

Molekuláris lenyomatú polimerek kromatográfiás tulajdonságai

Doktori értekezés

Tóth Blanka

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományi Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Dr. Horvai György, tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA levelező tagja

Hivatalos bírálók: Prof. Dr. Felinger Attila, egyetemi tanár, az MTA doktora
Prof. Dr. Péter Antal, egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Kalász Huba, c. egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Prof. Dr. Marton Sylvia, egyetemi tanár, Ph.D.
Dr. Szabó Pál, Ph.D.

Budapest
2010

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés (irodalmi háttér).....	5
1.1.	A molekuláris lenyomatképzés története.....	6
1.2.	A molekuláris lenyomatú polimerek előállításának módszerei.....	6
1.2.1.	A nemkovalens lenyomatképzés	7
1.2.2.	A kovalens lenyomatképzés	7
1.3.	A nemkovalens molekuláris lenyomatú polimerek előállítása.....	8
1.3.1.	Tömbpolimerizáció.....	11
1.3.2.	Egyenletes szemcseméretű, szabályos gömb alakú MIP-ek előállítása .	11
1.4.	Molekuláris lenyomatú polimerek jellemzése.....	13
1.4.1.	Fizikai vizsgálatok.....	13
1.4.2.	Kémiai vizsgálatok	13
1.5.	Molekuláris lenyomatú polimerek alkalmazási területei.....	15
1.5.1.	Elválasztástechnikai alkalmazások.....	15
1.5.1.1.	HPLC	15
1.5.1.2.	Szilárd fázisú extrakció	16
1.5.1.3.	Kapilláris elektrokratográfia (CEC)	18
1.5.2.	Kötési vizsgálat (binding assay).....	19
1.5.3.	Katalízis	21
1.5.4.	Szenzorok	21
1.6.	Molekuláris lenyomatú polimerek kromatográfiás viselkedése.....	22
1.6.1.	A MIP-ek jellemzése HPLC-vel.....	23
1.6.2.	A nemlineáris kromatográfia alapjai	23
2.	Célkitűzések	30
3.	Módszerek	33
3.1.	Polimerek előállítása.....	33
3.1.1.	Tömbpolimer előállítása.....	34
3.1.2.	Szilikagél-MIP kompozit előállítása	35
3.1.3.	Polimerek mosása	36
3.2.	Polimerek jellemzése.....	37
3.2.1.	Fizikai-kémiai jellemzés.....	37
3.2.1.1.	Alacsony hőmérsékletű gázadszorpciós mérések.....	37
3.2.1.2.	Elektronmikroszkópos mérések.....	37
3.2.2.	Kémiai vizsgálatok	38
3.2.2.1.	Egyensúlyi („batch”) adszorpció mérés	38
3.2.2.2.	Kromatográfiás mérések.....	38
3.2.3.	Számítógépes szimuláció.....	39
4.	Kísérleti eredmények.....	40
4.1.	Egyensúlyi („batch”) adszorpciós mérések.....	40
4.2.	Alacsony hőmérsékletű gázadszorpciós mérések.....	41
4.3.	Elektronmikroszkópos mérések.....	42
4.4.	Kromatográfiás mérések.....	45
4.5.	A MIP-ek jellemzésére használt mennyiségek vizsgálata.....	51
4.5.1.	Retenció tényező és Imprintelési Faktor koncentrációfüggése.....	52
4.5.2.	Szelektivitás függése az oszlop geometriai paramétereitől.....	52
4.6.	Kompetíció vizsgálata molekuláris lenyomatú polimereken.....	54

5.	Megbeszélés.....	62
5.1.	A MIP-ek nemlineáris kromatográfiás állófázisként való viselkedésének igazolása	62
5.2.	A nemlineáris viselkedés általánosíthatósága.....	67
5.3.	A kompozit töltetek analitikai alkalmazhatósága.....	67
5.4.	A nemlineáris izoterma következményei a MIP-ek kromatográfiás jellemzésénél	68
5.5.	A nemlineáris izoterma következményei a MIP-ek kromatográfiás elválasztásra történő alkalmazásánál	74
5.6.	A nemlineáris kromatográfia következményei MIP-ek tulajdonságainak optimalásánál	77
6.	Következtetések (tézisek)	79
7.	Összefoglalás	81
8.	Summary.....	82
9.	Irodalomjegyzék	83
10.	Saját publikációk jegyzéke	87
11.	Köszönetnyilvánítás	88

Rövidítések jegyzéke

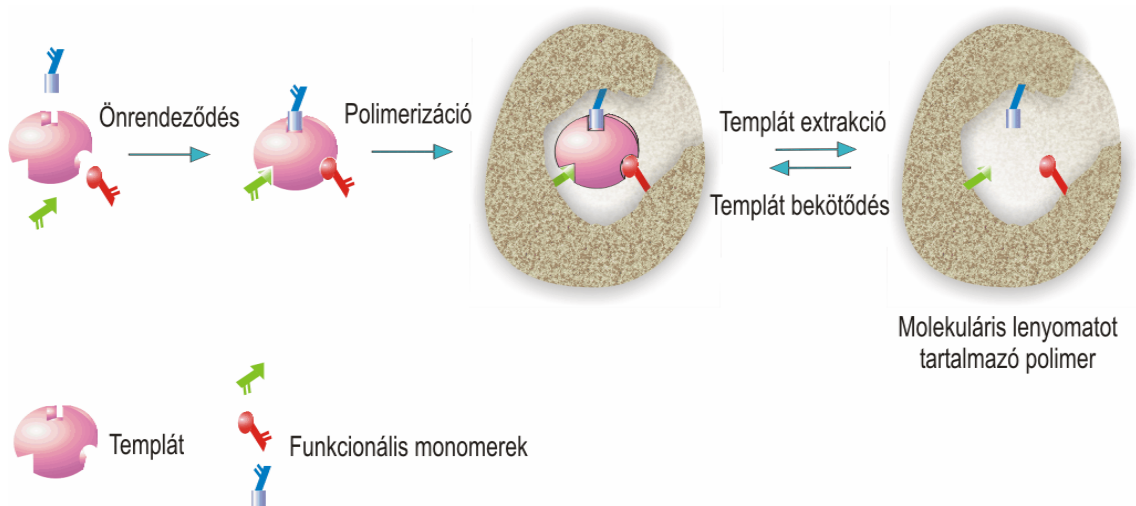
AF:	Aszimmetria Faktor
CEC:	Kapilláris Elektrokromatográfia
GC:	Gázkromatográfia
HETP:	Elméleti Tányérmagasság
HPLC:	Nagy Hatékonyságú Folyadékkromatográfia
IF:	Imprintelési Faktor
IR:	Infravörös Spektroszkópia
MIP:	Molekuláris Lenyomatú Polimer (Molecularly Imprinted Polymer)
MISPE:	MIP-SPE
N:	Elméleti Tányérszám
NIP:	Molekuláris Lenyomatot Nem Tartalmazó (kontroll) Polimer (Non Imprinted Polymer)
NMR:	Mágneses Magrezonancia Spektroszkópia
QCM:	Kvarckristály Mikromérleg (Quartz Crystal Microbalance)
SPE:	Szilárd Fázisú Extrakció (Solid Phase Extraction)

1. Bevezetés (irodalmi háttér)

A molekuláris lenyomatképzés egy olyan technológia, ami szelektív adszorpciós helyeket képes létrehozni egy polimer mátrixban, a mintamolekula (templát) jelenlétében történő polimerszintézis révén (1. ábra [1]). A molekuláris lenyomatot tartalmazó polimer (Molecularly Imprinted Polymer, MIP) a templát eltávolítása után képes a mintamolekula szelektív újrakötésére.

Ezzel az eljárással természetes kötőhelyeket lehet sok tekintetben utánozni szintetikus módon, egyszerű, de hatékony módszerrel. Ráadásul a kapott polimer általában nagyfokú fizikai és kémiai stabilitással rendelkezik.

Az élő szervezetben a molekulák közti másodlagos kölcsönhatások fontos szerepet játszanak. Bár ezek a kölcsönhatások (pl. antigén-antitest) a kovalens kötéshez képest gyengék, de stabil komplexek létrehozására képesek és gyakran nagyfokú szelektivitást mutatnak.



1. ábra A molekuláris lenyomatképzés vázlatos ábrája

1.1. A molekuláris lenyomatképzés története

Az első ismert molekuláris lenyomatú anyag egy szerves polimer (szilikagél) volt. Poljakov 1931-ben publikálta eredményeit, melyek szerint a szilikagél pórusstruktúrájára és adszorpciós szelektivitására hatással van, hogy benzol, toluol vagy xilol jelen van-e az előállítás során [2].

Egy 1949-ben megjelent publikáció szerint Dickey szilikagélt állított elő Na-szilikát polimerizációjával különböző festékek jelenlétében (metil-, etil-, n-propil- és n-butil-narancs). A festék eltávolítása után vizsgálta a szilikagél adszorpciós szelektivitását és megállapította, hogy a négy festék közül azt köti újra legjobban, amelyiknek a jelenlétében készült [3].

Ezt követően több kutatócsoport is foglalkozott szelektív adszorbensek előállításával Dickey módszereit használva. 1972-ben Klotz és Wulff csoportjai egymástól függetlenül a molekuláris lenyomatképzést szerves, szintetikus polimermátrixban oldották meg. Ők könnyen bontható kovalens kötésen alapuló lenyomatképzéssel foglalkoztak [4,5].

Fontos felfedezése volt Mosbachnak az 1980-as évek elején a nemkovalens kötésekben alapuló lenyomatképzési eljárás, ami lényegesen kiszélesítette a molekuláris lenyomatképzés alkalmazási területét [6,7].

A módszer iránt az érdeklődés az 1990-es évek elején nőtt meg, amikor Vlatakis a *Nature* folyóiratban publikálta [8], hogy a molekuláris lenyomatú polimerek a biológiai receptorokéhoz hasonló szelektivitást tudnak felmutatni. A technika iránt az érdeklődés mind a mai napig tart. A témában évente már kb. 500 cikk jelenik meg referált folyóiratokban, több folyóirat is különszámot szentel a témának [9-12].

1.2. A molekuláris lenyomatú polimerek előállításának módszerei

A molekuláris lenyomatú polimerek a templát és a funkcionális monomer közötti kölcsönhatás alapján két nagy csoportba oszthatók: kovalens és nemkovalens MIP-ekre.

1.2.1. A nemkovalens lenyomatképzés

A biokémiai rendszerekben a felismerés alapjai a nemkovalens kölcsönhatások, mint a hidrogén-hidas kötés vagy a hidrofób kölcsönhatás, ionos kötés vagy a van der Waals kölcsönhatás. Az ilyen típusú kölcsönhatások kötési energiája kisebb, mint a kovalens kötésé, azonban elég erős kölcsönhatás érhető el, ha ezen gyenge kötések közül több is létrejön a célmolekula és a polimer között.

Nemkovalens lenyomatképzés esetén a templát és a funkcionális monomer között ilyen nemkovalens kölcsönhatások alakulnak ki a prepolimerizációs elegyben.

A nemkovalens módszer előnyei:

- A polimerizáció után a templát enyhe körülmények között távolítható el, mivel nemkovalens kötésekkel van kötve
- A templát visszakötődése során az adszorpció/deszorpció általában gyors

Hátrányai:

- a monomer-templát komplex nem sztöchiometrikus és esetenként nem elég stabil
- a polimerizáció körülményeit gondosan kell kiválasztani, hogy elősegítsük a monomer-templát komplexek képződését
- a funkcionális monomereket általában feleslegben kell alkalmazni a templáthoz képest, ami nem-specifikus kötőhelyeket eredményezhet [13]

1.2.2. A kovalens lenyomatképzés

Kovalens lenyomatképzés esetén a polimerizációt megelőzően a funkcionális monomert és a templátot kovalens kötések kötik egymáshoz. A polimerizáció során ez a kötés sértetlen marad. A kész polimerből a templátot kémiai reakcióval távolítják el, és az újrakötés is kémiai reakcióval történik. A módszer előnyei:

- a monomer-templát komplex stabil és sztöchiometrikus
- sokféle polimerizációs körülmény alkalmazható (magas hőmérséklet, alacsony vagy magas pH, nagyon poláris oldószer), mivel a kötés stabil

Hátrányai:

- kevés a reverzibilis, azaz könnyen kialakítható és könnyen is bontható kovalens kötéstípus
- a kész MIP-en a templát kötődése majd eltávolítása lassú (kémiai reakció) [13]

A gyakorlatban a nem kovalens módszer változatossága és egyszerűsége miatt az az elterjedtebb.

1.3. A nemkovalens molekuláris lenyomatú polimerek előállítása

Nemkovalens MIP-ek előállításánál a legfontosabb, hogy a polimer olyan funkciós csoportokat tartalmazzon, amelyek a templáttal nemkovalens kötéseket képesek létesíteni. Ezt általában azzal lehet elérni, hogy olyan monomerekből indulunk ki, amelyek a szükséges funkciós csoportokat tartalmazzák. Ezen túlmenően azonban a polimernek további fontos követelményeknek is meg kell felelnie. Egyrészt a templát számára átjárhatónak kell lennie, amit porózus szerkezet biztosításával lehet elérni; másrészt a kémiai lenyomatoknak stabil térbeli szerkezettel kell rendelkeznie, amit a polimer térhálósításával lehet elősegíteni. A térhálósításhoz molekulánként egynél több kettős kötést tartalmazó ún. keresztkötőket használnak. A porózus szerkezetet pedig porogén oldószerek hozzáadásával lehet kialakítani [14-16].

A polimerizációs láncreakció elindításához kis mennyiségű iniciátor alkalmazására is szükség van. A leggyakrabban alkalmazott iniciátorok önmagukban nem indítják meg a reakciót, ezt csak a termikus vagy fény hatására történő bomlásuk során keletkező gyökök hajtják végre. Ennek megfelelően a MIP-ek előállításánál szokás termikus vagy UV, esetleg gamma polimerizációról beszélni.

A molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek készítéséhez általánosan a következő vegyületekre van szükség:

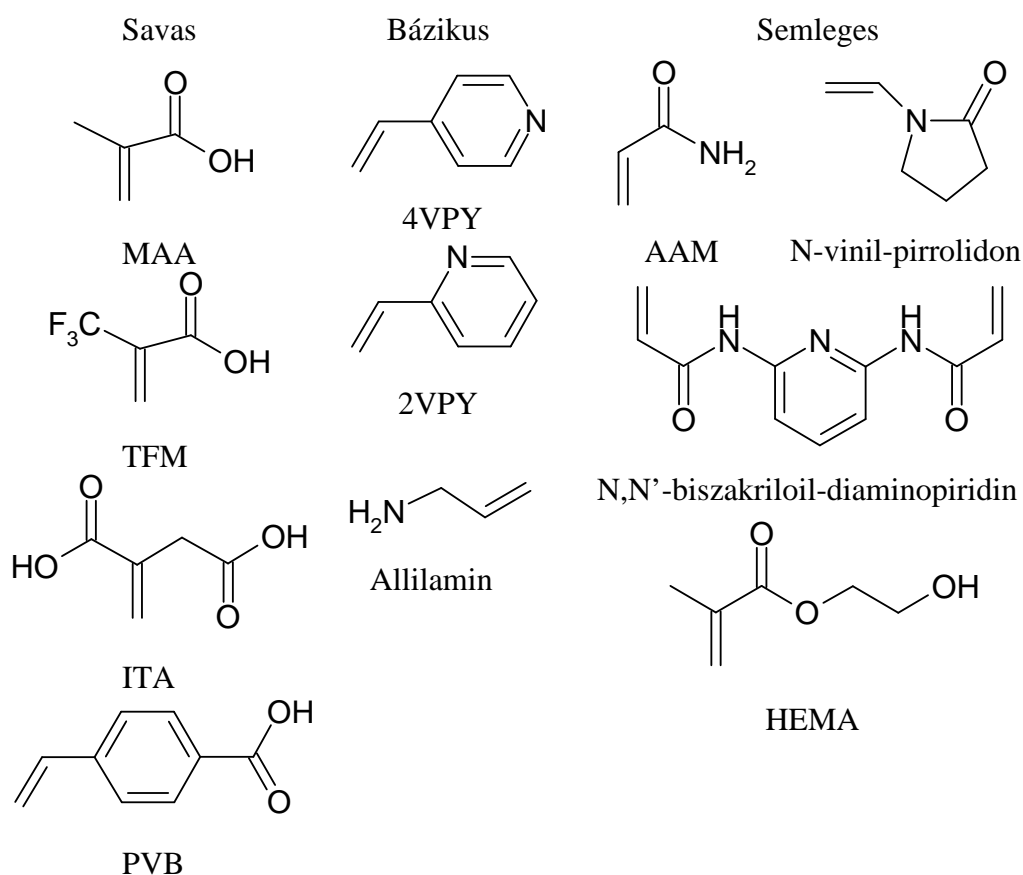
- Mintamolekula (templát): amire szelektívvé szeretnénk tenni a polimert
- Porogén oldószer: ez felelős a pórusok kialakításáért
- Funkcionális monomer: speciális kölcsönhatást létesít a mintamolekulával
- Keresztkötő komponens: keresztkötéseket létesít a polimerben

— Iniciátor: a polimerizációs lépés megindítására

A funkcionális monomer kiválasztásának fő szempontja: a monomer funkciós csoportjai és a mintamolekula között specifikus kölcsönhatások tudjanak létrejönni.

A nemkovalens lenyomatképzésben sokat használt funkcionális monomer a metakrilsav, ami hidrogénkötés donorként és akceptorként is működik, és van savas protonja, ami ionos kölcsönhatásokat tesz lehetővé. Másik gyakori monomer a metakrilamid.

Gyakran használt monomerek még az alábbi ábrán látható vegyületek (2. ábra):

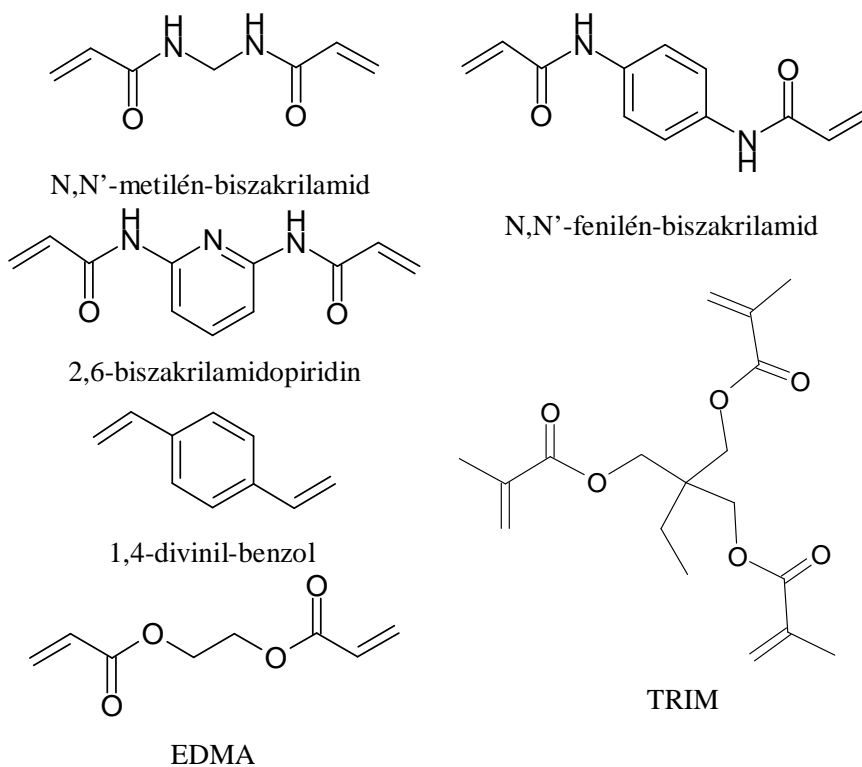


2. ábra Gyakran használt monomerek (MAA: metakrilsav, TFM: trifluor-metakrilsav, ITA: itakonsav, PVB: p-vinil-benzoészav, 4VPY: 4-vinil-piridin, 2VPY: 2-vinil-piridin, AAM: akrilamid, HEMA: 2-hidroxietyl-metakrilát)

A keresztkötő molekulákkal szemben támasztott követelmények: oldódjon a funkcionális monomer, mintamolekula és az oldószer elegyében. A keresztkötő komponensből olyan mennyiséget kell alkalmazni, hogy a kapott polimer kellő

mechanikai stabilitású legyen (pl. állófázisként használva), illetve, hogy biztosítsa a polimer funkciós csoportjainak a stabil térállását.

A leggyakrabban használt keresztkötő az etilén-glikol-dimetakrilát (EDMA). A 3. ábrán további gyakori keresztkötők is láthatók.



3. ábra Keresztkötők (EDMA: etilén-glikol-dimetakrilát, TRIM: trimetilolpropán-trimetakrilát)

A porogén általában olyan oldószer, ami nem rontja a funkcionális monomer és a mintamolekula közötti kötések (pl. H-híd kötések esetén diklórmétán, toluol, acetonitril), de pórusképző. Ezenkívül feladata még a polimerizációhoz szükséges komponensek feloldása. Másik szerepe a porogénnek az is, hogy a reakció során keletkező hőt elvezesse.

