófázisokhoz használt szilikagélek (széntartalom, fajlagos felület, porozitás) nem látom lehetségesnek, hogy kidolgozható lenne egy univerzális tesztelési módszer a későbbiekben.

9.2. Az oszlopforgatás

Az oszlopforgatásos mérések alapján az alábbi következtetéseket tudtam megállapítani.

9.2.1. A kromatográfias oszlop heterogenitásának és kialakításának hatása a hatékonyságra

A vizsgált 2,1 × 50, 100 és 150 mm-es teljesen porózus és tömörmagvú részecskékkel töltetes oszlopok kinetikus tulajdonságait teszteltük és összehasonlítottuk.

A Cortecs oszlopokkal kissé nagyobb tányérmagasság értékeket lehetett elérni az optimális mozgófázis sebességnél (15 cm-es Cortecs oszlop kivételével).

Az oszlopforgatásos módszert alkalmaztuk a mintasáv szélesedésének, a lokális tányérmagasság értékek és az oszlopvégek közötti különbségek jellemzésére. A lokális tányérmagasság értékek kisebbnek bizonyultak az áramlás

megfordulásával a sokcsatornás diszperziós hatás és a radiális áramlási profil heterogenitásának kiküszöbölése miatt.

Minden esetben azt tapasztaltuk, hogy az oszlopok végének hatékonysága és a töltetágy hatékonysága - vagyis a lokális tányérmagasságok - különbözik egymástól; az oszlopok heterogének, de a különbség elhanyagolható, és nem lehetünk biztosak abban, hogy az oszlop be- vagy kimenete teljesít-e jobban. A lokális tányérmagasság értéke növekszik az oszlop hosszának növekedésével. Összehasonlítva ezeket a lokális tányérmagasságokat az oszlopra vonatkozó teljes tányérmagasság értékekkel, megállapíthatjuk a fritek és a frit közelében lévő töltetszerkezet hatása nagyobb a Cortecs oszlopoknál. Ezen kívül megállapíthatjuk, hogy a rövidebb oszlopok jobb hatékonysággal tölthetők. Az eredmények azt mutatják, hogy az oszlop hossza befolyásolja a heterogenitást, és minél rövidebb az oszlop, annál jelentősebb a frit hatása. Ennek megfelelően, habár a rövidebb oszlopok töltetágya homogénebb, és a tányérmagasság értékeik is kisebbek, mint a hosszabb oszlopoké, a rövid oszlopok általános hatékonysága rosszabb, mint a hosszú oszlopoké, mivel a fritek relatív hozzájárulása a rövid oszlopoknál lényegesebb.

Számszerűsítve a csúcsszélesedés 70-80 %-át a készülék hozzájárulása és az oszlopvégek okozzák, míg a maradék 20-30%-os szélesedés származik a töltetágy hatásából (ez alól kivételt képez az XBridge 15 cm-es oszlop, ahol ez az arány kb. 50-50%-os).

9.2.2. Oszlopforgatásos mérések kivitelezése a pórusok hatásának kizárásával

Az oszlopforgatás után megfigyelt inzulincsúcsok keskenyebbek és szimmetrikusabbak, mint az áramlás megfordítása nélkül kapott csúcsok. Kis molekulák esetén a mintasáv a kompresszióját jóval kisebbnek találták (61-62). A makromolekulák molekuláris diffúziója sokkal kisebb, mint a kis molekuláké. Így a sugárirányú heterogenitás a töltetágyban kisebb mértékben befolyásolja migrációjukat és következésképpen nagyobb csúcskompressziós hatás figyelhető meg makromolekulák esetén, ha az áramlás megfordul. Az makromolekulákkal végzett oszlopforgatásos kísérlet segítségével mérhető volt az oszlopvégek közti különbség és a lokális tányérmagasság értékek közötti különbség is, attól függően, hogy milyen irányban használtuk az oszlopot. A

vizsgált Kinetex oszlop esetében a lokális tányérmagasság valamivel kisebb (5,3 μm), ha az oszlopot az ajánlott használati irányhoz (7,4 μm) képest ellentétesen használjuk. Az oszlop bemeneti végének kialakítása (illesztés, frit és a töltetszerkezet az oszlop végén) nagyobb mértékben járul hozzá a varianciához, mint az oszlop kimeneti vége. Valószínűleg ez a különbség az oszloptöltési eljárásból fakad, mivel az oszlop végek közelében a részecskesűrűségnek és a szerkezeti felépítésének különböznie kell. Továbbá a két oszlopvég okozta a sávszélesedés nagyobb, mint a töltetanyag sávszélesítő hatása. A Taylor – Aris diszperzió miatt a kísérleti körülményeket jelentősen meg kellett változtatni a kis molekulákkal végzett vizsgálatokéhoz képest, tehát a kísérletek sokkal hosszabbak, mint tiokarbamiddal vagy más kis molekulatömegű markerek esetén.