A porogén kiválasztása az imprintelés fajtájától függ. Kovalens imprintelésnél az oldószerek széles skáláját használják, azzal a kikötéssel, hogy az összes polimerizációs komponens feloldódjon. A nemkovalens imprintelésnél már kritikus a porogén kiválasztása, mert befolyásolja a funkcionális monomer-templát komplexek létrejöttét, és ezáltal az imprintelés hatékonyságát. Az egyik legelterjedtebb porogén a kloroform,

ami sok monomert és templátot old, és nem akadályozza meg a templát-monomer közti H-kötést. Egyetlen hátránya, hogy frissen kell desztillálni, mert általában etanollal van stabilizálva a mérgező foszgén keletkezésének megakadályozására. Az etanol azonban akadályozza a templát-monomer H-kötés létrejöttét. Gyakran használnak porogénként még toluolt és acetonitrilt is.

Iniciátorként leggyakrabban AIBN-t (2, 2'-azobisz(izobutironitril) és ADVN-t (2-2'-azobisz(2,4-dimetilvaleronitril) alkalmaznak. Fontos, hogy a polimerizációs elegy megfelelően oxigénmentesítve legyen, mert az oxigén jelenléte nem kedvez a gyököknek, a polimerizáció le is állhat.

Az alábbiakban néhány gyakran használt polimerizációs technikát mutatok be.

1.3.1. Tömbpolimerizáció

A MIP-ek előállításának leggyakrabban használt módja a tömbpolimerizáció, ahol a polimerizációs elegyet egy üvegedényben tömbként („bulk”) polimerizáltatják. Az így nyert tömbből elporítva, szitálva nyerhetők adott mérettartományba eső szemcsék.

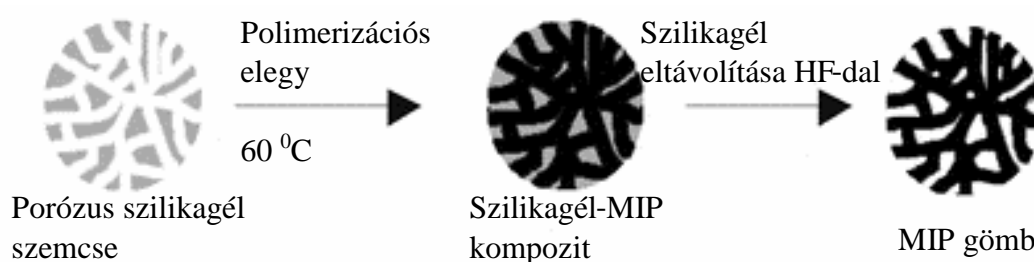
A tömbpolimerizáció kivitelezése egyszerű. A monomerek, a templát, az iniciátor és a porogén összemérése és oxigénmentesítése után a polimerizációs elegyet 24 órára 60 °C-ra termosztálva vagy pl. 5 °C-ra termosztálva néhány órás besugárzással nyerhető a tömb MIP. A tömbpolimerből aprítással és szitálással nyerhetők egyenletes méretű szemcsék.

A módszer hátránya a szitált szemcsék egyenetlen alakja és mérete, a szitálás munkaigénye, anyagvesztése. Ráadásul a reakcióhő miatt a termosztálás hatékonysága bizonytalan.

1.3.2. Egyenletes szemcseméretű, szabályos gömb alakú MIP-ek előállítása

A MIP-ek előállíthatók porózus hordozók, pl. a fordított fázisú HPLC-ben használt, módosított felületű porózus szilikagél szemcsék pórusaiban is [17].

Ha a tömbpolimerizációnál is használt polimerizációs elegyet felitatjuk a szilikagél pórusaiban, és ott játszátjuk le a polimerizációt, akkor az eredeti módosított szilikagél szemcseméretével megegyező méretű, gömb alakú kompozit szemcsék nyerhetők (4. ábra). A polimerizációs elegy maximális mennyiségét a szilikagél pórustérfogata határozza meg. Lehetőség van a szilikagél váz kioldására is, így szabályos alakú és méretű tiszta MIP szemcsék nyerhetők, azonban ezek mechanikailag nem elég stabilak. Ezért általában a kompozit szemcséket használják, ezeknél azonban ügyelni kell arra, hogy a templát az eredeti szilikagélen ne kötődjön. Ezért célszerű a fordított fázisú HPLC-ben használt, módosított szilikagél szemcsék alkalmazása. Meg kell jegyezni, hogy a szilikagél pórusaiban képződő MIP maga is pórusos, de értelemszerűen az átlagos pórusmérete csak kisebb lehet, mint a szilikagéké. Ezért célszerű viszonylag nagy pórusméretű (200 Å) szilikagéleket alkalmazni.



4. ábra MIP előállítása szilikagél pórusaiban

Előállítanak gömb alakú MIP szemcséket hordozó nélkül is. Megfigyelték például, hogy ha a tömpolimerizációnál használt recepthez képest a porogénből jóval nagyobb mennyiséget használnak, akkor szabályos gömb alakú polimerszemcsék nyerhetők. Ennek a kicsapásos polimerizációs módszernek a hátránya, hogy sokszor túl kicsik a szemcsék (1-2 μm), és híg oldatban a prepolimerizációs komplex egyensúlya a disszociáció irányába tolódik el [18].

Szintén gömb alakú szemcséket lehet nyerni szuszpenziós polimerizációval [19,20].

Elválasztástechnikai alkalmazásokhoz újabban monolit-MIP kolonnákat is használnak [21-23].

1.4. Molekuláris lenyomatú polimerek jellemzése

1.4.1. Fizikai vizsgálatok

A polimer szemcsék alakja, mérete optikai-, illetve elektronmikroszkóppal vizsgálható. Nitrogénadszorpciós mérésekkel meghatározható a fajlagos felület, pórustérfogat, átlagos pórusátmérő és a pórusátmérő eloszlás. A méréseknél az adszorbeált nitrogén mennyiségét mérik a relatív nyomás függvényében. Mérik az adszorpciós és a deszorpciós ágat is.

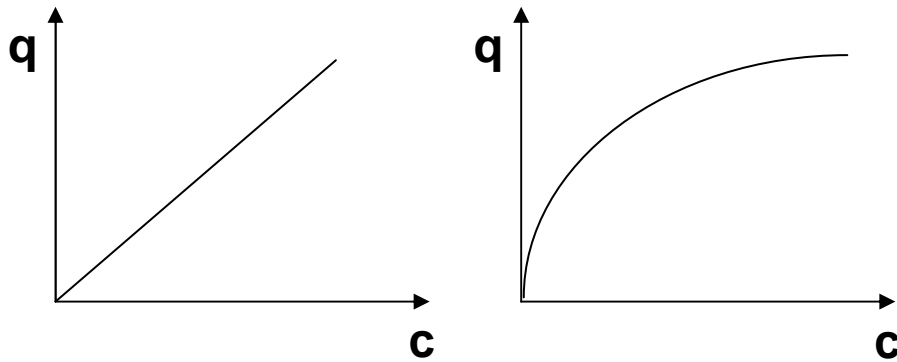
A MIP-eket sok esetben vizsgálták spektroszkópiai módszerekkel (pl. IR, szilárd NMR) is[24,25], de ezek a mérések nem szolgáltatnak olyan adatokat, amelyekkel a MIP-eket a gyakorlati alkalmazás céljára jellemezni lehetne.

1.4.2. Kémiai vizsgálatok

A polimerek kémiai vizsgálatára több módszer ismeretes. Hogy melyiket használjuk, az nagyban függ a későbbi felhasználás jellegétől. Az azonban mindegyik módszerre igaz, hogy valamilyen módon a templát visszakötődését jellemzi.

Adszorpciós izoterma mérése:

A legteljesebb jellemzésre az adszorpciós izoterma használható, ami adott hőmérsékleten megadja a kötött templát mennyiségének (q) függését az egyensúlyi oldatkonzentrációtól (c). Az adszorpciós izoterma jellegét tekintve lehet lineáris és nemlineáris (5. ábra). Lineáris esetben a meredekség megadja a koncentrációfüggetlen megoszlási hányadost. Nemlineáris esetben az origóból a görbe adott pontjához húzott húr meredeksége adja meg a megoszlási hányadost, ami ily módon egyensúlyi koncentrációfüggő.



5. ábra Adszorpciós izotermák. A bal oldalon lineáris, a jobb oldalon nemlineáris esetben.

Az adszorpciós izoterma meghatározására alkalmas egyszerű módszer az ún. batch adszorpciós mérés. Menete a következő: a vizsgálni kívánt polimerből adott tömeget bemérünk egy lezárható edénybe, pl. eppendorf csőbe, rámérünk adott térfogatú, ismert koncentrációjú oldatot. Az egyensúly beállásáig termosztátba helyezzük. A felülűszóban mérjük a vizsgált komponens, többnyire a templát maradék koncentrációját (c , egyensúlyi koncentráció). Ezután a szilárd fázisban a koncentráció (q) kiszámolható az eredeti és az oldatban maradt anyagmennyiség különbségéből. A batch adszorpció így módon alkalmas adszorpciós izoterma meghatározására tetszőleges hőmérsékleten különböző oldószerekben.

Kromatográfiás jellemzés: a polimereket HPLC-s oszlopba töltve vizsgálhatók állófázisként a tulajdonságai [13]. Különböző komponenseket külön vagy akár együtt injektálva az oszlopra meg szokták határozni a retenciós idő (t_R), majd a holtidő (t_0) ismeretében a retenciós tényező (k). A méréseket molekuláris lenyomatot tartalmazó (MIP) és lenyomatot nem tartalmazó (Non Imprinted Polymer, NIP) oszlopokon elvégezve meghatározható az Imprintelési Faktor (IF), ami a MIP és NIP oszlopokon kapott k értékek hányadosa. Ezenkívül számolnak még elméleti tányérszámot (N) és Aszimmetria Faktort (AF) is.

A kromatográfiásan mért paramétereket a szakirodalomban gyakran alkalmazzák a polimerek jellemzésére, összehasonlítására [13]. Értekezésemben megmutatom, hogy ez a gyakorlat helytelen, és számos félreértéshez vezet.

1.5. Molekuláris lenyomatú polimerek alkalmazási területei

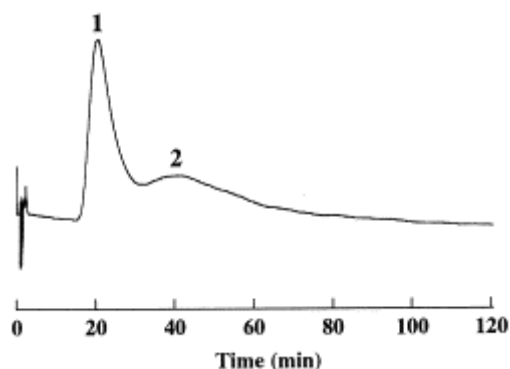
1.5.1. Elválasztástechnikai alkalmazások

A molekuláris lenyomatú polimerek, mint szelektív szorbensek elválasztástechnikai módszereknél (például: HPLC, SPE, CEC) állófázisként használhatók.

1.5.1.1. HPLC

A molekuláris lenyomatú polimereket akkor észszerű kromatográfiás állófázisként használni, ha a velük elérhető nagyfokú szelektivitásra szükség van. Tipikusan ilyen probléma az optikai izomerek elválasztása. Bár ma már sok oszlop kapható a kereskedelemben, amelyekkel meg lehet kísérni optikai izomerek elválasztását, az oszlopkiválasztás és a mérési körülmények optimalizálása nagy szakmai tapasztalatot igényel. Mivel a királis oszlopok általában egyfajta kiralitással készülnek, így a mintában lévő enantiomerek elúciós sorrendjét nem tudjuk megválasztani. A molekuláris lenyomatú polimerek alkalmazása lehetővé teszi, hogy egy adott vegyület optikailag aktív izomerjeinek elválasztására alkalmas állófázist készítsünk. A templát enantiomer megválasztásával pedig előre meg tudjuk határozni, hogy melyik izomernek lesz nagyobb a visszatartása. A molekuláris lenyomatú polimerek királis elválasztásokra történő alkalmazási lehetőségeit mutatja be egy kiváló kritikai összefoglaló cikk, melyet a királis elválasztások egyik legismertebb képviselője W. Lindner írt [26]. Az ő véleménye szerint a királis MIP állófázisok az elérhető jó szelektivitások dacára nem bizonyultak elég sikeresnek, amit ő a kötőhelyek kis koncentrációjának, heterogén eloszlásának és lassú kinetikájának tulajdonít.

Mindezek ellenére sok példa található az irodalomban királis MIP-ekre. Ezek elsősorban királis gyógyszermolekulák elválasztásával foglalkoznak, úgy, mint ibuprofen [27], propranolol [28,29] vagy naproxen [30,31]. Egy tipikus elválasztást mutat a 6. ábra. Jól látható, az imprintelt enantiomer (2 jelű komponens) csúcsának elnyúlása.



6. ábra Propranolol enantiomerek elválasztása (S)-propranololra imprintelt polimerrel töltött oszlopon (4,6 mm x 100 mm), eluens: 20 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH=5,1)/acetonitril (30:70, v/v), V= 1 ml/min, λ= 210 nm, injektált mennyiség: 1000 ng (az 1-es csúcs az R, a 2-es az S izomer) [28]

A széles, elhúzódó csúcsok problémája megakadályozta a MIP-ek széleskörű alkalmazását folyadékkromatográfiai állófázisként. Mostanában azonban számos tanulmány rámutatott, hogy a MIP-eknek mégis helyük lehet a kromatográfiai laboratóriumok eszközkészletében. Miközben a valódi minták esetén a MIP-ek fontosabb megjelenési formája az SPE (Szilárd Fázisú Extrakció, Solid Phase Extraction), a MIP-ekkel töltött HPLC oszlopok alkalmazása is hasznos lehet.

Gyakran szükség van kémiai rokon vegyületek egy csoportjának komplex mintáktól való elválasztására. MIP oszlop használható abban az esetben, ha a MIP kis szelektivitással rendelkezik a csoport tagjai között, de nagy a szelektivitása az egyéb vegyületekkel szemben. A csoport együttes, nem elváló csúcsa egy frakcióba összegyűjthető, majd újbóli futtatással komponenseire bontható. Mindez megvalósítható frakciószedés nélkül is egy MIP előtétoszlop és az analitikai oszlop oszlopváltó segítségével történő összekapcsolásával [32,33].

1.5.1.2. Szilárd fázisú extrakció

A MIP-ek elválasztástechnikai alkalmazásai közül legjobban bevált az SPE oszlop töltetként való felhasználás. Ezt mutatja az is, hogy MIP-ekkel töltött SPE oszlopok már kereskedelmi forgalomban is kaphatók [34]. Az SPE-t általában a célvegyületnek a

mátrix zavaró komponenseitől való előzetes elválasztására, az analitikai mérések szelektivitásának javítására használják. A célvegyületek fel is dúsulhatnak az SPE oszlopon.

A kereskedelemben kapható SPE (általában nem MIP) töltetek kémiai változatossága nem túl nagy (bár e téren az utóbbi időben változás tapasztalható). A sokféle alkalmazásban a megfelelő szelektivitást a mosó illetve az elúciós oldószer megválasztásával próbálják elérni, de ezzel a lehetőségek is elég korlátozottak. A MIP-ek ezzel szemben szinte minden templátra szelektívvé tehetőek.

A hagyományos SPE szorbensek a HPLC állófázisokhoz hasonlóak. Ezek az anyagok általában széles körben hozzáférhetőek, jól ismertek, nagy kötési kapacitással rendelkeznek és lineáris adszorpciós tulajdonságot mutatnak.

Mostanában több bonyolult mintaelőkészítési eljárás esetén a hagyományos SPE töltetknél nagyobb szelektivitású szorbenst alkalmaznak. Az affinitás-típusú szorbensek, különösen az immuno-szorbensek nagy népszerűsége tetek szert nyomnyi koncentrációk esetén, nemcsak biológiai makromolekulák estén, hanem kismolekuláknál, pl. aflatoxinoknál is. A MIP-eknek az affinitási fázisokhoz hasonló tulajdonságaik vannak, ezért olyan különleges alkalmazásoknál kerülhetnek szóba, ahol más mintaelőkészítési módszerek túl fáradtságosak. Ez vonatkozik vagy egy adott célvegyület vagy rokon vegyületek egy csoportjának a mátrixtól való elkülönítésére.

Egy összefoglaló cikk [35] rámutatott arra a tendenciára, hogy az utóbbi időben a MISPE (MIP-SPE) irodalmában a pusztán az elméletet alátámasztó közlemények helyét átvették a valódi mintákkal megvalósuló alkalmazások. A szerzők egy öt éves időszakban 110, megjelent eredeti cikket találtak, amelyek a MISPE valós mintákon való alkalmazását írják le. Ezek a minták négy fő típusával foglalkoznak: környezeti, biológiai, élelmiszer és gyógyszer. A MISPE-t gyakran HPLC-s meghatározás követi [36-39], kevésbé elterjedt a GC [40], de szintén érdekes példákat találunk arra, hogy közvetlenül a detektálás következik pl. elektrokémiai [41] vagy spektroszkópiai módszerekkel [42].

1.5.1.3. Kapilláris elektrokrómográfia (CEC)

Az utóbbi években a CEC a HPLC alternatívájaként jelent meg. A CEC nagyon hasonló a töltött kapillárisban megvalósuló HPLC-hez azzal a különbséggel, hogy az áramlás nem a nyomás, hanem feszültségesés miatt következik be és, hogy az ionos vegyületek esetén a fázisváltáson kívül az elektroforézis is szerepet játszik.

A MIP-ek felhasználása CEC-ban előnyös, mert kombinálja a MIP-ek szelektivitását a CEC nagy elválasztó képességével. Azt a problémát, hogy a tányérmagasság csökkentése nem javítja jelentősen a MIP fázisokon létrejövő csúcsalakot, valószínűleg nem ismerték fel rögtön a MIP CEC kifejlesztése során. Ch. Nilsson és S. Nilsson által közölt összefoglaló cikkben [43] megállapítást nyert azonban, hogy „Ezidáig minden vizsgált, imprintelésen alapuló CEC elválasztás csúcs-elhúzóással járt az imprintelt receptor helyek polidiszperzitása miatt, amely különböző affinitást és lassú anyagátadást eredményezett.”

Sok energiát fordítottak a MIP CEC rendszerek technikai fejlesztésére. Ezekről 2007-ben Liu és munkatársai [21] publikáltak egy összefoglaló cikket. A legérdekesebb ezek közül a MIP (nano)részecskék alkalmazása a háttér elektrolitban. Hasonlóan a jobban ismert micelláris elektrokinetikus kromatográfiához, ahol egy micelláris oldatot használnak az elektroforézis kapillárisában, egy szilárd adszorbenst is el lehet osztani az elektrolitban. A részecskék leülepedésének elkerülése érdekében a méretük a nanotartományba kell, hogy essen. A részecskék töltéssel kell, hogy rendelkezzenek, hogy az elektroosztatikus áramlásától eltérő sebességgel vándoroljanak. A vizsgálandó vegyületek megoszlása az elektrolit és a szilárd részecskék között következik be, így az effektív sebességük az elektroosztatikus sebesség és a részecskék sebességének súlyozott átlaga lesz. A súlyozási faktor a fázisaránytól és a vegyület megoszlási hányadosától függ.

A MIP nano-részecskék (amelyeket például kicsapásos polimerizációval állítanak elő) szintén felhasználhatók ebben a technikában. A részecskék jelenléte miatt az optikai detektálásban fellépő problémák elkerülése érdekében a részleges feltöltés módszerét alkalmazták [44]. Ennél a MIP részecskék töltése olyan kell, hogy legyen, hogy a teljes sebességük kisebb legyen, mint az elektroosztatikus áramlás sebessége. Először a MIP

részecskéket, majd a mintát injektálják dugószerűen. A vizsgálandó vegyületek az elektroosztatikus áramlás révén jutnak át a részecskék zónáján, ahol a megoszlás miatt különböző mértékben lassulnak le. Végül a vegyületek a MIP részecskék zónáját az elülső oldalon hagyják el, így - a komponensek immár egymástól elválva – hamarabb érik el a detektort, mint a részecskék. Következésképpen nem lép fel a detektorban a részecskék miatti interferencia.

Az elektrolitban diszpergált részecskék, mint pszeudo-állófázisok használatának számos előnye (és néhány hátránya) van. Nem szükséges töltési eljárás. Nem kell szűrőket használni. A szilárd fázis mindig megújul, így a komplex mintákból származó keresztzennyezés nem probléma.

1.5.2. Kötési vizsgálat (binding assay)

A molekuláris lenyomatú polimereket ellenanyagok helyettesítésére is lehet használni az analitikában. Az ellenanyagokat gyakran használják szilárd hordozóhoz kötve. Ebben az esetben a MIP-ekkel való hasonlóság különösen nyilvánvaló: olyan szilárd szorbensről van szó, amely speciális kötőhelyeken képes bizonyos molekulák szelektív megkötésére. Az ellenanyagok analitikai alkalmazásának két gyakori formája az immunoassay illetve az affinitás kromatográfia. Az immunoassay lehet kompetitív vagy nemkompetitív, többnyire szendvics módszer. A MIP-ekkel általában csak a kompetitív mérés valósítható meg, mivel a szendvics módszernél két ellenanyagot használnak, melyek közül az egyik nem lehet szilárd fázishoz kötött. Ebben a fejezetben csak a kompetitív immunoassayhez hasonló alkalmazásokról írok, mert az affinitáskromatográfiának a MIP-eknél a MIP-kromatográfia felel meg, amely értekezésem másik részében szerepel.

A kompetitív mérés lényege, hogy a MIP-en lévő kötőhelyekért a mérendő anyag egy jelzett anyaggal versenyez. A jelzett anyag lehet kémiai azonos a mérendő anyaggal, ha radioaktív nyomjelzést alkalmazunk, pl. tríciummal. Ebben az esetben homológ kompetícióról beszélünk. A jelzésnek sok más változata is lehetséges pl. fluoreszcens vagy enzimes.

A MIP-ek és a biológiai eredetű ellenanyagok közti különbségek miatt jellegzetes eltérések vannak a mérés megvalósításánál. A monoklonális ellenanyagoknál a

kötőhelyek teljesen homogének, míg a MIP-ek kötőhelyei jelenlegi ismereteink szerint heterogének. Bár heterogenitással a természetes ellenanyagoknál is találkozhatunk, ha azok poliklonálisak, a nemkovalens MIP-eknél azonban jellemző, hogy a nemszelektív kötőhelyek feleslegben vannak a szelektív kötőhelyekhez képest. Mivel a szelektív kötőhelyek ugyanakkor sokkal erősebben kötnek, mint a nemszelektívek, ezért a kompetitív MIP binding assayt általában a maximálisan megköthetőnél nagyságrendekkel kisebb mintakonzentrációban alkalmazzák. Lényeges különbség még a szokványos immunoassayhez képest, hogy a MIP-ek általában porózus szemcsék formájában készülnek, és a kötőhelyek a pórusokban vannak. Emiatt makromolekulák általában nem férnek hozzá a kötőhelyekhez, tehát egyrészt makromolekuláris mintaösszetevők nem mérhetők, másrészt enzimjelzést sem lehet alkalmazni. Az utóbbi időben azonban egyre többen készítenek MIP-eket vékony felületi filmek formájában, ahol ilyen korlátozás nincsen.

1. Táblázat Molekuláris lenyomatú polimerek felhasználása binding assay alkalmazásokban

Templát	Jelzett anyag	Oldószer	Lehetséges zavaró anyagok	Hivatkozás
Diazepam	³ H-diazepam	Acetonitril/ecetsav (99:1)	Diazepin származékok	[8]
Teofillin	³ H-teofillin	Acetonitril/ecetsav (99:1), toluol/THF (9:1), acetonitril, toluol	Teobromin, koffein, xantin-vegyületek	[8,16,45-49]
Atrazin	¹⁴ C-atrazin	Acetonitril, toluol	Triazinok	[50,51]
Morfin	³ H-morfin	Toluol	Ópiátok	[52]
S-propranolol	³ H-S-propranolol	Toluol, különböző vizes pufferek, 60%-os plazma	R-propranolol	[53-58]

A legegyszerűbb esetben a mérendő anyag maga a templát, és a jelzett anyag a templát izotópjelzett származéka. Erre az esetre mutat néhány példát az 1. Táblázat.

1.5.3. Katalízis

A molekuláris lenyomatú polimerek katalízishez történő felhasználásánál általában a reakció átmeneti állapotának megfelelő vegyületre imprintelnek. Más esetekben a katalitikus hatást például egy egyszerű bázikus csoport fejt ki, de az ehhez való hozzáférést szelektívvé teszi, hogy a katalitikus csoport egy imprintelt „üregben” helyezkedik el [59].

Az első példa MIP-ek katalízisben történő felhasználására p-nitrofenil-acetát hidrolízise volt [60]. Az átmeneti állapotnak megfelelő vegyület a p-nitrofenil-metilfoszfonát volt. A MIP 1,7-szer nagyobb katalitikus aktivitást mutatott, mint a NIP. Amikor templátot is adtak az elegyhez, az aktivitás csökkent, amiből arra következtettek, hogy az imprintelt üregek valóban katalitikus helyként működnek.

1.5.4. Szenzorok

Molekuláris lenyomatú polimereket szenzorként először fenilalanin-anilid mérésére használtak kapacitív szenzorként [61]. Később elsősorban konduktometriás [62] és optikai (fluoreszcencián alapuló) szenzorokat készítettek. A fluoreszcenciát kétféle módon használják: vagy a MIP-hez kötődő mintamolekula idéz elő változást a polimerbe épített fluoreszcens csoportban, és ezt a változást mérik [63], vagy pedig a fluoreszcens mintamolekula MIP-hez kötődését mérik általában száloptika segítségével [64].

Manapság a legelterjedtebb a kvarckristály mikromérlegen (QCM: quartz crystal microbalance) alapuló szenzor. Végeztek mérést ilyen QCM-MIP-pel S-propranolol meghatározására savas acetonitril oldatból [65], illetve érdekes gyakorlati alkalmazás motorolajok degradálódásának nyomonkövetése ezzel a módszerrel [66]. Különösen érdekesek a sejtekkel [67] vagy pollen szemcsékkel [68] imprintelt QCM szenzorok. A

legújabb detektálási technikákat, pl. felületi plazmon rezonanciát (SPR) és a fotonikus kristályokat is alkalmazzák MIP-ekkel kombinálva [69-71]

1.6. Molekuláris lenyomatú polimerek kromatográfiás viselkedése

A molekuláris lenyomatú polimerekkel töltött kromatográfiás oszlopokon végzett kísérleteket célszerű két csoportra osztani:

- a molekuláris lenyomatú polimerek jellemzésére irányuló kísérletek,
- célvegyületek elválasztása molekuláris lenyomatú polimerekkel töltött kromatográfiás oszlopokon.

A MIP HPLC oszlopok bármely felhasználása együtt jár a szokatlanul széles és tailinges csúcsokkal. Ezek a jelenségek a templát esetén a legnyilvánvalóbbak, de más vegyületek esetén is gyakran észlelhetők. Többféle magyarázatot javasoltak ennek a jelenségnek az értelmezésére, többek között az alábbiakat:

- túl nagy MIP részecskék
- a MIP részecskék szabálytalan alakja
- a kötőhelyek inhomogenitása
- lassú anyagátadási kinetika
- a vegyületek adszorpciós izotermájának nemlineáris jellege a MIP-eken

Mindezen faktorok hozzájárulhatnak a problémához, de ezeknek a hatását csak ritkán különítették el és hasonlították össze. Több sikeres eljárást találtak kis, egységes méretű, szférikus MIP töltetek előállítására (pl. kicsapásos polimerizáció vagy MIP-ek készítése porózus, szférikus részecskék üregeiben vagy többlépéses duzzasztás) de a csúcsok szélessége és aszimmetriája alig volt csökkenthető ily módon. Tehát a fenti felsorolásból maradó 3 faktor (a kötőhelyek inhomogenitása, a lassú anyagátadási kinetika, nemlineáris izoterma) jelentősebbnek tűnik. Az izoterma nemlineáris jellege gyakorlatilag minden esetben megfigyelhető a MIP-eknél, tehát ennek a hatását mindig figyelembe kell venni. A kötőhelyek inhomogenitása és az izoterma nemlineáris jellege

nem független egymástól. A kötőhelyek inhomogenitása gyakorlatilag minden esetben nemlineáris izotermát eredményez. De még teljesen homogén kötőhelyek esetén is az izoterma (ebben az esetben Langmuir izoterma) nemlineáris lehet attól függően, hogy mik az izoterma paraméterei és milyen koncentrációtartományban dolgozunk.

A nemlineáris kromatográfiás rendszerek leírása jóval bonyolultabb, mint a lineárisaké. ezért a nemlineáris kromatográfiával egy későbbi alfejezetben külön foglalkozom.

1.6.1. A MIP-ek jellemzése HPLC-vel

A molekuláris lenyomatú polimerek jellemzésére számos szerző használja azt a módszert, hogy kromatográfiás oszlopba tölti a polimert, és a templát kromatográfiás csúcsának helyéből von le következtetéseket.

Az imprintelés jóságát az imprintelési faktoralal jellemzik, ami az imprintelt polimerrel töltött és a kontroll (nem imprintelt) polimerrel töltött oszlopon mérhető retenciós tényezők hányadosa.

Szokás ezenkívül a MIP-ek szelektivitását a kromatográfiás szelektivitási tényezővel (α) jellemezni. Ez esetben a templát és a hozzá hasonló zavaró anyag retenciós tényezőjének aránya adja a jellemzés alapját.

Egyik mérőszám számításakor sem veszik figyelembe a MIP-ekre jellemző nemlineáris adszorpciós izotermából adódó problémákat. Ezekkel értekezésemben bővebben foglalkozom.

MIP-ek adszorpciós izotermáját frontális kromatográfiás módszerrel is szokták mérni [72].

1.6.2. A nemlineáris kromatográfia alapjai

Nemlineáris kromatográfiáról akkor beszélünk, ha az adszorpciós izoterma nemlineáris. Ez a kifejezés azonban még egy dolgot takar. Nevezetesen, hogy ilyenkor az izoterma alakja összetett oldatokban nemcsak a vizsgált komponenstől, hanem az oldat más

komponenseitől is függhet. Ennek oka lehet például a különböző komponensek közti versengés a kötőhelyekért, vagy, hogy az egyik anyag a már megkötődött másik anyagra adszorbeálódik. Ily módon a kromatográfiás csúcs alakja és helye függ a minta koncentrációjától és összetételétől. Ez a helyzet (az izoterma nemlinearitása) jellemző a preparatív kromatográfiás alkalmazásokra. A nemlineáris kromatográfia leírása bonyolult. Ennek egyszerűsítésére definiálták az ideális kromatográfiát, ahol az oszlop elméleti tányérmagassága nulla (és így a tányérszám végtelen), tehát lényegében eltekinthetünk a hagyományos értelemben vett axiális diszperziótól.

A kromatográfiás oszlopon lezajló folyamatokat modellezni lehet. A modellezés leggyakoribb módja parciális differenciálegyenletek felírása. Ezen egyenletek bonyolultsága attól függ, hogy milyen részletességgel akarjuk leírni a folyamatokat, illetve, hogy egy-egy rendszerben mely részfolyamatoknak van nagyobb illetve kisebb jelentősége. Ha az izoterma nemlineáris és az ideális kromatográfia modelljét (HETP=0) használjuk, továbbá feltételezzük, hogy az adszorpciós egyensúly beállása végtelen gyors, akkor viszonylag egyszerű alakra hozható az egyenlet [73]:

$$\frac{\partial c}{\partial t} + F \frac{\partial q}{\partial t} + u \frac{\partial c}{\partial z} = 0 \quad \text{1. Egyenlet}$$

Ahol: c az egyensúlyi koncentráció az eluensben, F a fázisarány, q a megkötött mennyiség egységnyi tömegű állófázison, t az idő, u az áramlási sebesség, z pedig távolság a kromatográfiás oszlop tengelye mentén. Ez az egyenlet annak figyelembevételével, hogy q kizárólag c függvénye, tehát csak c -n keresztül függ a helytől és az időtől, a következő alakra hozható:

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \frac{u}{1 + F \frac{dq}{dc}} \frac{\partial c}{\partial z} = 0 \quad \text{2. Egyenlet}$$

Ebből az egyenletből a kezdeti feltételek megadása után meghatározható a c koncentráció a hely és az idő függvényében. Ez a kétváltozós függvény a háromdimenziós térben ábrázolható, és elkészíthetők különböző koncentráció értékekhez tartozó szintvonalai is. A szintvonal egyenletét viszonylag könnyen megkaphatjuk, mivel itt c teljes differenciálja 0, azaz

$$\frac{\partial c}{\partial z} dz + \frac{\partial c}{\partial t} dt = 0 \quad \text{3. Egyenlet}$$

ahonnan a 2. Egyenletet is felhasználva:

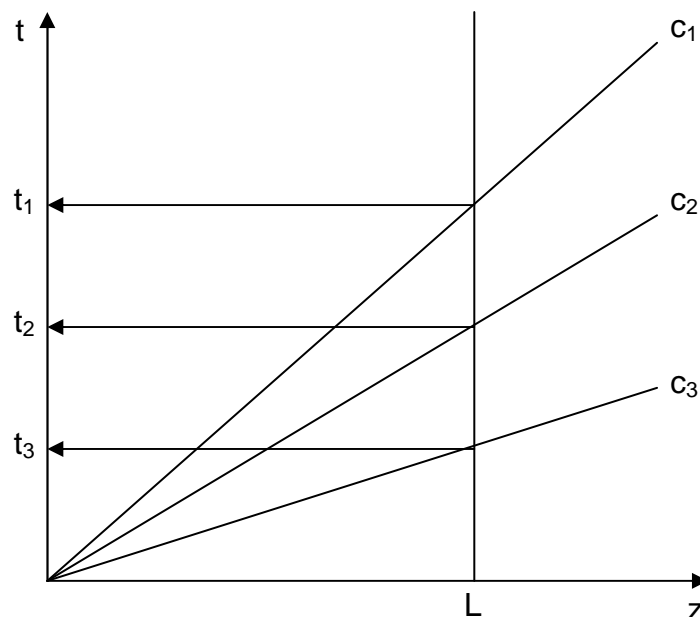
$$\frac{dz}{dt} = -\frac{\frac{\partial c}{\partial t}}{\frac{\partial c}{\partial z}} = \frac{u}{1 + F \frac{dq}{dc}}$$

4. Egyenlet

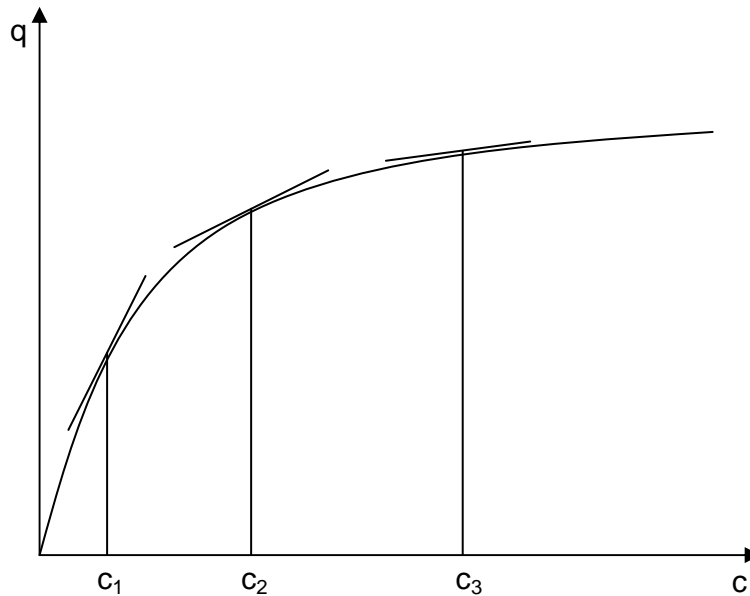
Mivel konstans koncentráció esetén $\frac{dq}{dc}$ is konstans, így a jobb oldalon álló mennyiség a kromatográfiás oszlop bármely pontjában, bármely pillanatban ugyanazt az értéket veszi fel, ha ott és akkor a koncentráció az eluensben c . Eszerint tehát a tetszőleges konstans c -hez tartozó szintvonal a (z,t) síkba levetítve egyenest ad, melynek meredeksége:

$$\frac{dt}{dz} = \left(\frac{dz}{dt}\right)^{-1} = \frac{1 + F \frac{dq}{dc}}{u}.$$

Tekintsük most a (z,t) síkban a $z=L$ egyenest, ahol L a kromatográfiás oszlop hosszúságát jelenti. Az oszlop végén elhelyezett detektor t idő után a $z=L$ helyen érvényes koncentrációt méri. A 7. ábrán látható módon minden c koncentrációhoz meghatározható az a t idő, amikor a detektorban a koncentráció c értékű.



7. ábra Izokoncentrációs vonalak vetületei a (z,t) síkban



8. ábra Adszorpciós izoterma érintői

Mivel a 7. ábrán a c koncentrációhoz tartozó egyenes meredeksége $\frac{t(c)}{L}$, így:

$$\frac{t(c)}{L} = \frac{1 + F \frac{dq}{dc}}{u}$$

5. Egyenlet

Így

$$t(c) = \frac{L}{u} \left(1 + F \frac{dq}{dc} \right) = t_0 \left(1 + F \frac{dq}{dc} \right)$$

6. Egyenlet

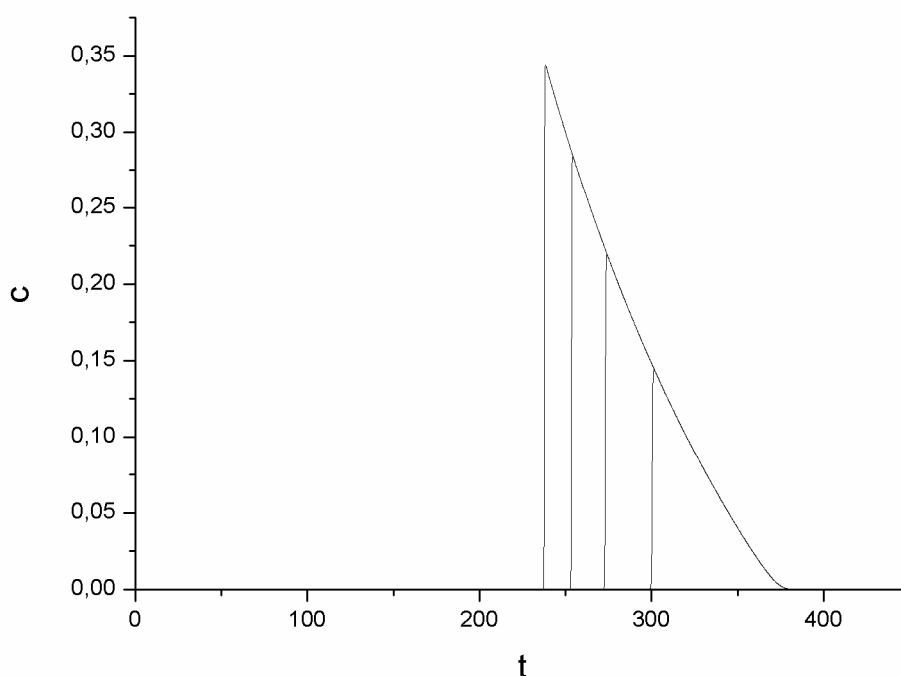
ahol t_0 a holtidő, F a fázisarány, az utolsó tag pedig az adszorpciós izoterma meredeksége c koncentrációnál (8. ábra).

Az egyenlet tulajdonképpen adott koncentrációhoz tartozó retenciós időt adja meg a kromatogramon, ugyanis $\frac{dq}{dc}$ értéke meghatározza c értékét is, ha az izoterma

nemlineáris és nem is annyira speciális, hogy különböző koncentrációknál ugyanaz legyen a meredeksége. Így tehát megkaptuk a kromatogram időbeli lefutását (9. ábra). A szokásos konvex (Guiochon alulról tekinti a görbét, ez a szokásos matematikai szóhasználatban felülről konkáv görbe, tehát az ő szóhasználatában konvex. Én az értekezésemben Guiochon szóhasználatát követem) izotermák esetén időben csökkenő koncentrációértékeket kapunk, ami a kromatogram úgynevezett leszálló ága. A felszálló

ág ugyanis az ideális nemlineáris kromatográfia esetében egy függőleges vonal. Ennek matematikai igazolását itt nem tudjuk megadni bonyolultsága miatt, de szemléletesen könnyen belátható. Konvex izoterma esetén ugyanis kisebb koncentrációkhoz nagyobb izotermamerevedésként tartozik, ezért a kis koncentrációk haladási sebessége kisebb, mint a nagyobb koncentrációké. Ezért ha a kromatográfiai zóna vagy front elején nem függőlegesen, hanem fokozatosan futna fel a koncentráció, akkor a magasabb koncentrációk egy idő múlva utolérnék az alacsonyabbakat, és ismét függőleges lenne a zóna elején a koncentráció felfutása.