9.3. Vizsgálatok elektronmikroszkóppal

Különböző használt oszlopok fritjeit elektronmikroszkóppal vizsgálva roncsolásra utaló nyomot nem találtunk a szerkezetükben. Viszont jól látható volt, hogy milyen heterogén ez a préselt fritszerkezet, amibe a töltetrészecskék is bele tudtak jutni, ezzel növelve a mérések során a falhatást, ami fokozza a fritek sávszélesítő hatását.

10. Tézispontok

Munkám során először különböző típusú fordított fázisú C₁₈-as gyorsfolyadékkromatográfiás állófázisok kémiai tulajdonságainak vizsgálata volt a cél, különös tekintettel a szilanol hatásra.

- Meghatároztam a rendelkezésre álló teljesen porózus, tömörmagvú és monolit oszlopok esetén a Tanaka-teszt lépéseit követve az állófázison a hidrofób retenciót (k_{AB}), a felületi borítottságot ($\alpha_{(CH_2)}$), a sztérikus szelektivitást (α_{VO}) és a H-hidas kötésekre való hajlamot ($\alpha_{C/P}$). A különböző oszlopok esetében ezek az értékek a szerkezeti különbségek ellenére nagyon hasonló eredményeket hoztak. Ezért a szabad szilanolcsoportok kimutatására további tesztvegyületeket alkalmaztam.
 - Az említett hagyományos tesztek esetén egyre jobb eredményeket produkálnak ezek az új típusú, bázis-deaktivált (base-deactivated) állófázisok, éppen ezért több lehetséges tesztmolekulát is alkalmaztam a pontosabb eredmények érdekében. A retenciós (k) és aszimmetria ($USP T_f$) értékeket mindegyik oszlop esetében meghatározásra kerültek.
1. Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a különböző típusú állófázisok jelentős különbségeket mutatnak az érzékeny tesztvegyületek alkalmazásakor. Különbségek figyelhetők meg a szilanolcsoportok jelenlétét illetően és a jövőben érdemes lenne más hasznosítható érzékeny tesztvegyületeket is azonosítani.
- Illetve azt is megállapítottam, hogy mivel gyártónként eltérőek az állófázisokhoz használt szilikagélek (széntartalom, fajlagos felület, porozitás) nem látok lehetőséget arra, hogy kidolgozható lenne egy univerzális tesztelési módszer a későbbiekben.

További munkám során ugyancsak gyors folyadékkromatográfiás oszlopok vizsgálatát folytattam. Az oszlopok kialakításának, töltésének a hatását vizsgáltam a folyadékkromatográfiás elválasztás hatékonyságára és a töltetágy heterogenitására.

3-3 teljesen (5, 10, 15 cm) porózus és héjszerkezetű töltettel rendelkező oszlopot vizsgáltam oszlopforgatásos módszer segítségével:

- meghatároztam az oszlopoknál alkalmazható optimális áramlási sebességet és ezzel a minimális tányérmagasság értékeket (H_{\min})
 - meghatároztam a mintakomponens (tioakarbamid) diffúziós együtthatóját csúcsparkoltatásos megállított áramlásos módszerrel
 - ezután elvégeztem az oszlopforgatásos méréseket
2. A UHPLC-s oszlopokkal való mérések során is csúcskompressziós hatást figyeltem meg. A megfordított áramlásnál megfigyelt csúcsok mindig keskenyebbek és szimmetrikusabbak voltak, mint az áramlás megfordítása nélkül kapott csúcsok. Ez a sokcsatornás diszperziós hatás kompenzációjából és az áramlás sugárirányú heterogenitásából származik
3. Összehasonlítva a lokális tányérmagasságokat az oszlopra vonatkozó teljes tányérmagasság értékekkel, megállapítottam, hogy a fritek és a frit közelében lévő töltetszerkezet hatása nagyobb volt a Cortecs oszlopoknál. Ezen kívül megállapítottam, hogy a rövidebb oszlopok jobb hatékonysággal tölthetők. Az eredmények azt mutatják, hogy az oszlop hossza befolyásolja a heterogenitást, és minél rövidebb az oszlop, annál jelentősebb a frit hatása. Ennek megfelelően, habár a rövidebb oszlopok töltetágya homogénebb, és a tányérmagasság értékeik is kisebbek, mint a hosszabb oszlopoké, a rövid oszlopok általános hatékonysága rosszabb, mint a hosszú oszlopoké, mivel a fritek relatív hozzájárulása a rövid oszlopoknál lényegesebb.