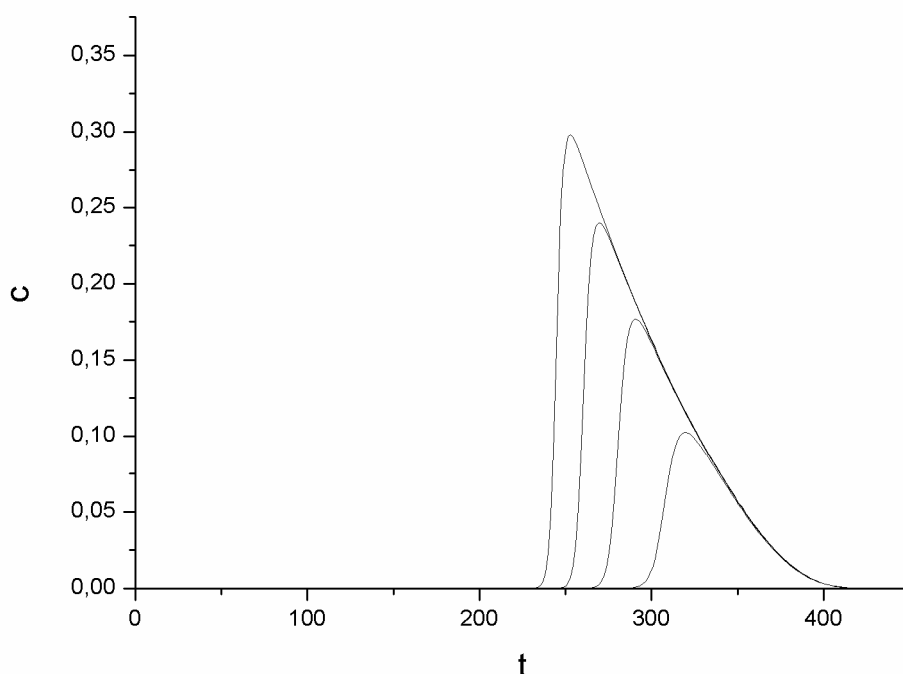
Az eddigiek alapján tudjuk tehát, hogy a kromatogram egy függőleges szakasszal kezdődik, és tudjuk azt is, hogy mi a leszálló ág egyenlete. Nem tudjuk viszont, hogy hol van a függőleges szakasz. Ezt az anyagmérleg alapján határozhatjuk meg. A kromatográfiai csúcs alatti terület ugyanis a térfogatárammal szorozva ki kell, hogy adja a beinjektált anyagmennyiséget. Az itt leírt modell alapján a kromatogramokat számítógépen is meg tudjuk rajzolni, ha ismerjük az izoterma egyenletét. Így megrajzolt kromatogramokat mutat a 9. ábra.



9. ábra Különböző koncentrációjú kromatográfiai csúcsok ideális nemlineáris esetben

Az ábrán több kromatográfiás csúcs is látható, amelyek azonos körülményekhez, de különböző beinjektált koncentrációkhoz (mólszámokhoz) tartoznak. Ezen az ábrán láthatjuk, hogy a kromatogramok leszálló ága minden esetben ugyanarra a görbére esik, ahogy az a fenti levezetésből is adódik. A csúcsmaximum helye pedig nagymértékben függ a beinjektált anyagmennyiségtől. Ezek a tulajdonságok nagyon eltérnek a lineáris kromatográfiában megszokottaktól.

Az ideális kromatográfia modellje, ahogy a neve is mutatja egy idealizált esetet ír le, amikor az elméleti tányérmagasság nulla. A gyakorlatban természetesen ez nincs így, és emiatt a kromatográfiás csúcsok alakja is más, mint a fentebb bemutatott.



10. ábra Különböző koncentrációjú kromatográfiás csúcsok nemideális nemlineáris esetben

Reális csúcsalakokat mutat a 10. ábra. A felszálló ág nem teljesen függőleges, és a csúcsmaximum sem hegyes. A nemideális viselkedés leírására az 1. Egyenletet további tagokkal kell kiegészíteni, illetve módosítani kell. Ezek a módosítások részletesen megtalálhatók Guiochon és munkatársai könyvében [73]. A módosított egyenlet alapján a kromatogramok számítógépen szimulálhatók. A szimulációhoz különböző algoritmusokat dolgoztak ki, melyek matematikai háttere bonyolult.

A fenti megállapítások arra az esetre vonatkoznak, amikor csak egyetlen komponenst injektálunk az oszlopra. Ha kettő (vagy több) komponenst együtt injektálunk, akkor az 1. Egyenletet minden komponensre külön fel kell írni. Ezek az egyenletek nem függetlenek egymástól, mert az i -edik komponensből adszorbeálódott koncentráció, q_i nemcsak az i -edik komponens oldatbeli koncentrációjától, c_i függ, hanem a többi komponens c_j , c_k stb. koncentrációjától is. Ha mindehhez hozzávesszük a nemidealitást, vagyis, hogy a HETP nem nulla, akkor olyan bonyolult egyenletrendszert kapunk, amelyet már csak numerikusan lehet megoldani.

2. Célkitűzések

Értekezésem tárgya a molekuláris lenyomatú polimerek vizsgálata, különös tekintettel azok analitikai alkalmazásaira.

A molekuláris lenyomatú polimerek szelektív szorbensek. A szelektív adszorpciós képesség a gyakorlatban számos helyen alkalmazható, például a környezetvédelmi technológiákban, a különféle vegyipari technológiákban és az analitikai kémiában. Ennek megfelelően a MIP-ek iránt komoly érdeklődés mutatkozik.

MIP-eket már számos templátra sikerrel készítettek. A módszer tehát elég univerzálisnak látszik. A képződő polimerek stabilak, hőre és kémiai behatásokra alig érzékenyek. Mindezek alapján úgy tűnhet, hogy a gazda-vendég típusú reakciókhoz a hagyományos szerves kémiai szintéziseknél jóval egyszerűbben lehet előállítani szelektív gazda-vegyületeket, amik már rögtön egy szilárd hordozóhoz is hozzá vannak kötve és így könnyen használhatók.

Munkám kezdetekor valóban ez volt a MIP-ekkel foglalkozó kutatók körében az általános felfogás és úgy tűnt, hogy már csak néhány technikai probléma vár megoldásra. Ezek közé tartozott, hogy a MIP-ek egyik alkalmazásánál, a nagyhatékonyságú kromatográfiában állófázisként történő felhasználásnál, a kromatográfiás csúcsok alakja elnyúló („tailing”-es). A szakemberek döntő többsége úgy gondolta, hogy a probléma oka az, hogy a MIP állófázisok szabálytalan alakú és túl nagy (25-35 mikronos) szemcsékből állnak, mivel a tömbpolimerizáció utáni őrléssel és szitálással állítják elő őket. Ezért olyan előállítási módszerekkel kísérleteztek, amelyekkel például 5 vagy 10 mikron körüli szemcsenagyságú, homogén méreteloszlású és gömb alakú MIP szemcsék nyerhetők. Én is megpróbáltam egy ilyen, az irodalomban már leírt eljárást, és sikerült is az említett tulajdonságokkal bíró MIP-et előállítanom. A kromatográfiás vizsgálat során azonban nem tapasztaltam jelentős javulást: a csúcsok ugyan valamivel keskenyebbek lettek, de továbbra is jelentős volt az aszimmetrikus kiszélesedés.

Ebben az időszakban jelentek meg Shimizu és munkatársainak közleményei [74-76], melyekben azt az állítást próbálták bizonyítani, hogy a nem kovalens komplexképződést

használó MIP-eken - a korábbi elképzelésekkel ellentétben - nem csak egy vagy kétféle kötőhely jön létre az előállítás során, hanem gyakorlatilag folytonos és széles eloszlásban található különböző erősségű kötőhelyek. Ezeket a munkákat véve alapul, elterjedt az a nézet, hogy a kromatográfiás viselkedés magyarázata ez a széles eloszlás a kötőhelyek erősségében.

A szakirodalomban egyedülként Guiochon és munkatársai a MIP-ek kromatográfiás viselkedését azzal magyarázták, hogy a templát adszorpciós izotermája a MIP-en nem lineáris. Egy konkrét MIP esetében meg is mérték az izotermát és ebből számítógépes szimulációval kiszámították a várt kromatográfiás csúcsalakokat, amik különféle injektált mintamennyiségeknél is jól egyeztek a mérésekkel [77-81]. Érdekes módon ezt a magyarázatot a többi kutatócsoport nem vette át, még az a kutató sem, aki a MIP témát elvitte Guiochon professzor laboratóriumába és az említett cikk egyik társszerzője volt.

Számomra Guiochon professzorék munkája meggyőzőbbnek tűnt, és ezért összevetettem eredményeiket a saját kromatográfiás méréseimmel. A számítógépes szimulációt azonban két okból nem tudtam illetve nem láttam célszerűnek elvégezni. Egyrészt a Guiochon professzorék által használt - bonyolult matematikai levezetések alapján - program nem volt publikus. Másrészt a program csak rendkívül pontos és hosszadalmas izotermamérések adataival és csak bizonyos izotermaegyenletek illesztése révén ad eredményt. Márpedig Shimizu és munkatársainak fentebb már említett vizsgálatai alapján kétes volt, hogy ezek az izotermaegyenletek alkalmazhatók-e a MIP-ekre. Ezért más eljáráshoz folyamodtam: a nemlineáris kromatográfiás modellből adódó egyes részkövetkeztetések helyességét ellenőriztem, úgy hogy ehhez ne legyen szükség az izoterma ismeretére. Vizsgálataim alapján az a kép bontakozott ki, hogy a nemlineáris izoterma szerepe a MIP-ek alkalmazásaiban általánosabb jelentőségű és érdemes a MIP-ek különféle alkalmazásai szempontjából is megnézni a nemlinearitás következményeit. A fentebb mondottak alapján különösen érdekelt, hogy az izoterma matematikai, modell-elképzeléseken alapuló egyenletének ismerete nélkül milyen általános megállapításokat lehet tenni.

Eddig csak a templát megkötésével kapcsolatos problémákat említettem. Mivel azonban a MIP-ek fő jellemzője a szelektivitás, nyilván foglalkozni kell az adszorpció szelektivitásával és avval, hogy ez hogyan befolyásolja az egyes alkalmazásokat.

Meglepő módon ezen a területen elemi kérdések is tisztázatlanok, sőt fel se nagyon vetődtek eddig. Természetesen az újonnan előállított MIP-ek szelektivitását valamilyen módon ellenőrizni szokták. Ez többnyire kromatográfiás módszerrel történik, a MIP-et használva állófázisként. Az oszlopra különböző anyagokat injektálnak és a csúcsmaximum pozíciójából számolt retenciós időket hasonlítják össze. Amint már rámutattunk ez a módszer kvantitatív jellemzés céljára nem alkalmas. Arra azonban jó, hogy a kromatográfiás szelektivitás tényét igazolja: ha a templát csúcsa később jelenik meg, mint egy másik anyagé, akkor a MIP a templátot jobban köti. Sok MIP-ről sikerült evvel a módszerrel kimutatni, hogy a templátot jobban köti, mint különféle, kémiailag a templáthoz hasonló molekulákat (akár a templát enantiomerjét is). Azt viszont nem szokták nézni, hogy a templáttól nagyon különböző anyagokkal mi a helyzet. Márpedig a MIP-ek egyik alkalmazásánál, az optikai szenzorokban való használat esetén szokásos módszer az, hogy a színtelen illetve nem fluoreszcens templát egy színes illetve fluoreszcens molekulával versenyzik a MIP-en lévő kötőhelyekért. Ez utóbbi molekula gyakran egész más szerkezetű, mint a MIP, úgy is szokták nevezni, hogy „non-related probe molecule” [82-84]. Ha viszont egy ilyen molekula is versenyezni tud a kötőhelyekért, akkor mit jelent a MIP szelektivitása? Ez az ellentmondás látszólag nem hatott eddig zavaróan, mint ahogy az sem, hogy miért nem befolyásolja a templát kromatográfiás retencióját, ha egy hasonló, de valamivel kevésbé visszatartott anyaggal együtt injektáljuk a kromatográfiás rendszerbe. Ilyenkor ugyanis versengést várnánk a két anyag közt a kötőhelyekért, aminek befolyásolni kellene a két anyag csúcsának helyét és alakját. Értekezésemben erre a kérdésre is sikerült magyarázatot találni, ami ismét szorosan összefügg az izotermák nemlinearitásával.

3. Módszerek

A kísérleteim során az alábbi anyagokat használtam:

2. Táblázat Felhasznált anyagok

Név	Gyártó	Minőség
fenitoin	Aldrich	99+%
MAAM (metakrilamid)	Aldrich	0,98
AIBN	Fluka	>98,0%
EDMA (etilén-glikol-dimetakrilát)	Fluka	>97%
AcN (acetonitril)	Merck	HPLC minőségű
THF (tetrahidrofurán)	Molar Chemicals	Techn. THF absz., frissen deszt.
MeOH (metanol)	Merck	HPLC minőségű
ecetsav	Fluka	>99,8%
HF (hidrogén-fluorid)	Reanal	analitikai minőségű, 40%-os
szilikagél	Grom	C4, 50 µm szemcseátmérő 200 Å pórusátmérő
szilikagél	Kromasil	C4, 13 µm szemcseátmérő 200 Å pórusátmérő
Víz	Milli-Q RG	ultratiszta
NaH ₂ PO ₄	Fluka	>99%
molekulaszita	Fluka	3 Å pórusátmérő
N ₂ gáz	Linde	4.6
aceton	Carlo Erba	99,8%
Hidroxi-fenitoin	Aldrich	99+%
Ketoprofen	OGYI-ból ajándék	Gyógyszerkönyvi minőségű

3.1. Polimerek előállítása

Doktori munkám egyik fő célja a tömbpolimerizációval előállított polimer kromatográfiai tulajdonságainak összehasonlítása volt a szabályos gömb alakú polimerszemcsék tulajdonságaival. Ehhez szükséges volt azonos templátmolekulával imprintelt tömb illetve kompozit molekuláris lenyomatú polimer készítése.

A sok lehetséges templát közül választásom a fenitoinra esett. Egyrészt a fenitoin kismolekulájú merev térszerkezettel rendelkezik, másrészt csoportunkban széleskörű kutatás folyt a fenitoinra imprintelt polimerekkel.

3.1.1. Tömbpolimer előállítása

A MIP-ek előállításának leggyakrabban használt módja a tömbpolimerizáció, ahol a polimerizációs elegyet egy üvegedényben tömbként („bulk”) polimerizáltatják. Az így nyert tömbből elporítva, szitálva nyerhetők adott mérettartományba eső szemcsék.

A polimer előállításához a templát molekulával nemkovalens kölcsönhatásba lépni képes csoportot tartalmazó funkcionális monomeren kívül szükséges keresztkötő, iniciátor és porogén. A keresztkötő biztosítja a polimer térhálós szerkezetét, az iniciátor indítja be a gyökös polimerizációt, a porogén pedig a polimer porózusságáért felelős.

Fenitoinra imprintelt molekuláris lenyomatot tartalmazó tömbpolimert az alábbi öszetétel szerint készítettem: 340,4 mg (4mmol) metakrilamid (funkcionális monomer), 3,8 ml (20 mmol) etilén-glikol-dimetakrilát (keresztkötő), 252,3 mg (1mmol) fenitoin (templát), 50 mg AIBN (iniciátor), 1,44 ml tetrahidrofurán (porogén), 4,16 ml acetonitril (porogén). [1] A metakrilamid a fenitoin hidantoingyűrűjével lép amid-amid típusú nemkovalens kölcsönhatásba, ilyen módon biztosítva a specifikus kötőhelyeket. A polimerizációs elegybe az egyéként szokásos acetonitril mellé a tetrahidrofurán azért szükséges, hogy a fenitoin a szükséges mennyiségben feloldódjon.

A komponenseket csavaros kupakkal zárható 18 ml-es üvegedényben mértem össze. Ezután a polimerizációs elegyet oxigénmentesíteni kell. Ezt én nitrogén átbuborékolásával oldottam meg. Végül a polimerizációt 60 °C-on 24 órán át vízfürdőben termosztálva végeztem. A kész tömbpolimert az üvegedény széttörésével nyertem ki. A tömbpolimert dörzsmozsárban elporítottam, és 25µm és 36µm közötti szitafrakciót gyűjtöttem, fém (Linker) szita segítségével.

3.1.2. Szilikagél-MIP kompozit előállítása

Célszerű a kompozithoz hidrofób, alkil-módosított szilikagélt használni, mert azt a polimerizációs elegy jobban nedvesíti, és a tervezett alkalmazásnál (fenitoin megkötése acetonnitrilből) inert hordozó.

Fenitoinra imprintelt szilikagél-MIP kompozitot az alábbi módon készítettem: Kromasil C4-es, módosított szilikagél (szemcseméret: 13 μ m, pórusátmérő: 200 Å) pórusait feltöltöttem a fenitoinra imprintelt tömbpolimer előállításánál leírt recept szerinti polimerizációs eleggyel. A felhasználandó polimerizációs elegy mennyiségét a szilikagél pórustérfogata határozza meg. A szilikagélre kevesebb (kb. 80 %) polimerizációs elegyet kell rámérni, mint a pórustérfogata, hogy az összeset felszívja, mert ha maradna az elegyből a szemcsék között is, akkor az összeragasztaná azokat. Az általam használt módosított szilikagél pórustérfogata 800 cm³/g volt, ezért 1 g-ra 650 μ l előzőleg oxigénmentesített polimerizációs elegyet mértem. Ezután ultrahangos fürdőbe tettem 2 percre, hogy a polimerizációs elegy pórusokban felszívódását elősegítsem. Így a szilikagél a teljes rátett polimerizációs elegyet felszívta. Ezután a szokásos módon 60 °C-on 24 órán át vízfürdőben termosztálva végeztem a polimerizációt.

A szilikagél váz hidrogén-fluoriddal kioldható a kompozitból, így az eredeti szilikagél váz szemcseméretével megegyező polimerszemcsék nyerhetők.

A mintából bemértem 0,3646 g-ot egy saválló teflonbombába, majd 730 μ l acetont adtam hozzá. A szuszpenziót hűtöttem jeges vízben, majd rémértem 1,5 ml HF-ot (a HF erősen maró hatású anyag, ezért megfelelő védőfelszerelést kell használni alkalmazása során). Ezután éjszakára rázógépre raktam.

A HF hígítása végett a felülúszó HF-os oldatot „lepipettáztam” (gumilabdát egy műanyag cső segítségével összekötöttem egy műanyag pipettaheggyel, és ezt az eszközt használtam), majd vízzel feltöltöttem a teflonbombát. Ezt háromszor ismételttem meg. A már híg HF-os oldatból a polimert szűrővel nyertem ki. A szűrést egy üres SPE oszlopon végeztem úgy, hogy az alsó szűrőt az oszlopban hagytam, és arra raktam egy 0,6 μ m-es szűrőt (Millipore TYPE BD).

A szűrés befejezése után az üres SPE oszlopban végeztem a mosást is. Először 10 ml vízzel, majd 35 ml 20 %-os acetonos vízzel, újra 50 ml vízzel, majd végül, hogy gyorsabban megszáradjon a polimer, 5 ml metanollal.

Nagyobb szemcseátmérőjű (50 µm), de szintén C4-es módosított szilikagéllal (Grom) is állítottam elő kompozit anyagot. Mivel ennek a szilikagéllal nagyobb a fajlagos pórustérfogata, felmerült a kérdés, hogy a polimerizációs elegy mennyiségét úgy válasszam-e, hogy a pórusok kitöltöttsége legyen azonos a másik szilikagéllal készült kompozittal vagy úgy, hogy a szilikagél-polimerizációs elegy tömegaránya legyen azonos. Én ez utóbbit választottam a könnyebb összehasonlíthatóság miatt. Tehát 650 µl polimerizációs elegyet mértem rá az 1g szilikagélre.

3.1.3. Polimerek mosása

A mosási művelet célja a mintamolekula (templát) és az egyéb maradék szennyező anyagok eltávolítása a kész polimerből. Különböző módszerekkel végeztem a polimerek mosását: az elporított tömbpolimert Soxhlet extrakcióval, a szilikagél-polimer kompozitot ú.n. batch mosással vagy kromatográfiás oszlopba töltve tisztítottam.

Soxhlet extrakció:

A molekuláris lenyomatú polimerek leghatékonyabb mosási eljárása a Soxhlet extrakció. Egyrészt a mosás magas hőmérsékleten folyik, másrészt a polimert mindig friss, tiszta oldószer tisztítja. A MIP-ek mosásához leggyakrabban ecetsavas metanolt használnak oldószerként. A Soxhlet extrakciós mosást a tömbpolimereknél alkalmaztam. A tömböt összetörtem dörzsmozsárban, extrakciós hüvelybe helyeztem, és 24 órán át extraháltam 1% ecetsavat tartalmazó metanollal.

Oszlopban mosás:

A polimerek folyadékkromatográfiás oszlopba töltve is moshatók. A mosó oldószer ily módon folyamatosan áramoltatható át a polimeren. A módszer másik előnye, hogy oszloptermosztát alkalmazásával magasabb hőmérsékleten végezhető a mosás, ami ezáltal hatékonyabb. Ez a módszer csak egyenletes méreteloszlású polimerek esetén alkalmazható, csak azok tölthetők HPLC-s oszlopba.

Az oszlopban való mosást a kompozit töltetknél alkalmaztam. Az oszlopokat ilyenkor szárazon töltöttem meg. A mosást itt is 1 % ecetsavat tartalmazó metanollal végeztem. Folyamatosan néztem az alapvonalat UV detektorral, hogy lássam, mikor tisztult ki a polimer.