Az eredmények alapján az is megállapítható, hogy a csúcsszélesedés 70-80 %-át a készülék hozzájárulása és az oszlopvégek okozzák, míg a maradék 20-30%-os szélesedés származik a töltetágy hatásából (ez alól kivételt képez az XBridge 15 cm-es oszlop, ahol ez az arány kb. 50-50%-os).

A későbbiekben egy héjszerkezetű oszlop esetében vizsgáltam, hogy az oszlopforgatásos módszer kivitelezhető-e nagy molekulákkal (inzulin) is. Ezzel kizártam a pórusokon belüli diffúzió hatását.

4. Az makromolekulákkal végzett oszlopforgatásos kísérlet segítségével is mérhető volt az oszlopvégek közti különbség és a lokális tányérmagasság értékek közötti különbség is, attól függően, hogy milyen irányban használtuk az oszlopot. Megállapítottam, hogy az oszlop bemeneti végének kialakítása (illesztés, frit és a töltetszerkezet az oszlop végén) nagyobb mértékben járult hozzá a varianciához, mint az oszlop kimeneti vége. Valószínűleg ez a különbség az oszloptöltési eljárásból fakad, mivel az oszlop végek közelében a részecskesűrűségnek és a szerkezeti felépítésének különböznie kell. Továbbá a két oszlopvég okozta a sávszélesedés nagyobb volt, mint a töltetágy sávszélesítő hatása. Továbbá a csúcskompresszió mértéke jelentősnek bizonyult, viszont a Taylor-Aris diszperzióból adódóan a mérések sokkal bonyolultabbakká, hosszabbá váltak, mint a kismolekulák esetében, így a jövőbeni oszlopforgatásos mérésekhez továbbra is célszerűbb a kismolekulás opciót választani.
5. Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal megvizsgáltam, hogy az oszloptöltés okoz-e bármilyen károsodást a frit és a töltet szerkezetében. Magában a frit anyagában és a töltet részecskéin elváltozásokat nem észleltem, viszont jól látható volt, hogy a töltetrészecskék bejutnak a frit szerkezetébe, növelve a falhatást és ezzel a sávszélesedést.

Megjelent közlemények

A PhD értekezés alapjául szolgáló publikációk

- D. Zelenyánszki, A. Mester, A. Felinger
Flow-Reversal experiments with macromolecules to measure column end efficiency and bed heterogeneity
Chromatographia, 82 (2019), 1303–1309 **IF: 1,596**

- D. Zelenyánszki, N. Lambert, F. Gritti, A. Felinger
The effect of column packing procedure on column end efficiency and on bed heterogeneity – experiments with flow-reversal
J. Chromatogr. A 1603 (2019), 412 – 416. **IF: 4,049**

- D. Zelenyánszki, N. Lambert, N. Tanaka, A. Felinger
Chemical characterization of stationary phases for fast liquid chromatography – with focus on the residual silanol groups
J. Chromatogr. A- beküldés alatt **IF: 4,049**

- D. Zelenyánszki, A. Felinger
The impact of column hardware on efficiency in liquid chromatography
LCGC Europe 33 (2020), 498-504 **IF: 1,482**

A PhD értekezés témájában készült nem referált konferencia absztraktok

- Zelenyánszki D., Lambert N., Tanaka N., Felinger A.
A szilanol-hatás vizsgálata fordított fázisú folyadékkromatográfiában alkalmazott állófázisok esetében
V. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia 2016. Pécs; Magyarország
198-199. o.
- D. Zelenyánszki , N. Lambert, N. Tanaka, A. Felinger
Chemical characterization of stationary phases for fast liquid chromatography
16th ISSSB (CEEPUS) International Symposium and Summer School on Bioanalysis 2016. Varsó; Lengyelország, P-29
- Zelenyánszki D., Lambert N., Tanaka N., Felinger A.
Fordított fázisú folyadékkromatográfiás állófázisok jellemzése
Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2016. Kecskemét; Magyarország,
P-42
- D. Zelenyánszki , N. Lambert, N. Tanaka, A. Felinger
Chemical characterization of stationary phases for fast liquid chromatography
17th ISSSB (CEEPUS) International Symposium and Summer School on Bioanalysis 2017. Ohrid; Macedónia, O-09
- A. Mester, D. Zelenyánszki, A. Felinger
Comparison of various reversed phase stationary phases by manual and automatized flow-reversal method
17th ISSSB (CEEPUS) International Symposium and Summer School on Bioanalysis 2017. Ohrid; Macedónia, O-17

- A. Mester, D. Zelenyánszki, A. Felinger
 Comparison of various reversed phase stationary phases by flow-reversal method
 XI. Balaton Symposium on High Performance Separation Methods 2017.
 Siófok; Magyarország, P-46

- N. Lambert, D. Zelenyánszki, A. Felinger
 Characterization of stationary phases for fast liquid chromatography
 XI. Balaton Symposium on High Performance Separation Methods 2017.
 Siófok; Magyarország, L-42

- D. Zelenyánszki, N. Lambert, F. Gritti, A. Felinger
 Effect of column packing procedure on the column end structure and bed heterogeneity – experiments with flow-reversal
 32nd International Symposium on Chromatography (ISC) 2018. Cannes-Mandelieu, Franciaország, PS-07-15

- Zelenyánszki D., Lambert N., Gritti F., Felinger A.
 Az oszloptöltés hatása gyors folyadékkromatográfiás állófázisok heterogenitására – kísérletek „oszlopforgatásos” módszerrel
 Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2018. Tapolca; Magyarország, E-28

- D. Zelenyánszki, A. Mester, A. Felinger
 Flow-reversal experiments with macromolecules to measure column end efficiency and bed heterogeneity
 V. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia 2016. Pécs;
 Magyarország, 170. o.

- D. Zelenyánszki, N. Lambert, F. Gritti, A. Felinger
Effect of column packing procedure on the column ends structure and on bed heterogeneity - experiments with flow-reversal
International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC) 2019. Milánó; Olaszország, P-440

- D. Zelenyánszki, A. Felinger
Efficiency, bed heterogeneity and column and structure of segmented columns – experiments with flow-reversal
XII. Balaton Symposium on High Performance Separation Methods 2019. Siófok; Magyarország, P-14

A PhD értekezés témáján kívül készült nem referált konferencia absztraktok

- Simon J., Rédei Cs., Zelenyánszki D., Felinger A.
Komplex mintakeverékből származó komponensek eredetének meghatározása és vizsgálata alterációs analízissel
Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2018. Tapolca; Magyarország, E-22
- Simon J., Rédei Cs., Zelenyánszki D., Felinger A.
Two-dimensional correlation and alteration analysis in chromatography
International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC) 2019. Milánó; Olaszország, OC-154
- Simon J., Rédei Cs., Zelenyánszki D., Felinger A.
Exploring two- and three-dimensional chromatographic data with alteration analysis
XII. Balaton Symposium on High Performance Separation Methods 2019. Siófok; Magyarország, L-16

Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek *Dr. Felinger Attila* egyetemi tanárnak, aki lehetőséget nyújtott az Analitikai és Környezeti Kémia Tanszéken doktori tanulmányaimhoz és emellett az eltelt évek során tapasztalt sok segítségért is hálával tartozom.

Köszönetet szeretnék még mondani *Dr. Kollár László* egyetemi tanárnak, korábbi főnökömnek, hogy támogatta munkám során a párhuzamosan folytatott tanulmányaimat és a PhD képzésre való felvételemet is.

Köszönetet mondok ezen kívül még *Dr. Kilár Ferenc* egyetemi tanárnak, doktori iskola vezetőnek, az évek során nyújtott hasznos tanácsokért és támogatásáért.

Köszönöm a sok segítséget és együttműködést mindazon munkatársaknak, akik doktori munkám során segítségemre voltak szakmailag és emberileg egyaránt.

Köszönöm a támogatást családomnak, melyet munkám és tanulmányaim során nyújtottak.