3.2. Polimerek jellemzése

3.2.1. Fizikai-kémiai jellemzés

3.2.1.1. Alacsony hőmérsékletű gázadszorpciós mérések

Nitrogénadszorpciós mérésekkel meghatározható a fajlagos felület, pórustérfogat, átlagos pórusátmérő és a pórusátmérő eloszlás. A méréseknél az adszorbeált nitrogén mennyiségét mérik a relatív nyomás függvényében. Mérik az adszorpciós és a deszorpciós ágat is.

Az eredeti szilikagélen és a tömbpolimer illetve a szilikagél-MIP kompozit mintákon a méréseket Nagyné Dr. László Krisztina végezte a Fizikai Kémia tanszéken.

A méréseket a Quantasorb cég által gyártott AUTOSORB-1 (Quantachrome, Boyton Beach, Florida, USA) nevű készüléken végezték.

A készülék automata működésű és tetszőleges nem korrozív gázzal lehet mérni rajta. A gázadszorpciós méréseknél standardként használt N_2 gáz adszorpcióját mérték, 77 K-en.

3.2.1.2. Elektronmikroszkópos mérések

A polimer szemcsék alakja optikai-, illetve elektronmikroszkóppal vizsgálható.

A vizsgálatot Dr. Marthi Katalin segítségével végeztük JEOL 5500 elektronmikroszkóp és IXRF EDS 200 típusú energiadiszperzív analizátor segítségével. A gyorsítófeszültség 20 kV, a munkatávolság ~20mm, SEI (secondary electron image) detektor. A mintákat a mérés előtt Au/Pd réteggel vontuk be.

Az elemanalízist (elektronsugaras mikroanalízis) energiadiszperzív analizátorral végeztük. Az adatgyűjtés 100 sec volt 800-1500 beütés/sec mellett. A röntgenjel ~1 μ m mélységű zónából jött.

3.2.2. Kémiai vizsgálatok

A molekuláris lenyomatú polimerek kémiai vizsgálata általában a templát és más anyagok adszorpciójának vizsgálatát jelenti. Erre többféle módszer létezik pl.: batch-adszorpciós illetve kromatográfiás módszerek.

3.2.2.1. Egyensúlyi („batch”) adszorpció mérés

A batch adszorpció mérése az adszorpciós izoterma meghatározására alkalmas módszer. A batch adszorpciós méréseknél 50 mg száraz szorbensre mértem 300 µl templátoldatot eppendorf csövekben. 24 órán át szobahőmérsékleten hagytam, végül a felülúszó templátkoncentrációját HPLC-s módszerrel [55% acetonitril és 45% foszfát puffer (0,01 M, pH=4,8) eluenssel, Purospher RP-18 e.c. (5 µm, 3x125 mm, Merck) oszlopon, UV detektálással] mértem.

3.2.2.2. Kromatográfiás mérések

A kromatográfiás méréseket Perkin Elmer Series 200 HPLC rendszerrel (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, USA)(pumpa, mintaadagoló, oszloptermosztát, UV/VIS detektor) végeztem. A konkrét paramétereket az eredmények részben adom meg.

3.2.2.2.1 Polimerek oszlopba töltése

Szárazon töltés

A HPLC-s oszlopokat a MIP-ekkel szárazon az alábbi módon töltöttem meg: kis mennyiségű polimert spatulával belemértem az oszlopba, majd ütögetéssel tömörítettem. Ezt a műveletet addig ismételttem, amíg meg nem telt az oszlop. Ezután 0,1 ml/perc áramlási sebességgel kezdtem el mosni az oszlopot majd fokozatosan növeltem az áramlási sebességet (1 ml/perc-re kb. 5 perc alatt). Ezután szétszedtem az oszlopot, és ha lyuk volt az elején, töltöttem még bele polimert. Ezzel a módszerrel készítettem tömb MIP, kompozit MIP oszlopokat

Nedvesen töltés

A polimerek nedves töltését Pécsen, Prof. Ohmacht Róbert végezte. Metanol/víz 1:1 arányú elegyből 400 bar nyomáson töltötte meg az oszlopokat.

Ezzel a módszerrel készült oszlop a kiindulási szilikagélből, kompozit MIP-ből.

3.2.3. Számítógépes szimuláció

A nemlineáris kromatográfiás elválasztások számítógépes szimulálására többen dolgoztak ki módszereket. Ezek a parciális differenciálegyenlet-rendszerek numerikus megoldásain alapulnak. Munkámhoz először a Guiochon kutatócsoportjában kidolgozott Rouchon algoritmuson alapuló szoftvert használtam. Az elválasztandó anyagok közti kompetíció vizsgálatára ez a szoftver nem volt alkalmas, ezért helyette a Kaczmarski által kidolgozott szoftvert (Chromatographic column v. 2.0) használtam.

4. Kísérleti eredmények

Ez a fejezet a kísérleti eredményeket azok értelmezése nélkül mutatja be. Az eredmények diszkussziójára a „Megbeszélés” című fejezetben kerül sor. A kísérleti eredmények bemutatása abban a sorrendben történik, ahogy a Megbeszélés fejezetben az eredményeket értelmezni fogom.

4.1. Egyensúlyi („batch”) adszorpciós mérések

A batch módszerrel kapott eredmények a 3. Táblázatban találhatóak. Megadtam a kiindulási koncentrációt (c_0), az egyensúlyi koncentrációt (c), az egységnyi tömegű szorbens által megkötött fenitoin mennyiségét (q), a megoszlási hányadost (D) valamint egy korrigált megoszlási hányadost (D_{kor}), ami a kompozit tényleges polimertartalmára vonatkozik.

3. Táblázat Batch adszorpciós eredmények

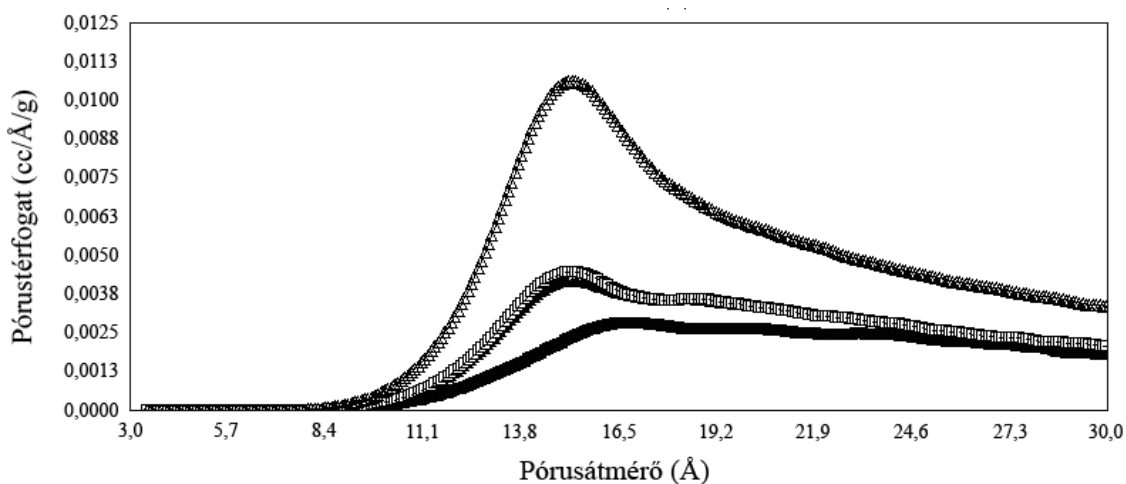
	$C_0 = 0,01 \text{ mM}$				$C_0 = 0,025 \text{ mM}$			
	c mM	q nmol	D ml/g	D_{kor}	c mM	q nmol	D ml/g	D_{kor}
Kompozit NIP	0,0083	0,52	1,3	4,2	0,0209	1,22	1,2	3,9
Tömbpolimer NIP	0,0053	1,40	5,3		0,0137	3,40	5,0	
Kompozit MIP	0,0060	1,21	4,0	13,4	0,0162	2,63	3,2	10,8
HF-os kioldással nyert MIP szemcse	0,0026	2,2123	16,9		0,0102	4,44	8,7	
Tömbpolimer MIP	0,0028	2,1707	15,7		0,0083	5,02	12,1	

4.2. Alacsony hőmérsékletű gázadszorpció mérések

A fajlagos felületet (S_{BET}) a kiértékelő szoftver a BET modellel számolta, a pórus méret analízist a Quantachrome szoftver a Saito-Foley (SF) és a Barrett, Joyner és Halenda (BJH) módszerrel végezte. A teljes pórustérfogat meghatározása közel egységnyi relatív nyomás értéknél történt. Az átlagos pórusátmérőt a teljes pórustérfogathoz és a BET felülethez kaptuk, hengeres pórusgeometriát feltételezve ($d_{\text{pórus}} = 4 V_{\text{teljes}} / S_{\text{BET}}$)

4. Táblázat Az adszorpció izotermából számolt paraméterek

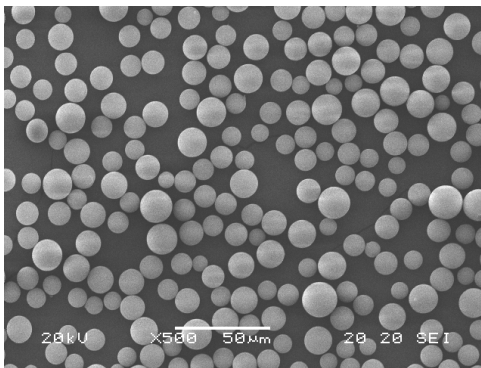
Minta	S_{BET} (m ² /g)	V_{teljes} (cm ³ /g)	$d_{\text{pórus}}$ (Å)
Tömb MIP	540	1,0	76
Eredeti szilikagél	168	0,8	194
Kompozit MIP	247	0,4	66
Kompozit NIP	244	0,4	67



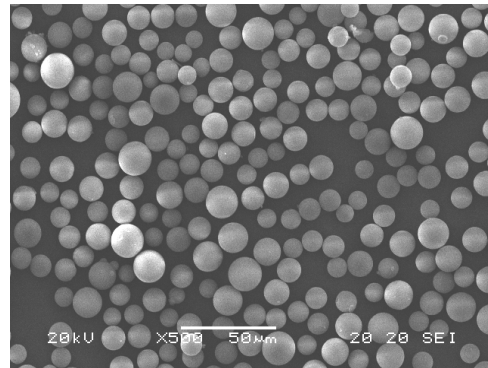
11. Differenciális pórus méret eloszlás mikropórusos tartományban az SF módszerrel számolva. ■: kiindulási Kromasil szilikagél, □: kompozit NIP, ▲: kompozit-MIP, △: tömb MIP

4.3. Elektronmikroszkópos mérések

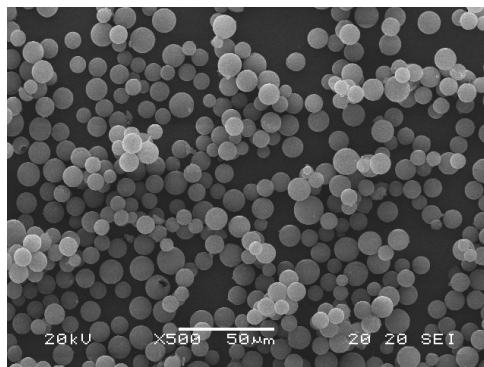
Az eredeti szilikagélről készített elektronmikroszkópos felvételen (12. ábra) látható, hogy nem teljesen egyenletes méretű, vannak kisebb és nagyobb szemcsék is. Viszont a szabályos gömbalak megfigyelhető. Ugyanez figyelhető meg a szilikagél-MIP kompozit (13. ábra), illetve HF-os kioldás után nyert anyag (14. ábra) mintáin is.



12. ábra Eredeti hidrofób szilikagél

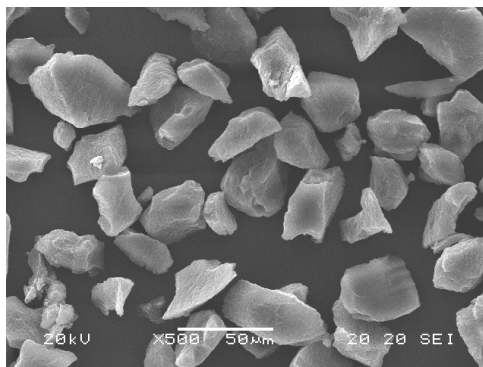


13. ábra kompozit MIP



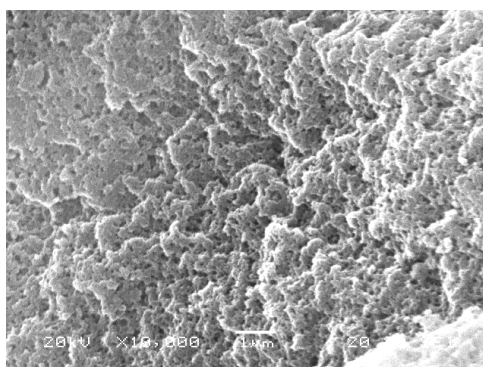
14. ábra HF-os kioldással nyert MIP szemcse

A tömbpolimerről készült felvételen látható, hogy egyenetlen alakú, de viszonylag egyenletes méretű polimert lehet nyerni a szitálással (15. ábra).



15. ábra Szitált tömbpolimer

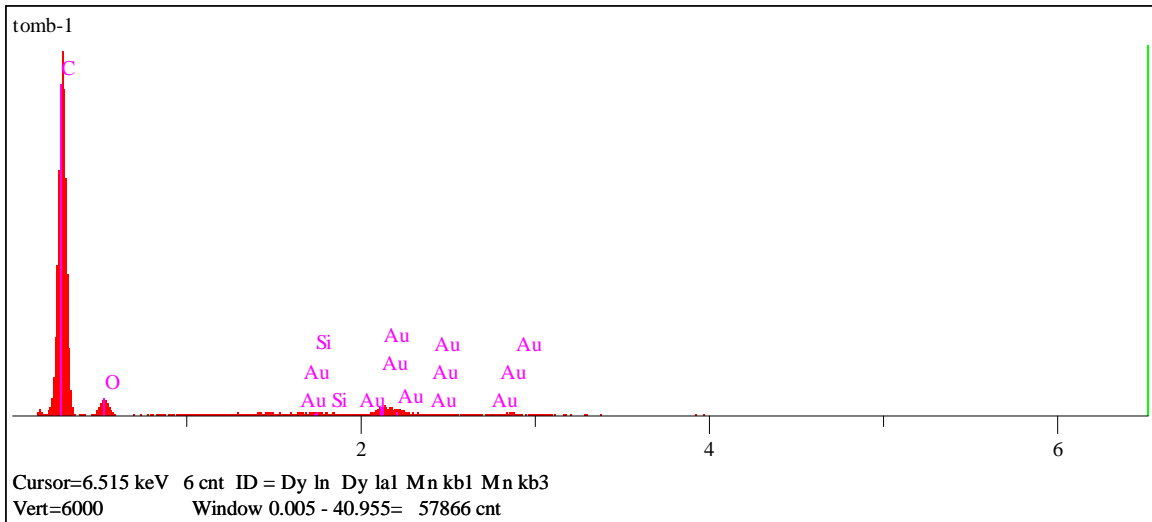
A tömbpolimerről készített 10000x-es nagyítású kép jól mutatja, hogy mennyire pórusos a polimer (16. ábra).



16. ábra Tömbpolimer 10000x-es nagyítás

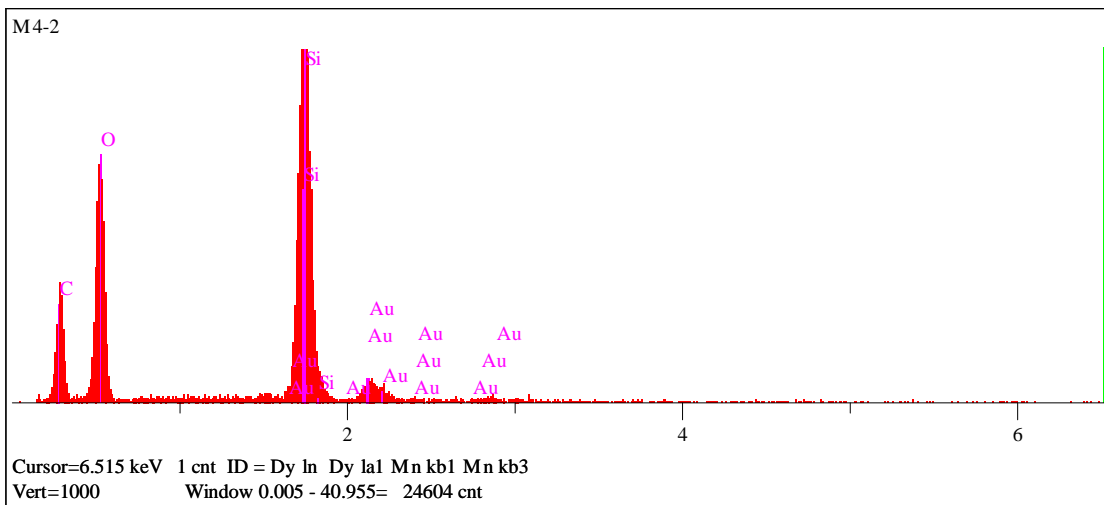
Elektronsugaras mikroanalízissel további információkat kaptunk az általam készített anyagokról:

A tömbpolimer szenet, illetve oxigént tartalmaz (az arany a bevonat miatt jelenik meg) (17. ábra).



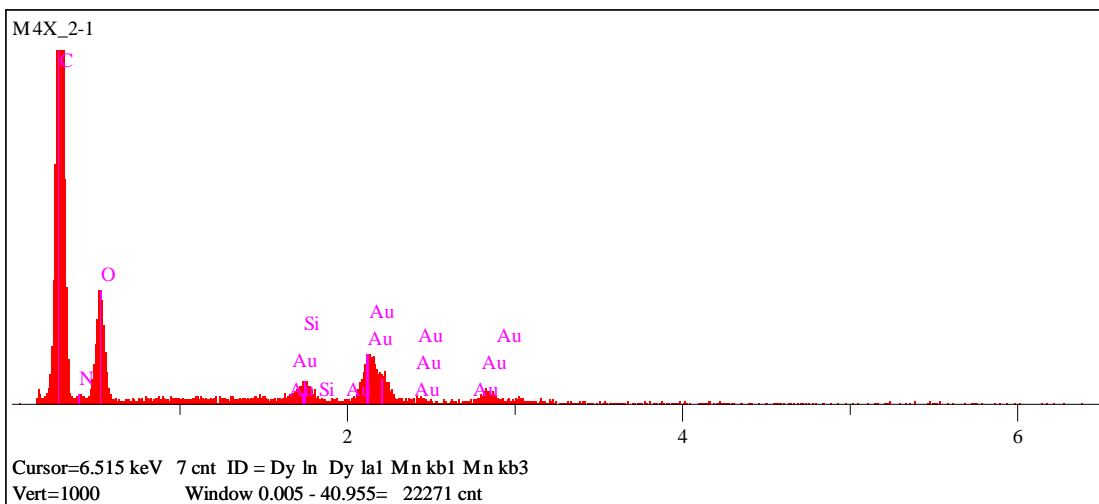
17. ábra Tömbpolimer elektronsugaras mikroanalízis spektruma

A módosított szilikagél-polimer kompozit elsősorban szilíciumot valamint szintén szenet és oxigént tartalmaz a felületén (18. ábra).



18. ábra Szilikagél-MIP kompozit elektronsugaras mikroanalízis spektruma

A HF-os kioldással nyert polimerszemcse szenet és oxigént valamint nagyon kis mennyiségű szilíciumot tartalmaz (19. ábra).