Irodalomjegyzék

1. J. W. Thomson, J. S. Mellors, J. W. Eschelbach, J. Joregenson *Recent advances in ultrahigh-pressure liquid chromatography*. **2006.**, LCGC North America, 24, 16-20.
2. J. De Vos, K. Broeckhoven, S. Eeltink *Advances in ultrahigh-pressure liquid chromatography and system design*. **2016.**, Anal.Chem., 88, 262-278.
3. J. Mazzeo, U. Neue, M. Kele, R. Plumb *A new separation technique takes advantage of sub-2- μ m porous particles*. **2005.**, Anal. Chem., 77, 460-467.
4. T. H. Walter, R. W. Andrews *Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation*. **2014.**, Trends Anal. Chem., 63, 14-20.
5. R. Majors *Developments in HPLC column packing design*. **2006.**, LCGC North America, 24, 8-15.
6. G. Mayr, T. Welsch *Influence of viscous heat dissipation on efficiency in high-speed high-performance liquid chromatography*. **1999.**, J. Chromatogr. A., 845,155-163.
7. F. Gritti, G. Guiochon *Optimization of the thermal environment of columns packed with very fine particles*. **2009.**, J. Chromatogr. A, 1216,1353-1362.
8. F. Regnier *Perfusion chromatography*. **1991.**, Nature, 350, 34-635.
9. H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka *Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography*. **1996.**, Anal. Chem., 68, 3498-3501.
10. R. L. Wixom, C.W. Gehrke *Chromatography: A Science of Discovery*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., **2010.**, 220-224.
11. J. J. Kirkland, J. B. Adams, M. A. van Straten, H. A. Claessens *Bidentate silane stationary phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography*. **1998.**, Anal. Chem., 70, 4344-4352.
12. S. C. Moldoveanu, V. David *Essentials in Modern HPLC Separations* Elsevier Inc., **2012.**
13. Cs. Horváth, S.R. Lipsky *Use of liquid ion exchange chromatography for the separation of organic compounds*. **1966.**, Nature, 211, 748-749.
14. Cs. Horváth, B. A. Preiss, S.R. Lipsky *Fast liquid chromatography: on investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ionexchangers*. 1967., Anal. Chem., 39, 1422-1428.
15. I. Halász, J. Sebastian *New stationary phase for chromatography*. **1969.**, Angew. Chem., 8, 453-454.
16. J. Fekete, R. Kormány, Sz. Fekete *A folyadékkromatográfia fejlesztési irányai; Gyors folyadékkromatográfia*. Budapest: Merck Kft., **2014.**
17. J. Fekete, R. Kormány, Sz. Fekete *Modern folyadékkromatográfia*. Budapest: Kromkorm Kft., **2017.**
18. L. R. Snyder *Peer reviewed: HPLC: Past and present*. **2000.**, Anal. Chem. , 72, 412-420.

19. R.S.Deelder, P.J.H.Hendricks, M.G.F.Kroll *Preparation and application of porous packing materials for liquid-liquid chromatography*. **1971.**, J. Chromatogr. A, 57, 67-76.
20. Unger, K. K. *Packings and stationary phases in chromatographic techniques*. New York: Marcel Dekker, **1990**.
21. J. Nawrocki *The silanol group and its role in liquid chromatography*. J. Chromatogr. A : ismeretlen szerző, **1997.**, 779, 29-71.
22. R. Vervoort, A. Debets, H. Claessens, C. Cramers, G. de Jong *Optimisation and characterisation of silica-based reversed-phase liquid chromatographic systems for the analysis of basic pharmaceuticals*. **2000.**, J. Chromatogr. A, 897, 1-22.
23. M. J. Sorensen, B. G. Anderson, R. T. Kennedy *Liquid chromatography above 20,000 PSI.* **2020.**, Trends Anal. Chem. , 124, 115810.
24. C. G. Horvath, B. A. Preiss, and S. R. Lipsky *Fast liquid chromatography: An investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers*. **1967.**, Anal. Chem. , 39, 1422-1428.
25. J. J. Kirkland *Controlled surface porosity supports for high-speed gas and liquid chromatography*. **1969.**, Anal. Chem., 41, 218-220.
26. J. J. Destefano, T. J. Langlois, J. J. Kirkland *Characteristics of superficially-porous silica particles for fast HPLC: Some performance comparisons with sub-2-microm particles*. **2008.**, J. Chromatogr. Sci. , 46, 254-260.
27. S. Hjertén, J. Li, J. Liao *High-performance chromatofocusing of proteins on agarose columns: II. Deformed non-porous 12-15 μm beads*. **1989.**, J. Chromatogr. A, 475, 177-185.
28. F. Svec, J. M. J. Frechet *Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media*. **1992.**, Anal. Chem., 64, 820-822.
29. N. Ishizuka, H. Kobayashi, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hirao, K. Hosoya, T. Ikegami, N. Tanaka *Monolithic silica columns for high-efficiency separations by high-performance liquid chromatography*. **2002.**, J. Chromatogr. A, 960, 85-96.
30. A. J. Alla, K. J. Stine *Development of monolithic column materials for the separation and analysis of glycans*. **2015.**, Chromatography, 2, 20-65.
31. D. Cabooter, K. Broeckhoven, R. Sterken, A. Vanmessen, I. Vandendael, K. Nakanishi, S. Deridder, G. Desmet *Detailed characterization of the kinetic performance of first and second generation silica monolithic columns for reversed-phase chromatography separations*. **2014.**, J. Chromatogr. A, 1325, 72-82.
32. G. Desmet, K. Broeckhoven *Extra-column band broadening effects in contemporary liquid chromatography*. **2019.**, Trends Anal. Chem., 119, 115619.
33. T. Welsch, H. Frank, G. Vigh *Silanol effects in reversed-phase liquid chromatography*. **1990.**, J. Chromatogr. A, 506, 97-108.
34. U. D. Neue *Stationary phase characterization and method development*. J. Sep. Sci., **2007.**, 30, 1611-1627.
35. K. Krupczynska, B. Buszewski *Characterizing HPLC stationary phases*. **2004.**, Anal. Chem. , 76, 226-234.

36. R. Vervoort, A. Debets, H. Claessens, C. Cramers, G. de Jong *Optimisation and characterisation of silica-based reversed-phase liquid chromatographic systems for the analysis of basic pharmaceuticals*. **2000.**, J. Chromatogr. A, 897, 1-22.
37. H. Claessens, M. van Straten, C. Cramers, M. Jezierska, B. Buszewski *Comparative study of test methods for reversed-phase columns for high-performance liquid chromatography*. **1998.**, J. Chromatogr. A, 826, 135-156.
38. K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Araki, N. Tanaka, *Chromatographic characterization of silica C18 packing materials. Correlation between a preparation method and retention behavior of stationary phase*. **1989.**, J. Chromatogr. Sci., 27, 721-728.
39. C. Rimmer, L. Sander, S. Wise *Selectivity of long chain stationary phases in reversed phase liquid chromatography*. **2005.**, Anal Bioanal Chem., 382, 698–707.
40. L. Sander, S. Wise *The influence of column temperature on selectivity in reversed-phase liquid chromatography for shape-constrained solutes*. **2001.**, J. Sep. Sci, 24, 910-920.
41. D. McCalley *Selection of suitable stationary phases and optimum conditions for their application in the separation of basic compounds by reversed-phase HPLC*. **2003.**, J. Sep. Sci., 26, 187-200.
42. K. Okusa, Y. Suita, Y. Otsuka, M. Tahara, T. Ikegami, N. Tanaka, M. Ohira, M. Takahashi *Test compounds for detecting the silanol effect on the elution of ionized amines in reversed-phase LC*. **2010.**, J. Sep. Sci., 33, 348-358.
43. P. Jandera, S. Bocian, M. Mílaková, B. Buszewski *Characterization of the properties of stationary phases for liquid chromatography in aqueous mobile phases using aromatic sulfonic acids as the test compounds*. **2009.**, J. Chromatogr. A, 1216, 237-248.
44. M. Mílaková, P. Jandera *Characterization of stationary phases for reversed-phase chromatography*. **2010.**, J. Sep. Sci., 33, 453-463.
45. S. Ahuja, M. Dong. *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. Elsevier Inc., **2005**.
46. J. C. Giddings. *Dynamics of Chromatography: Principles and Theory*. New York: Marcel Dekker Inc., **1965**.
47. J. C. Giddings *Kinetic origin of tailing in chromatography*. **1963.**, Anal. Chem., 35, 1999-2002.
48. T. Fornstedt, G. Zhong, G. Guiochon *Peak tailing and mass transfer kinetics in linear chromatography*. **1996.**, J. Chromatogr. A, 741, 1-12.
49. J. Nawrocki, B. Buszewski *Influence of silica surface chemistry and structure on the properties, structure and coverage of alkyl-bonded phases for high-performance liquid chromatography*. **1988.**, J. Chromatogr. A, 449, 1-24.
50. L. R. Snyder. *Principles of Adsorption Chromatography*. New York: Marcel Dekker Inc., **1968**.