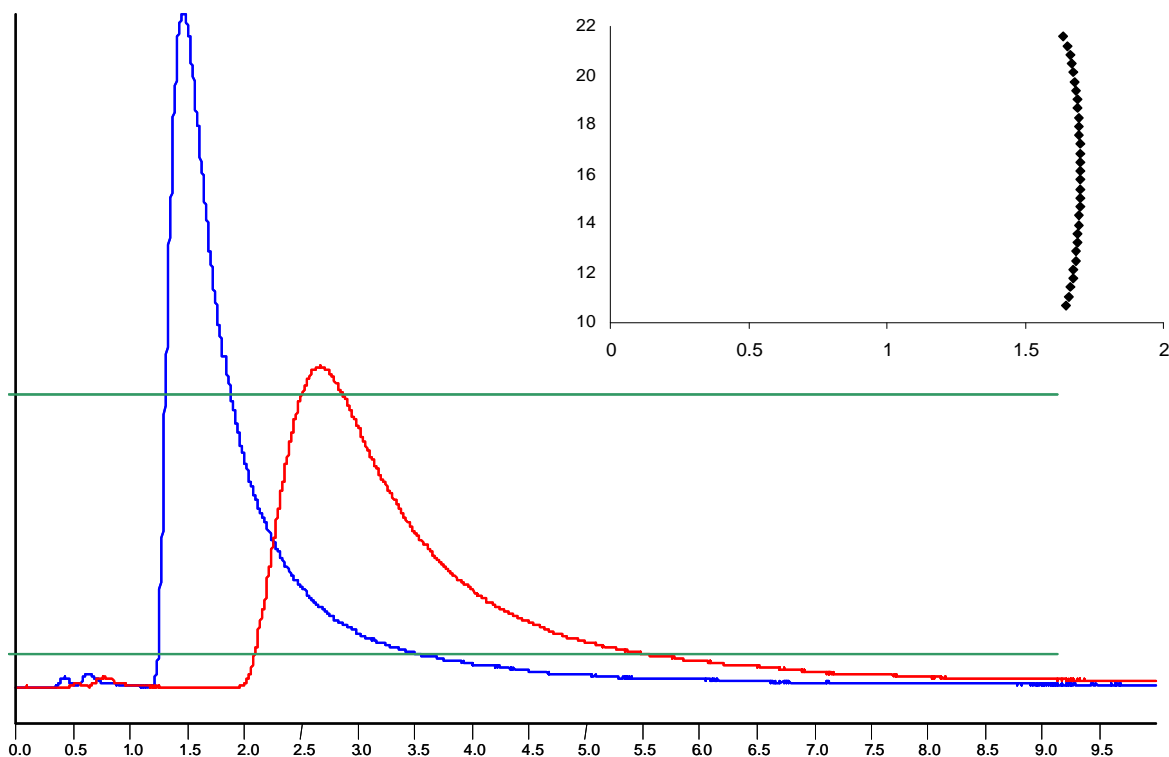


19. ábra HF-os kioldással nyert MIP szemcse elektronsugaras mikroanalízis spektruma

4.4. Kromatográfiás mérések

Kromatográfiás vizsgálataimat fenitoinra imprintelt tömb illetve kompozit oszlopokkal, a kiindulási módosított szilikagélből készített oszloppal, illetve egy gyári (Asahipak) oszloppal végeztem. A tömb illetve kompozit töltet összehasonlításához, illetve az oszlophosszfüggés vizsgálatához kézzel, szárazon töltött oszlopokat használtam, az összes többi méréshez pedig géppel, nedvesen töltött oszlopokat.

Elsőként magát a tömb illetve kompozit töltetet hasonlítottam össze (20. ábra)



20. ábra Tömb illetve szilikagél-MIP kompozit töltettel készített oszlopok összehasonlítása.

A kis ábrán a nagy ábrán lévő kromatogramok leszálló ágain a két zöld vonal közötti részen a redukált retenciós idők hányadosa látható

Oszlop: 50x3mm fenitoin imprintelt szilikagél-MIP kompozittal töltött oszlop (kék) illetve 50x3mm fenitoin imprintelt tömbpolimerrel töltött oszlop (piros)

Oszloptermosztát: 32,4 °C

F=0,5 ml/min,

Eluens: acetonitril

$V_{inj}=10 \mu l$

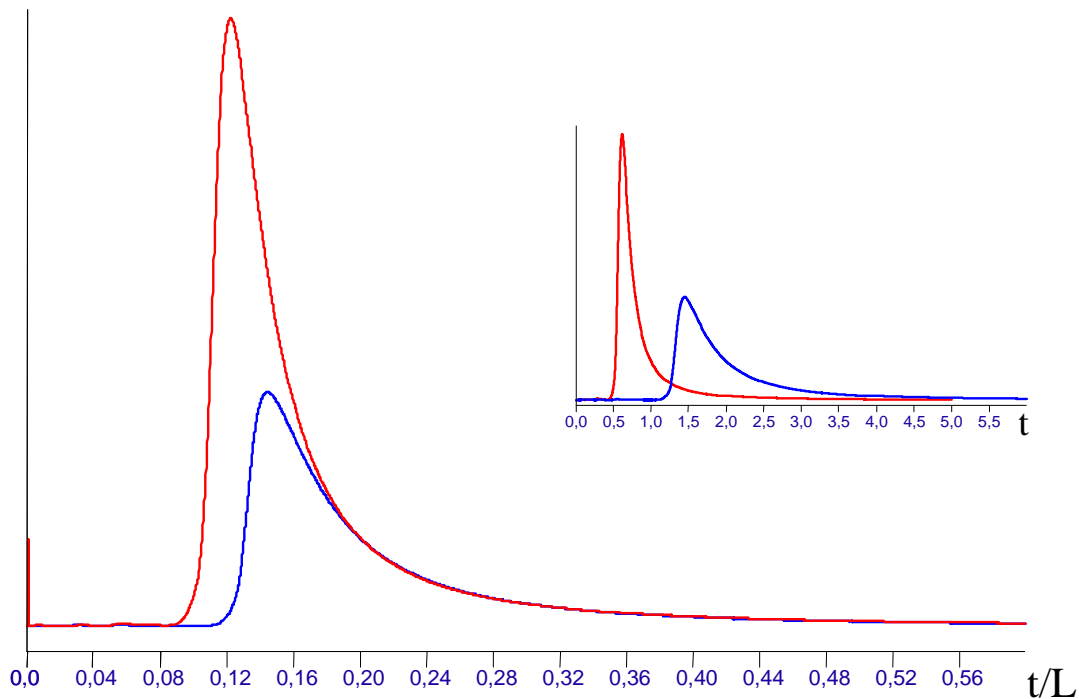
$c_{inj} = 1 \text{ mM}$ fenitoin mindkét esetben

$\lambda=220 \text{ nm}$

A 20. ábrából az látszik, hogy a kompozit tölteten keskenyebb, kevésbé elnyúló csúcsot kaphatunk, de kisebb retenciós időnél. Valamint, hogy a két leszálló ágon a redukált retenciós idők hányadosa konstans.

Az ezt követő kísérletek célja a MIP-ekkel töltött kromatográfiai oszlopok viselkedésének tanulmányozása, jellemzése.

Oszlophosszfűgés



21. ábra Fenitoin kromatogramja különböző hosszúságú, fenitoin MIP-kompozittal töltött oszlopokon. A kis ábrán az eredeti kromatogramok láthatók, a nagy ábrán az x tengelyen

$$\frac{t}{L} \text{ van ábrázolva}$$

Oszlop: 50x3mm (piros) illetve 100x3mm (kék) fenitoin imprintelt szilikagél-MIP kompozittal töltött oszlop

Oszloptermosztát: 32,4 °C

F=1 ml/min,

Eluens: acetonitril

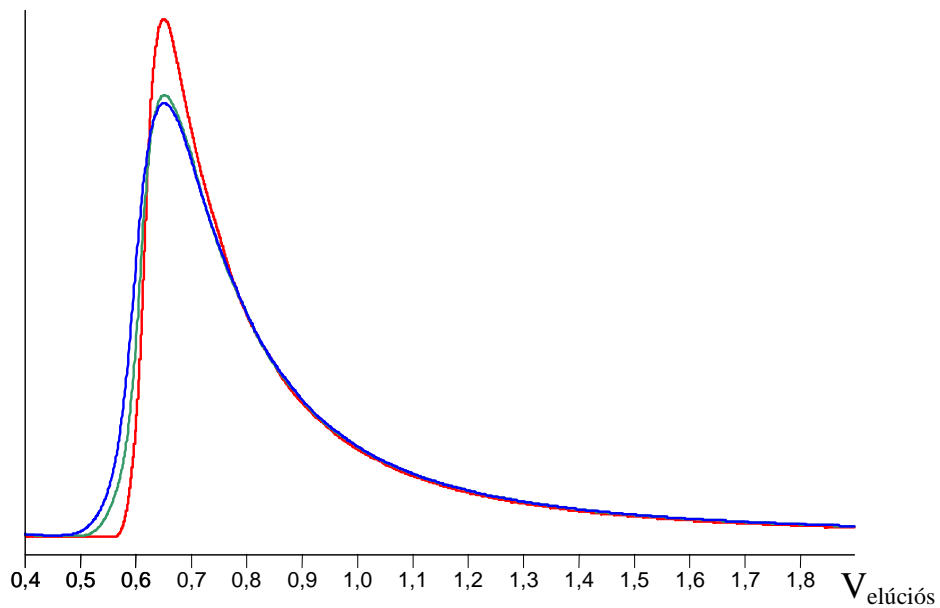
$V_{inj}=10 \mu\text{l}$

$c_{inj} = 1 \text{ mM}$ fenitoin mindkét esetben

$\lambda=220 \text{ nm}$

A 21. ábrán megfigyelhető a két csúcs leszálló ágának együttfutása.

Térfogatáram-függés



22. ábra Fenitoin csúcsok 0,05; 0,5 és 1 ml/min áramlási sebességnél. A vízszintes tengelyen az elúciós térfogat található

Oszlop: 50x3mm fenitoin imprintelt szilikagél-MIP kompozittal töltött oszlop

Oszloptermosztát: 32,4 °C

F=0,05 (piros); 0,5 (zöld) illetve 1 (kék) ml/min,

Eluens: acetonitril

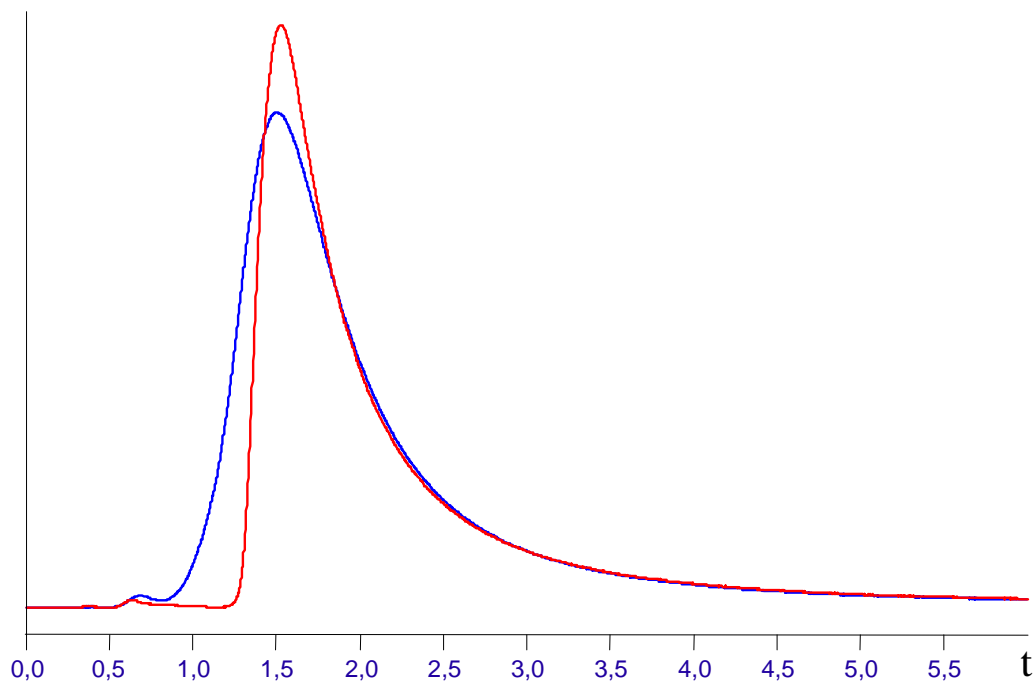
$V_{inj}=10 \mu l$

$c_{inj} = 0,5 \text{ mM}$ fenitoin mindhárom esetben

$\lambda=220 \text{ nm}$

A 22. ábrán megfigyelhető a három csúcs leszálló ágának együttfutása, illetve a felszálló ágak meredekségének változása a térfogatáram változtatásával.

Szemcsemérettől való függés



23. ábra Fenitoin kromatogramok 13µm illetve 50 µm-es szilikagél-MIP kompozit szemcsékkel töltött oszlopon.

Oszlop: 50x3mm fenitoin imprintelt szilikagél-MIP kompozittal töltött oszlop (13µm-es (piros) illetve 50 µm-es (kék) szemcsemérettel)

Oszloptermosztát: 32,4 °C

F=0,5 ml/min

Eluens: acetonitril

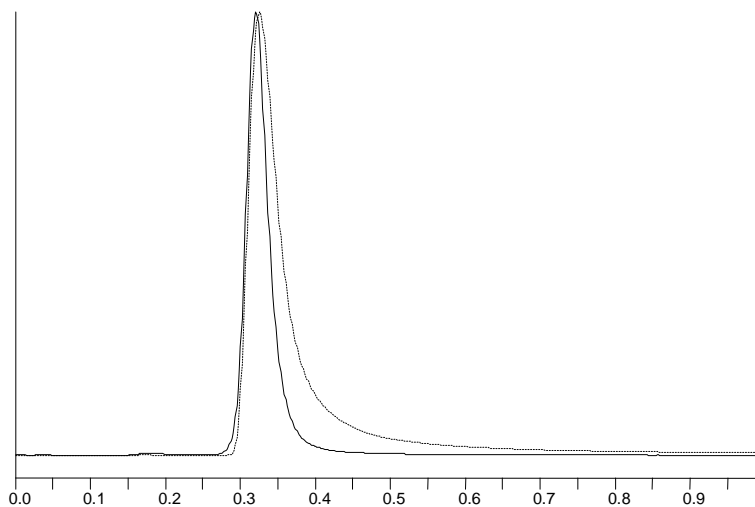
$V_{inj}=10 \mu\text{l}$

$c_{inj} = 1 \text{ mM}$ fenitoin mindkét esetben

$\lambda=220 \text{ nm}$

A 23. ábrán megfigyelhető a két csúcs leszálló ágának együttfutása, illetve a felszálló ág alakjának lényeges javulása akisebb szemcseátmérő esetén.

A kompozit alapjául használt módosított szilikagél vizsgálata



24. ábra . Ketoprofen (szaggatott vonal), illetve aceton (folytonos vonal) csúcsok a Kromasil C4 töltettel készített oszlopon. A csúcsok azonos magasságúra vannak normalizálva

Oszlop: 50x3mm Kromasil C4 töltettel töltött oszlop

Oszloptermosztát: 32,4 °C

F=1 ml/min,

Eluens: acetonitril

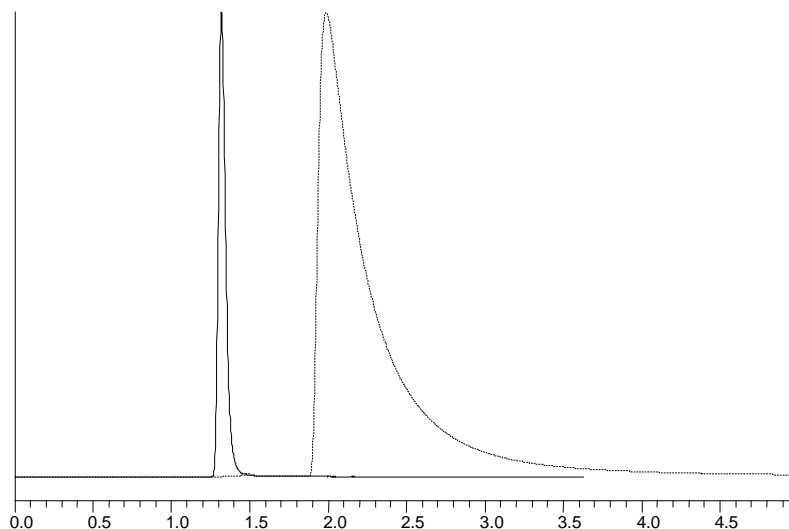
$V_{inj}=10 \mu\text{l}$

$c_{inj} = 1 \text{ mM}$ ketoprofen

$\lambda=220 \text{ nm}$

A 24. ábrán az látszik, hogy a kiindulási C4-es módosított szilikagélen a ketoprofen tiszta acetonitrilben ugyan t_0 -ban eluálódik, azonban elnyúló csúcsot ad.

Polimer alapú állófázis vizsgálata



25. ábra Ketoprofen (szaggatott vonal), illetve aceton (folytonos vonal) csúcsok egy polimer alapú fázissal töltött oszlopon

Oszlop: Asahipak ODP 50

Oszloptermosztát: 32,4 °C

F=0,8 ml/min,

Eluens: acetonitril

$V_{inj}=10 \mu l$

$c_{inj} = 1 \text{ mM ketoprofen}$

$\lambda=220 \text{ nm}$

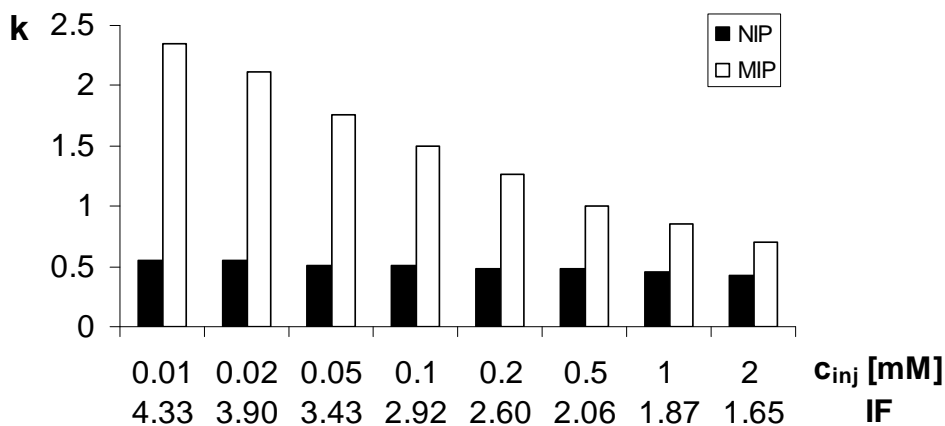
A 25. ábrán az látszik, hogy a polimer alapú fordított fázison a ketoprofen tiszta acetonitril eluenst alkalmazva megkötődik az állófázison, és elnyúló aszimmetrikus csúcsot ad.

4.5. A MIP-ek jellemzésére használt mennyiségek vizsgálata

A következő kísérletekkel illetve számítógépes szimulációkkal a MIP-ek jellemzésére használt mennyiségek függését vizsgáltam különböző kísérleti paramétereiktől, pl. a

beinjektált minta koncentrációjától és a kromatográfiás oszlop geometriai paramétereitől.

4.5.1. Retenciós tényező és Imprintelési Faktor koncentrációfüggése



26. ábra A retenciós tényező és az imprintelési faktor (IF) koncentrációfüggésének vizsgálata

A 26. ábrából egyértelműen látszik mind a retenciós tényező, mind pedig az imprintelési faktor koncentrációfüggése.

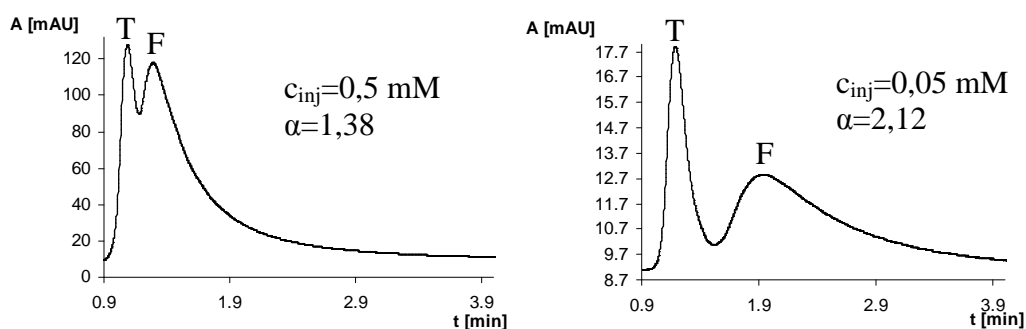
4.5.2. Szelektivitás függése az oszlop geometriai paramétereitől

5. Táblázat A kromatográfiás enantioszelektivitás (α) függése az oszlophossztól (L), és az oszlop belső átmérőjétől (d)

L (cm)	d (cm)	α	L (cm)	d (cm)	α
5	0,46	1,92	10	0,2	1,48
10	0,46	2,13	10	0,3	1,82
20	0,46	2,31	10	0,46	2,13

Az 5. táblázatban szereplő adatokat a Rouchon algoritmussal nyert kromatogramokból számoltam. A szimuláció paramétereit a 6. Táblázatban találhatók.

Megfigyelhető a szelektivitás függése egyrészt az oszlophossztól, másrészt pedig az oszlop belső átmérőjétől.



27. ábra. Fenitoin (F) és timin (T) elválasztása két különböző hígításnál

Oszlop: 50x3mm fenitoin imprintelt szilikagél-MIP kompozit

Oszloptermosztát: 32,4 °C

F=0,5 ml/min,

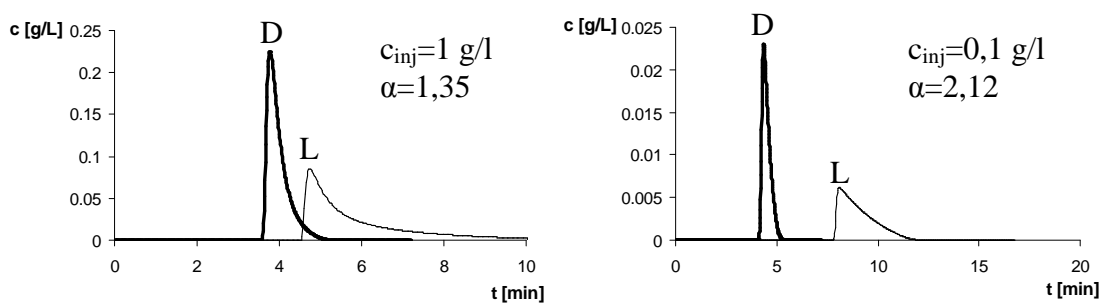
Eluens: acetonitril

$V_{inj}=10 \mu\text{l}$

$c_{inj} = 0,5 \text{ mM}$ mindkét anyagra a bal oldali ábrán, és $0,05 \text{ mM}$ a jobb oldalin

$\lambda=220 \text{ nm}$

A 27. ábra egyértelműen mutatja, az elválasztás javulását a koncentráció csökkenésével.