51. L. Zhang, J. L. Rafferty, J. I. Siepmann, B. Chenb, M. R. Schure *Chain conformation and solvent partitioning in reversed-phase liquid chromatography: Monte carlo simulations for various water/methanol concentrations.* **2006.**, J. Chromatogr. A, 1126, 219-231.
52. L. Pan, R. LoBrutto, Y. V. Kazakevich, R. Thompson *Influence of inorganic mobile phase additives on the retention, efficiency and peak symmetry of protonated basic compounds in reversed-phase liquid chromatography.* **2004.**, J. Chromatogr. A, 1049, 63-73.
53. J. S. Kiel, S. L. Morgan, R. K. Abramson *Effects of amine modifiers on retention and peak shape in reversed-phase high-performance liquid chromatography.* **1985.**, J. Chromatogr. A, 320, 313-323.
54. Li, X. *Method development for high performance liquid chromatography: Novel organic modifiers and column packing conditions.* Iowa University: Digital Repository, **1996.**, <https://lib.dr.iastate.edu/rtd/11159>.
55. G. Crescentini, A.R. Mastrogiacomo *Liquid chromatography capillary columns dry-packed with polar and nonpolar stationary phases.* **1999.**, J. Microcolumn Sep., 3, 539-545.
56. Y. Guan, L. Zhou, Z. Shang. *Dry-packed capillary columns for micro HPLC.* **1992.**, J. Sep. Sci. , 15, 434-436.
57. D. Johnson *Column packing – changing art to science.* **2015.**, Genet. Eng. Biotechnol. N. , 35, 24-25.
58. M.F. Wahab, D.C. Patel, R.M. Wimalysinghe, D.W. Armstrong *Fundamental and practical insights on the packing of modern high-efficiency analytical and capillary columns.* **2017.**, Anal. Chem., 8177-8191.
59. *Understanding the science behind packing high-efficiency columns and capillaries: facts, fundamentals, challenges, and future directions.* F. Gritti, M.F. Wahab. **2018.**, LCGC North America, 36, 82-98.
60. V. Wong, R. Shalliker, G. Guiochon *Evaluation of the uniformity of analytical-size chromatography columns prepared by the downward-packing of particulate slurries.* **2004.**, Anal. Chem., 76, 2601-2608.
61. N. Lambert, S. Miyazaki, M. Ohira, N. Tanaka, A. Felinger *Comparison of the kinetic performance of different columns for fast liquid chromatography, emphasizing the contributions of column end structure.* **2016.**, J. Chromatogr. A, 1473, 99-108.
62. F. Gritti, M. Dion, A. Felinger, M. Savaria *Characterization of radial and axial heterogeneities of chromatographic columns by flow reversal.* **2018.**, J. Chromatogr. A, 1567, 164-176.
63. F. Gritti, M. Gilar *Impact of frit dispersion on gradient performance in high-throughput liquid chromatography.* **2019.**, J. Chromatogr. A, 1591,110-119.
64. J. J. Van Deemter, F. J. Zuiderweg, A. Klinkenberg *Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer and causes of nonideality in chromatography.* **1956.**, Chem. Eng. Sci. , 5, 271-289.

65. J. H. Knox, H. P. Scott *B and C terms in the van Deemter equation for liquid chromatography*. **1983.**, J. Chromatogr. A, 282, 297-313.
66. A. J. P. Martin, R. L. M. Synge *A new form of chromatogram employing two liquid phases*. **1941.**, Biochem J., 35, 1358-1368.
67. Craig, L. C. *Identification of small amounts of organic compounds by distribution studies: II. separation by counter-current distribution*. **1944.**, J. Biol. Chem., 155, 519-534.
68. A. Felinger, G. Guiochon *Comparison of the kinetic models of linear chromatography*. **2004.**, Chromatographia, 60, S175-S180.
69. K. Miyabe *New moment equations for chromatography using various stationary phases of different structural characteristics*. **2007.**, Anal. Chem., 79, 7457-7472.
70. E. Wilson, C. Geankoplis *Liquid mass transfer at very low Reynolds numbers in packed beds*. **1966.**, Ind. Eng. Chem. Fund., 5, 9.
71. C. R. Wilke, P. Chang *Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions*. **1955.**, AIChE Journal, 1, 264-270.
72. M. Young, P. Carroad, R. Bell *Estimation of diffusion-coefficients of proteins*. **1980.**, B&B, 22, 947-955.
73. J. H. Knox, L. McLaren *A new gas chromatographic method for measuring gaseous diffusion coefficients and obstructive factors*. **1964.**, Anal. Chem. , 36,1477-1482.
74. K. Miyabe, N. Ando, G. Guiochon *Peak parking method for measurement of molecular diffusivity in liquid phase systems*. **2009.**, J. Chromatogr. A, 1216, 4377-4382.
75. K. Miyabe, Y. Kawaguchi, G. Guiochon *Kinetic study on external mass transfer in high performance liquid chromatography system*. **2010.**, J. Chromatogr. A, 1217, 3053-3062.
76. F. Gritti, G. Guiochon *Accurate measurements of the true column efficiency and of the instrument band broadening contributions in the presence of a chromatographic column*. **2014.**, J. Chromatogr. A, 1327, 49-56.
77. F. Gritti, G. Guiochon *On the minimization of the band-broadening contributions of a modern very high pressure liquid chromatography*. **2011.**, J. Chromatogr. A, 1218, 4632-4648.
78. F. Gritti, T. McDonald, M. Gilar *Impact of the column hardware volume on resolution in very high pressure liquid chromatography non-invasive investigations*. **2015.**, J. Chromatogr. A, 1420, 54-65.
79. W. J. Cheong *Fritting techniques in chromatography*. **2014.**, J. Sep. Sci, 37, 603-617.
80. F. Gritti, J. Shiner, J. N. Fairchild, G. Guiochon *Evaluation of the kinetic performance of new prototype 2.1 x 100 mm narrow-bore column packed with 1.6 μ m superficially porous particles*. **2014.**, J. Chromatogr. A, 1334, 30-43.
81. B. S. Broyles, R. Shalliker, G. Guiochon *Visualization of sample introduction in liquid chromatography columns. The effect of the frit diameter*. **1999.**, J. Chromatogr. A , 855, 367-382.

82. B. S. Broyles, R. Shalliker, G. Guiochon *Visualization of solute migration in chromatographic columns. Influence of the frit porosity.* **2001.**, J. Chromatogr. A, 917, 1-22.
83. M. Kaminski *Simple test for determination of the degree of distortion of the liquid-phase flow profile in columns for preparative liquid chromatography.* **1992.**, J. Chromatogr. A, 589, 61-70.
84. H. Guo, D.D. Frey *Interpreting the difference between conventional and bi-directional plate-height measurements in liquid chromatography.* **2010.**, J. Chromatogr. A, 1217, 6214-6229.
85. D.K. Roper, E.N. Lightfoot *Estimating plate heights in stacked-membrane chromatography by flow reversal.* **1995.**, J. Chromatogr. A, 702, 39-80.
86. N. Tanaka, D. V. McCalley *Core-shell, ultrasmall particles, monoliths, and other support materials in high-performance liquid chromatography.* **2016.**, Anal. Chem., 88, 279-298.
87. G. Guiochon *Monolithic columns in high-performance liquid chromatography.* **2007.**, J. Chromatogr. A., 1168, 101-168.
88. G. Taylor *Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube.* **1953.**, Proc. R. Soc. Lond. A., 219, 186-203.
89. R. Aris *On the dispersion of solute in a fluid flowing through a tube.* **1956.**, Proc. R. Soc. Lond. A., 235, 67-77.
90. F. Gritti, A. Felinger, G. Guiochon *Influence of the errors made in the measurement of the extra-column volume on the accuracies of estimates of the column efficiency and the mass transfer kinetics parameters.* **2006.**, J. Chromatogr. A., 1136, 57-72.
91. J. P. Grinias, B. Bunner, M. Gilar, J. Jorgenson *Measurement and modeling of extra-column effects due to injection and connections.* **2015.**, Chromatographia, 2, 669-690.
92. P. Aggarwal, K. L. S. Sharma, J. S. Lawson, H. Tolley, M. L. Lee *Flow rate dependent extra-column variance from injection in capillary liquid chromatography* **2015.**, J. Chromatogr. A., 1380, 38-44.
93. J. G. Atwood, M.J. E. Golay *Dispersion of peaks by short straight open tubes in liquid chromatography systems.* **1981.**, J. Chromatogr. A, 218, 97-122.
94. Felinger, A. *Data Analysis and Signal Processing in Chromatography.* Amsterdam: Elsevier Science, **1998.**
95. E. M. Borges *Silica, hybrid silica, hydride silica and non-silica stationary phases for liquid chromatography.* **2015.**, J. Chromatogr. Sci., 53, 580-597.
96. C. H. Chen, M. C. Huang, H. O. Ho, H. H. Chen, M. T. Sheu *Influence of structural differences of dextromethorphan and its three metabolites on their simultaneous separation using various silica columns with a simple aqueous mobile phase.* **2008.**, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 31, 97-106.
97. L. N. Yakhontov, E. E. Mikhлина *Chemical peculiarities of quinuclidine compounds (review).* **1975.**, Chem. Heterocycl. Compd., 11, 883-894.

98. L. N. Yakhontov *The chemistry of quinuclidine*. **1969.**, Russ. Chem. Rev., 38, 470-486.
99. N. Yutronic, J. Merchán, P. Jara, G. Gonzalez, M. T. Garland *Quinuclidine-thiourea inclusion compound. A perfect Van der Waals cavity*. **2003.**, J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem., 45, 51-57.
100. F. Gritti, G. Guiochon *Mass transfer kinetics, band broadening and column efficiency*. **2012.**, J. Chromatogr. A., 1221, 2-40.
101. A. Liekens, J. Denayer, G. Desmet *Experimental investigation of the difference in B-term dominated band broadening between fully porous and porous-shell particles for liquid chromatography using the effective medium theory*. **2011.**, J.Chromatogr. A, 1218. 4406-4416.