28. ábra számítógépes szimulációval nyert fenilalanin anilid enantiomer csúcsok két különböző hígításnál

$c_{inj} = 1 \text{ g/l}$ mindkét anyagra a bal oldali ábrán és $0,1 \text{ g/l}$ a jobb oldalin

A szimuláció paraméterei a 6. Táblázatban találhatóak.

A szimulációval nyert eredmények is α javulását mutatják a koncentráció csökkenésével.

6. Táblázat Szimulációs paraméterek (a1, a2, b1, b2 az izoterma paramétere)

	5. Táblázat	28. ábra
Oszlop belső átmérője, cm	0,46; 0,3; 0,2	0,46
Oszlop hossza, cm	20; 10; 5	10
Áramlási sebesség, ml/min	1,0	1,0
Teljes porozitás	0,631	0,631
Tányérszám	1000	1000
Injektálás ideje, s	6	6
a1	5,62	5,62
a2	10,9	10,9
b1	0,35	0,35
b2	65,3	65,3

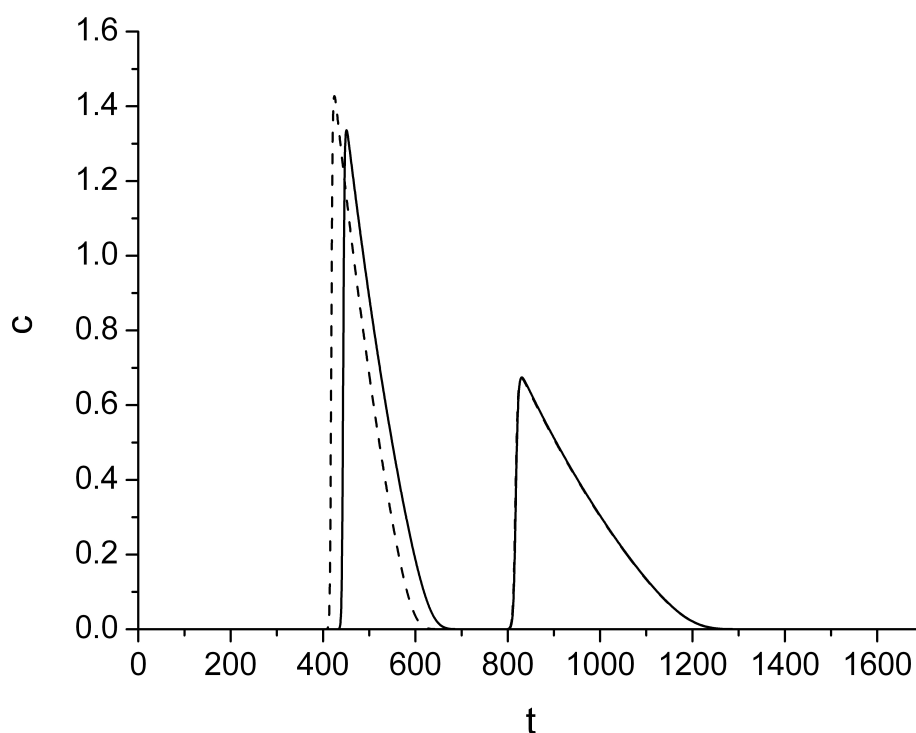
4.6. Kompetíció vizsgálata molekuláris lenyomatú polimereken

A versengést kísérleti úton illetve számítógépes szimulációkkal is vizsgáltam. A kísérletekhez a fenitoinra imprintelt kompozit MIP oszlopot használtam, és fenitoin és hidroxi-fenitoin versengését vizsgáltam. A szimulációhoz Kaczmarski professzor által fejlesztett programot használtam, a két enantiomer izotermájának adatait pedig az irodalomból vettem [77]. Vizsgáltam a különbséget két versengő anyag együtt illetve külön injektálása között, illetve a jobban visszatartott anyag konstans szintjére (platójára) való injektálás, és a tiszta eluensbe történő injektálás között.

A kompetíció szerepének vizsgálatokor készült szimulációkhoz tartozó paramétereiket tartalmazza a 7. táblázat:

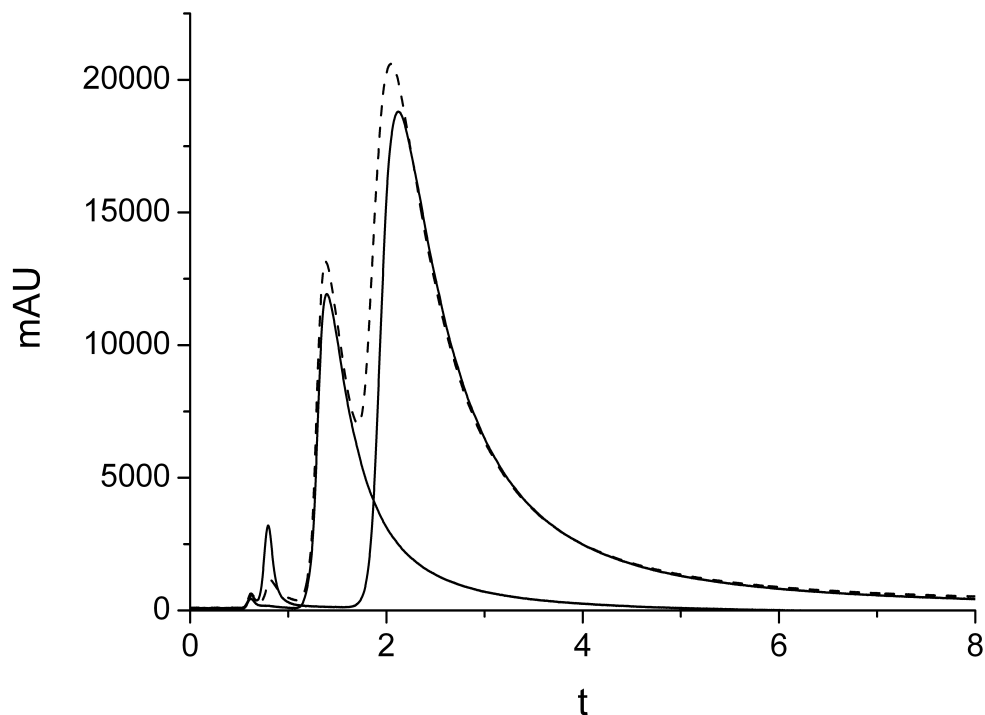
7. Táblázat Szimulációs paraméterek (a1, a2, b1, b2 az izoterma paraméterei)

	29. ábra	31. ábra	36. ábra	34. ábra
Oszlop belső átmérője, cm	0,46		0,46	0,46
Oszlop hossza, cm	10		5	2
Áramlási sebesség, ml/min	1,0		1,0	1,0
Teljes porozitás	0,631		0,631	0,631
Tányérszám	1000		1000	1000
Injektálás ideje, s	6		9	6
a1	15		15	15
a2	30		20	30
b1	0,15		0,15	0,15
b2	0,30		0,20	0,30



29. ábra Két enantiomer számítógépes szimulációval nyert kromatogramja külön (folytonos vonal) illetve együtt (szaggatott vonal) injektálva (a két vonal a második csúcsnál átfed)

A 29. ábra azt mutatja, hogy az együttes injektálás csak a hamarabb eluálódó csúcsra hat, arra is csak kis mértékben, a jobban visszatartott anyag csúcsára nincs hatással.



30. ábra Fenitoin és hidroxi-fenitoin kromatogramja külön (folytonos vonal) illetve együtt (szaggatott vonal) injektálva

Oszlop: 50x3mm fenitoin imprintelt szilikagél-MIP kompozittal töltött oszlop

Oszloptermosztát: 32,4 °C

F=0,5 ml/min

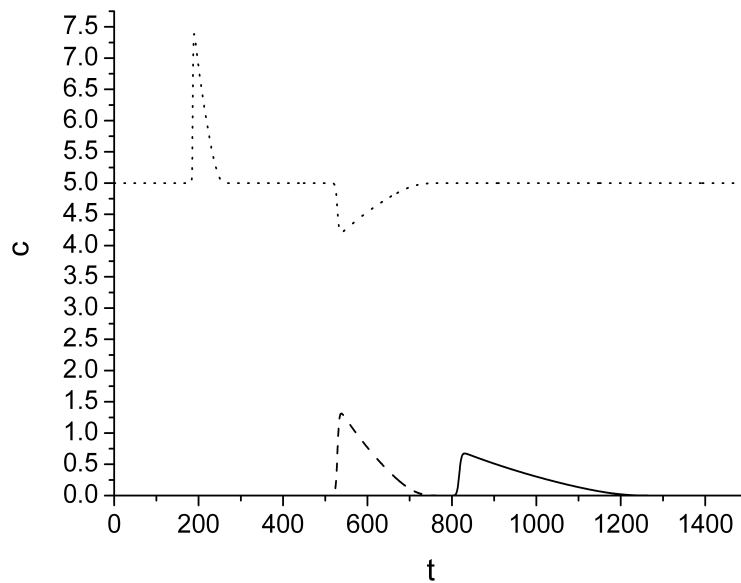
Eluens: acetonitril

$V_{inj}=10 \mu\text{l}$

$c_{inj} = 0,5 \text{ mM fenitoin és } 0,5 \text{ mM hidroxi-fenitoin együtt illetve külön}$

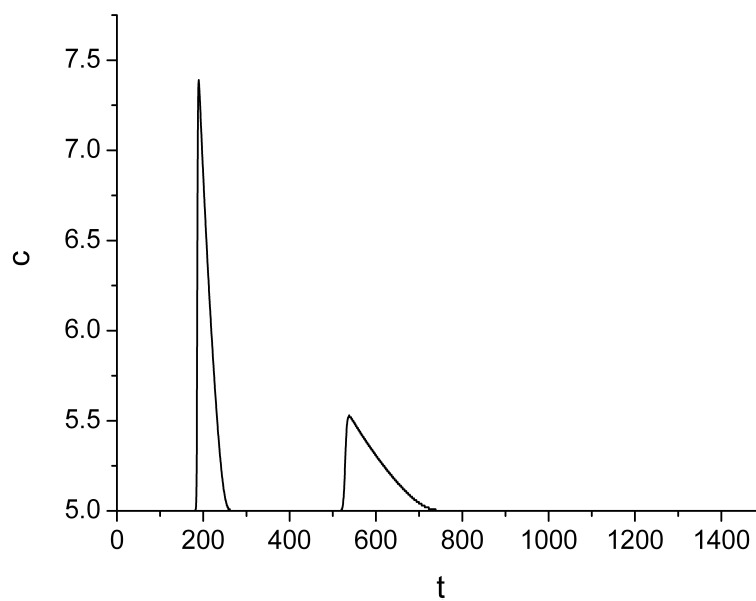
$\lambda=220 \text{ nm}$

A kísérlet hasonló eredményt adott, mint a szimuláció. Kis mértékű torzulás volt csak megfigyelhető, ha külön injektált csúcsok összegét hasonlítottam össze az együtt injektált kromatogrammal.



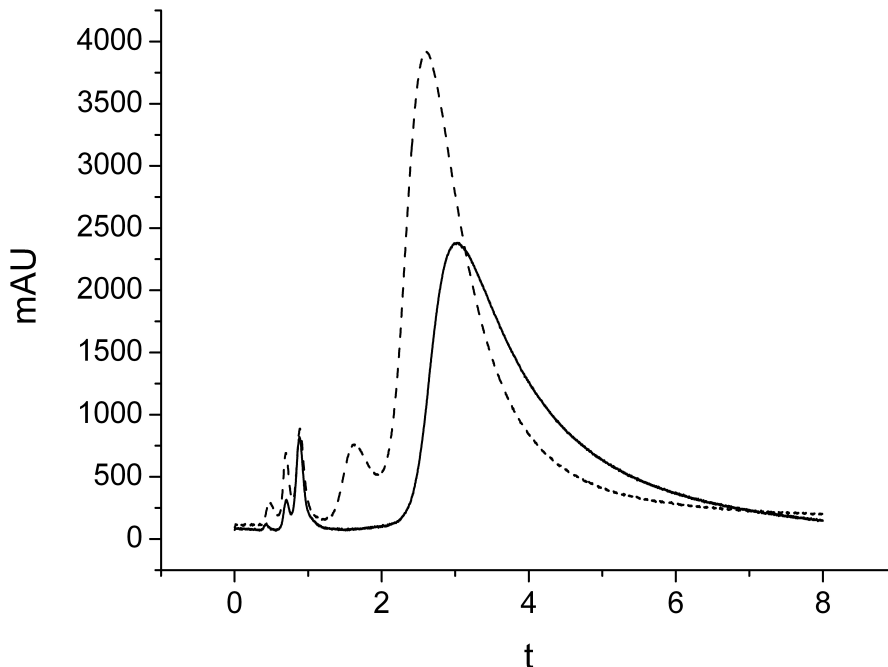
31. ábra A jobban visszatartott anyag számítógépes szimulációval nyert kromatogramja tiszta eluensbe injektálva (folytonos vonal), illetve a kevésbé visszatartott anyag oldatába injektálva (szaggatott vonal). A pontvonal a kevésbé visszatartott anyag koncentrációját mutatja.

A jobban visszatartott anyag konstans mennyisége az eluensben a kevésbé visszatartott anyag csúcsának kisebb retenciójához, illetve kevésbé elnyúló csúcsalakjához vezet.



32. ábra A 31. ábrán lévő szaggatott és pontvonal összege

A 32. ábra a platóra injektálás kromatogramja látható, ami a két anyag kromatogramjának összege.



33. ábra Hidroxi-fenitoin csúcsok fenitoinra imprintelt szilikagél-MIP kompozit szemcsékkel töltött oszlopon acetonitrilbe (folytonos vonal) illetve 0,1 mM fenitoint tartalmazó acetonitrilbe injektálva (szaggatott vonal).

Oszlop: 50x3mm fenitoin imprintelt szilikagél-MIP kompozittal töltött oszlop

Oszloptermosztát: 32,4 °C

F=0,5 ml/min

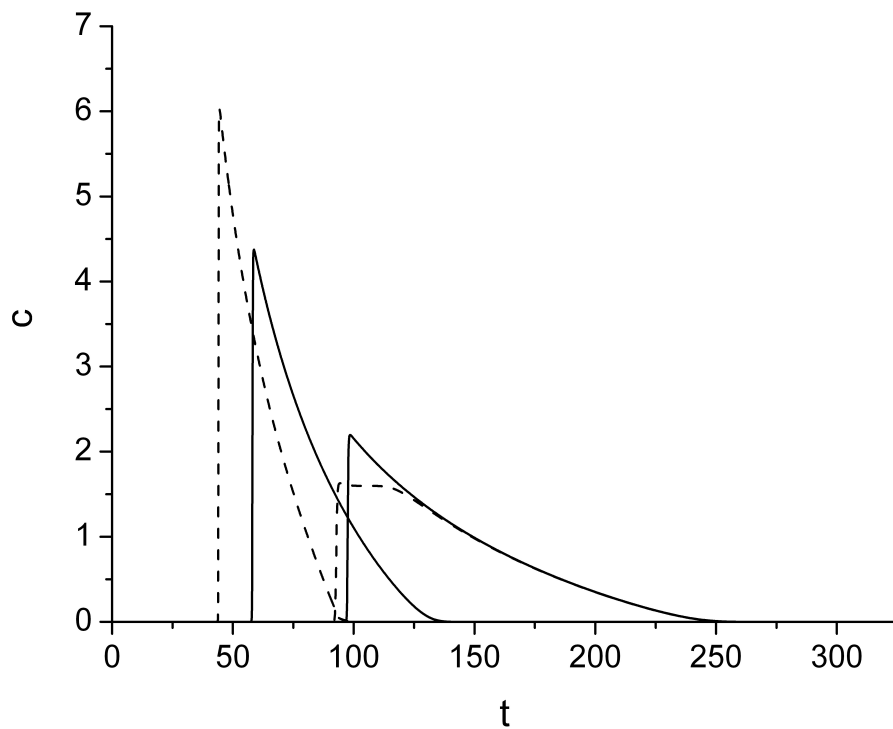
Eluens: acetonitril, illetve 0,1 mM fenitoint tartalmazó acetonitril

$V_{inj}=10 \mu l$

$c_{inj} = 0,1 \text{ mM}$ hidroxi-fenitoin

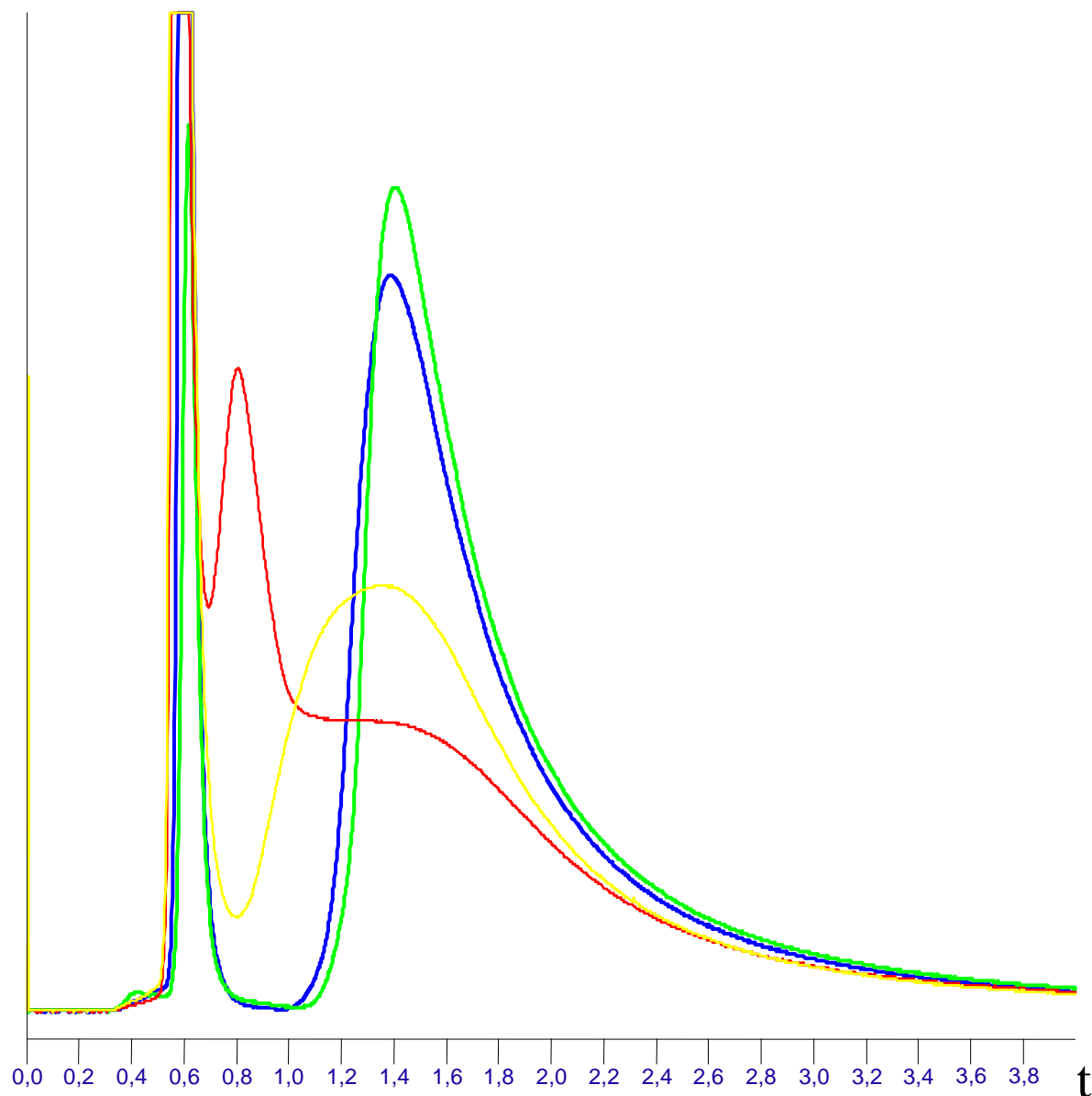
$\lambda=220 \text{ nm}$

A kísérlet ebben az esetben is összhangban van a szimulációval. Fenitoin oldat eluenst használva a hidroxi-fenitoin csúcsa előbbre tolódik, kevésbé elnyúló lesz. A szaggatott vonalas kromatogramon látszik még egy fenitoin csúcs a hidroxi-fenitoin csúcs előtt, ami szintén összhangban van a szimulációval, hiszen ott is látható volt a kevésbé visszatartott anyag csúcsa.



34. ábra Két enantiomer számítógépes szimulációval nyert kromatogramja külön (folytonos vonal) illetve együtt (szaggatott vonal) injektálva egy rövid oszlopra

Rövid oszlopon a versengés hatása jobban megfigyelhető a kromatogramon, a csúcsok nagyobb mértékben torzulnak.



35. ábra Fenitoin és víz együttes injektálása acetonitril eluensbe. A 0,6 percnél lévő nagy csúcs szennyezés következménye

Oszlop: 50x3mm fenitoin imprintelt szilikagél-MIP kompozittal töltött oszlop

Oszloptermosztát: 32,4 °C

F=0,5 ml/min

Eluens: acetonitril

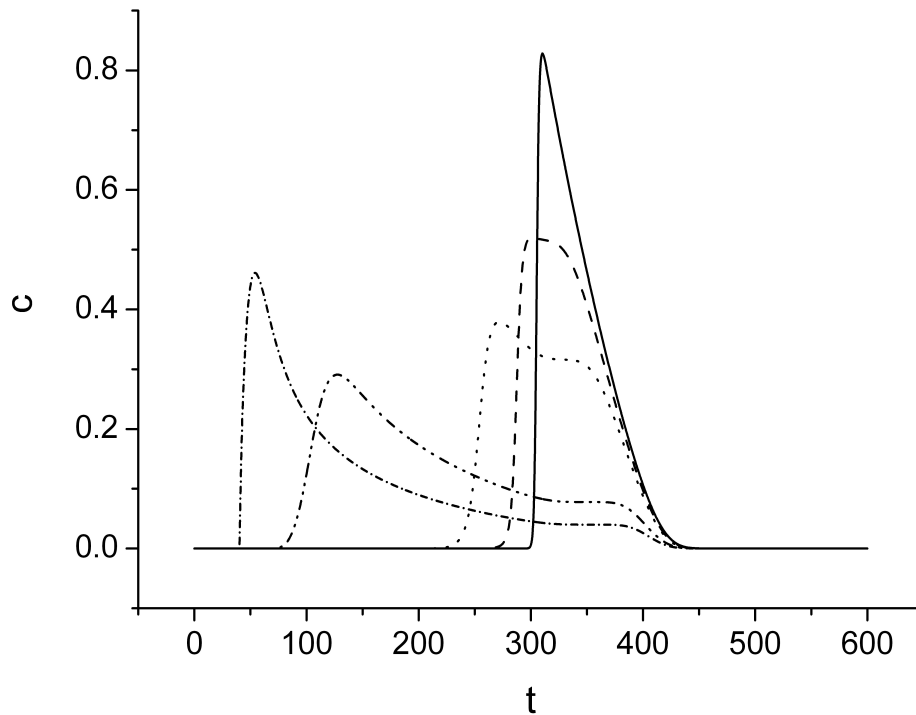
$V_{inj}=10 \mu l$

$c_{inj} = 0,25 \text{ mM}$ fenitoin acetonitril-vizes oldata, ami 500 (zöld) 1000 (kék) 2500 (sárga)

4000 (piros) mM vizet tartalmaz

$\lambda=220 \text{ nm}$

Jól mutatja a 35. ábra, hogy a mintában lévő víz mennyiségének növelése jelentősen torzítja a fenitoin csúcs alakját.



36. ábra Két versengő komponens együtt injektálása csúcstorzulással

A 36. ábra két anyag együttes injektálásának szimulációját mutatja abban az esetben, ha a mérendő anyaggal versengő komponens koncentrációját széles tartományban változtatjuk. Az ábrán csak a mérendő komponens csúcsai láthatók, a mérendő komponensből injektált koncentráció: 5 egység, a versengő komponens koncentrációja a csúcsok sorrendjében (jobbról balra haladva) 0, 10, 20, 100 és 200 egység. A Langmuir paramétereket a 7. táblázat mutatja. Szimulációval is igazolható, hogy a nem detektálható zavaró anyag mennyiségének növelése torzítja a csúcsalakot.

5. Megbeszélés

5.1. A MIP-ek nemlineáris kromatográfiás állófázisként való viselkedésének igazolása

Munkám kezdetén céloom annak vizsgálata volt, hogy az irodalomban a csúcsalak javítására javasolt eljárások, pl. egyenletes szemcseméretű, gömb alakú töltésszemcsék alkalmazása, csökkentik-e a csúcsok aszimmetriáját. Ennek érdekében előállítottam egyenletes szemcseméretű, gömb alakú MIP szemcséket. Erre többféle módszer is létezik. Én a módosított szilikagél pórusaiban történő előállítást választottam, hiszen a kísérletek végzésekor ez volt a legmegfelelőbb módszer. A kicsapásos polimerizáció technikája akkor még nem volt annyira kidolgozott, nem volt alkalmas 10 µm körüli egyenletes méretű szemcsék előállítására. Így tehát C4-es módosított, 200 Å pórusátmérőjű szilikagél pórusait töltöttem fel a prepolimerizációs eleggyel, és utóbbit termikusan polimerizáltam. Választásom azért erre a módosított szilikagél töltetre esett, mert Mosbach csoportja már sikeresen használta ezt a töltetet hasonló célra [17]. Az így kapott anyagot (amit a továbbiakban módosított szilikagél-MIP kompozitnak, illetve kompozitnak nevezek) különböző módszerekkel vizsgáltam. Elsőként „batch” adszorpciós mérésekkel (3. Táblázat) megállapítottam, hogy MIP-ként viselkedik, értve ezalatt azt, hogy adott koncentrációjú templátoldatból nagyobb mennyiséget köt, mint a nem imprintelt, azonos módon (de templát nélkül) készített kompozit. Az adatok az izoterma nemlinearitását és konvex jellegét is mutatják, hiszen nagyobb koncentrációhoz kisebb megoszlási hányados tartozik.

A kompozitokat ezután különböző fizikai-kémiai módszerekkel jellemeztem. Arra az eredményre jutottam, hogy valóban sikerült a polimert a pórusokban előállítani úgy, hogy a szemcsék megtartották eredeti gömb alakjukat, és egyenletes méreteloszlásukat. Ezt egyrészt az elektronmikroszkópos mérések (12-16 ábrák) támasztják alá, amiken jól látható a szemcsék alakja illetve mérete. Másrészt az elektronsugaras mikroanalízis (17-

18 ábrák) is azt igazolja, hogy a szilikagél-MIP kompozitban – annak alapos mosása után is – benne van az előállított polimer, hiszen a szilícium mellett a spektrumban szén jelenléte is látható.

A kompozit sikeres előállításának további bizonyítására az irodalomban már leírt módon elvégeztem a kompozit anyagból a szilikagél váz kioldását is. Ez a HF-os kioldás is sikeresnek bizonyult, tehát a módosított szilikagél váz eltávolítható, ezáltal egyenletes méretű, gömb alakú polimerszemcsék nyerhetők. A szemcsék alakja és mérete az eredeti szilikagél szemcsékével azonos, ami azt mutatja, hogy a szilikagél szemcsék pórusait közel teljesen sikerült polimerrel kitölteni. Az elektronsugaras mikroanalízis is igazolja, hogy a HF-os kioldás jól sikerült, hiszen alig maradt szilícium a kioldás után nyert szemcsén (19. ábra). A szilikagél kioldásával kapott polimerszemcséken is végeztem batch-adszorpciós mérést fenitoinnal és megállapítottam, hogy ezeknek a szemcséknek az adszorpciós sajátosságai közelítően megegyeznek a tömbpolimer adszorpciós sajátosságaival (3. Táblázat).

Az előállítás sikerességét igazolják még a nitrogénadszorpciós mérés eredményei is. A 4. Táblázatból egyrészt látszik, hogy a kiindulási szilikagél $0,8 \text{ cm}^3/\text{g}$ -os pórustérfogata a MIP és NIP kompozit esetén is felére csökkent, másrészt pedig a szilikagél 194 \AA -ös pórusátmérője kb. harmadára csökkent. Megállapítható tehát, hogy a kiindulási szilikagél pórusait valóban sikerült kitölteni a szintén porózus polimerrel. A 11. ábrán a mikropórusos tartomány pórusméret eloszlása látható az SF módszerrel számolva. Jól látszik, hogy a kompozit anyagokban megjelent az a 15 \AA -ös maximum, ami a tömbanyagra jellemző, és a kiindulási szilikagélben nem található meg. Ebből következik, hogy a szilikagél pórusait egy a tömbpolimer pórusméreteloszlásával megegyező anyag töltötte ki.

A továbbiakban az egyenletes szemcseméretű és gömbalakú MIP-ekkel töltött oszlopok viselkedését kívántam tanulmányozni. Erre elvben a szilikagél kioldása után kapott MIP szemcsék ideálisak lettek volna, de ezek mechanikai stabilitása nem megfelelő (könnyen porladnak), ezért a kompozit szemcséket töltöttem kromatográfiás oszlopba. A későbbiekben bizonyítani fogom, hogy a szilikagél váz nem befolyásolja a töltet kromatográfiás viselkedését.

A kompozittal töltött oszlopokat a tömbpolimerrel töltött oszlopokkal kívántam összehasonlítani. Ezt a feladatot megnehezíti, hogy ha két egyforma oszlopot töltök meg

a két anyaggal, az egyes oszlopokban nem lesz azonos a polimer mennyisége, és így a fázisarány sem. A fázisarány viszont a kromatográfiás csúcsok alakját befolyásolja. Szükségünk volt tehát egy olyan módszerre, ami segít a korrekt összehasonlításban. Ilyen módszert azonban csak akkor tudunk adni, ha általában is jól le tudjuk írni a MIP állófázisok kromatográfiás viselkedését, és ezen belül a kromatográfiás csúcsalaknak a fázisaránytól való függését. Mindenekelőtt tehát meg kellett vizsgálnom, hogy milyen kromatográfiás modell írja le helyesen a MIP oszlopok működését. Erre a célra ideálisabbnak találtam a gömb alakú, egyenletes szemcseméretű MIP-kompozit töltet alkalmazását, mint az irreguláris MIP tömb szemcsékét.

A továbbiakban ezért azt vizsgáltam, hogy a MIP-kompozittal töltött oszlop viselkedése helyesen írható-e le a nemlineáris kromatográfia elméletével. Ezt a feladatot a nemlineáris kromatográfiában úgy szokták megoldani, hogy megméri a töltet adszorpciós izotermáját, majd az izoterma alapján szimulált kromatogramokat összevetik a kísérleti eredményekkel. Ez a módszer azonban egyrészt speciális, nagyon pontos izotermamérést igényel széles koncentrációtartományban, másrészt szükség van hozzá a szimulációs algoritmusra. Mivel ezek a legtöbb analitikai laboratóriumban nem állnak rendelkezésre, és én olyan módszert szerettem volna alkalmazni, amelyet a MIP-ekkel dolgozó analitikusok széles körben tudnak alkalmazni, ezért egy másik eljárást dolgoztam ki. Ennek lényege, hogy azt ellenőriztem, hogy a kromatográfiás csúcsalak lefutását a kísérleti paraméterek, pl.: térfogatáram, oszlophossz, úgy befolyásolják-e, amint azt a nemlineáris kromatográfiás elmélet előre jelzi.

A nemlineáris kromatográfia a csúcs leszálló ágát a korábban már bemutatott 6. Egyenlettel írja le:

$$t(c) = t_0 \left(1 + F \frac{dq}{dc} \right) \quad \mathbf{6. \text{Egyenlet}}$$

ahol t_0 a holtidő, F a fázisarány (kg/dm^3), az utolsó tag pedig az adszorpciós izoterma meredeksége c koncentrációnál.

Ez az egyenlet átalakítható a $t_0 = V_0/W$ behelyettesítéssel (ahol V_0 a holttérfogat, W pedig a térfogatáram):

$$t(c) = \frac{V_0}{W} \left(1 + F \frac{dq}{dc} \right) \quad \mathbf{7. \text{Egyenlet}}$$

A 6. Egyenlet az $F = m/V_0$ és a $t_0 = V_0/W$ behelyettesítéssel is átalakítható (ahol m a MIP tömege):

$$t(c) - t_0 = \frac{m}{W} \frac{dq}{dc}$$

8. Egyenlet

Ezen egyenleteket használtam, hogy ellenőrizzem a nemlineáris elmélet alkalmazhatóságát a kísérleti adatok leírására.

Először a kromatográfiás csúcsalaknak az oszlop hosszától való függését vizsgáltam. Egy 5 cm és egy 10 cm hosszúságú oszlopra (melyeknek belső átmérője azonos volt) ugyanazt a mintát injektáltam azonos térfogatáram mellett. Az eredményeket a 21. ábra mutatja, ahol a vízszintes tengelyen nem a t időt, hanem a $\frac{t}{L}$ hányadost ábrázoltam. A

6. Egyenlet szerint ugyanis – figyelembe véve, hogy $t_0 = \frac{L}{u}$ és hogy u és F a két

oszlopon azonos- azonos $\frac{t}{L}$ értékekhez azonos $\frac{dq}{dc}$ érték tartozik. Ez viszont azt jelenti,

hogy azonos $\frac{t}{L}$ értékekhez azonos c koncentráció is tartozik, és így azonos detektorjel

várható. Valóban a két kromatogram leszálló ága ebben az ábrázolásban együtt halad. A csúcsok területe, amely az idő szerinti ábrázolásnál nyilvánvalóan egyenlő kellett, hogy legyen, a vízszintes tengely transzformálása után úgy viszonyul egymáshoz, mint az oszlophosszúságok reciproka.

A következő lépésben a térfogatáramtól való függést vizsgáltam. A 7. Egyenlet mindkét oldalát megszorozva az térfogatárammal megkapjuk az adott koncentrációhoz tartozó elúciós térfogatra vonatkozó összefüggést:

$$V(c) = Wt(c) = V_0 \left(1 + F \frac{dq}{dc}\right)$$

9. Egyenlet

Az egyenlet alapján, ha különböző áramlási sebességeknél mért azonos koncentrációjú csúcsokat úgy ábrázolunk, hogy az x tengelyen az elúciós térfogat van, akkor a leszálló ágak egyezését kell tapasztalnunk. Ez az egyezés jól látszik a 22. ábrán. Látszik még az is, hogy az áramlási sebesség változtatása a csúcs felszálló ágára hatással van. A felszálló ágat ugyanis befolyásolja a kinetika, míg a leszálló ágon a kinetika hatása elhanyagolható a nemlineáris adszorpciós izoterma hatásához képest. Tehát a kisebb áramlási sebesség meredekebben felfutó felszálló ágat ad, de a leszálló ágra nincs hatással.

Megvizsgáltam továbbá a szemcseméret hatását a kromatogramok alakjára. A különböző szemcseméretű szilikagél-MIP kompozit anyagok összehasonlításánál szintén azt az eredményt kaptam, hogy a szemcseméret a csúcs leszálló ágára nincs hatással, csak a felszálló ágra. Lineáris kromatográfiában a kisebb szemcseméret kisebb elméleti tényérmagasságot, ezáltal nagyobb elméleti tényérszámot és keskenyebb csúcsokat eredményez. Jól látható a 23. ábrán, hogy a kisebb szemcseméret a csúcs felszálló ágára valóban ilyen hatással volt, tehát meredekebben fut fel a csúcs, de a leszálló ág teljesen megegyezik mind a két szemcseméret esetén.

A fenti mérések alapján megállapítottam, hogy a molekuláris lenyomatú polimerekkel töltött oszlopok kromatográfiás viselkedését a nemlineáris elmélet jól leírja. Egyben egyszerű, minden analitikai laboratóriumban használható módszert adtam arra, hogy mások is meg tudják vizsgálni az általuk előállított molekuláris lenyomatú polimerek kromatográfiás viselkedését, és be tudják látni, hogy arra a nemlineáris elmélet érvényes.

Az előbbi eredmény birtokában már módomban nyílt arra is, hogy összehasonlítsam a kompozit illetve a tömb MIP kromatográfiás viselkedését. Ebből a célból két egyforma oszlopot töltöttem meg a tömb illetve kompozit MIP-pel, és a két oszlopra ugyanazt a mintát injektáltam azonos térfogatáram mellett. A két oszlopon a korábban leírtak miatt más a polimer mennyisége.

Ahhoz tehát, hogy a tömb illetve szilikagél-kompozit töltetek összehasonlíthatók legyenek, a nemlineáris elmélet alapján kell őket összehasonlítanunk. El kell végeznünk az alábbi számítást: a leszálló ágak közös szakaszán a két leszálló ág minden pontjánál el kell osztani egymással a redukált retenciós időket. Ezzel a számítással konstans számot kapva megbizonyosodhatunk arról, hogy a két leszálló ág egy szorzási művelettel fedésbe hozható egymással (20. ábra).

Ezen kísérletek alapján megállapítottam, hogy a kromatográfiás csúcsok leszálló ágának tailingjét nem lehet csökkenteni oly módon, hogy egyenletes méretű, gömb alakú MIP szemcséket használunk. A látszólagos javulás az oszlopokban lévő különböző polimer mennyiségekből adódott.

5.2. A nemlineáris viselkedés általánosíthatósága

Munkám kezdetekor a szakirodalomban egyáltalán nem volt elfogadott az, hogy a MIP-ek nemlineáris állófázisként viselkednek és hogy a jelentős csúcshéledést ez okozná. Egyedül Guiochon, és ő is csak egyetlen MIP-re mutatta ezt meg. Eredményeit még ma sem alkalmazzák széles körben. Ezért azzal, hogy megmutattam, hogy egy az övétől lényegesen eltérő MIP (nálam a funkcionális monomer egy amid, nála pedig egy sav) is nemlineáris viselkedést mutat, lényeges előrelépés történt az állítás általánosítása szempontjából. Ráadásul az általam alkalmazott módszer további MIP-eknél is lehetővé teszi a kérdés gyors vizsgálatát. Az általam alkalmazott módszer előnye, hogy nem igényli az izoterma ismeretét. Ez egyrészt azért fontos, mert az izoterma szükséges pontosságú mérése nagyon munkaigényes, másrészt a MIP-ek kinetikai viselkedése nem ismert, de irodalmi adatok alapján (például, hogy batch adszorpciós méréseknél az egyensúlybeállásra 24 órát hagynak) várható, hogy az egyensúlybeállítás gyors kezdeti szakaszát egy rendkívül lassú szakasz követi. Emiatt valószínű, hogy a kromatográfiai vizsgálatokra csak egy kvázi-egyensúlyi izoterma érvényes, aminek nemhogy a mérése, de még a definiálása sem történt meg eddig.

Az, hogy a MIP-ek általában is nemlineáris állófázisnak tekinthetők, annyiból is érdekes, hogy korábban a nemlineáris kromatográfiát szinte azonosnak tekintették a preparatív kromatográfiával, ami nem tartható, ha a MIP-ekre is gondolunk. Ezek az irodalom tanúsága szerint 10^{-6} - 10^{-8} M koncentrációig is nemlineárisak (ezt bizonyítják a homológ binding assay alkalmazások).

5.3. A kompozit töltetek analitikai alkalmazhatósága

Amint láttuk a szabályos alakú és szemcseméretű kompozit MIP töltetek nem okoznak valós javulást a templátcsúcs leszálló ágának alakjában. Érdekesnek tartottam azonban azt is megvizsgálni, hogy más kromatográfiai szempontokból hogyan viselkedik a kompozit töltet. A kompozitoknál a minta részben a MIP-pel, részben viszont az eredeti kromatográfiai töltet felületével érintkezik. Felvetődik tehát az a kérdés, hogy az eredeti

kromatográfiás töltet mennyiben befolyásolhatja a kompoziton végzett analitikai elválasztásokat. Mivel a MIP-eknél eluensként gyakran alkalmazunk acetonitrilt vagy más aprotikus közeget, ezért azt lehetne gondolni, hogy az eredeti tölteten, ami esetünkben C4 módosított szilikagél volt, csak az extrém hidrofób anyagoknak van retenciója. Vizsgálataim azt mutatták, hogy ez nincs így. Az 3,2 logp értékű ketoprofen kromatográfiás csúcsát mutatja a 24. ábra a Kromasil C4 tölteten acetonitril eluensben. Bár a csúcsmaximum t_0 -nál van, de a csúcs tailinges, tehát a ketoprofen valamelyest adszorbeálódik a C4 tölteten, minden valószínűség szerint nemlineáris izotermával. Elképzelhető lenne, hogy a kompozitot ne módosított szilikagél pórusaiban állítsuk elő, ahol a szilikagél esetleg szabadon maradó -OH csoportjai okozhatják a vártnál nagyobb retenciót. Ezért megvizsgáltunk egy szilikagélt egyáltalán nem tartalmazó polimer alapú fordított fázisú töltetet is. A 25. ábra mutatja a ketoprofen retencióját acetonitril eluensben az Asahipak ODP 50 oszlopon. Itt a csúcs nemcsak, hogy tailinges, de a maximum is a t_0 után jelentkezik. A kompozit tölteteknek tehát lehetnek ugyan előnyeik (pl. akár 2 μm körüli átmérőjű, gömbalakú szemcsék is készíthetők, ami a csúcsok felszálló ágát bizonyára javítja), de alkalmazásuk előtt meg kell vizsgálni az alapként használt töltet viselkedését is.

5.4. A nemlineáris izoterma következményei a MIP-ek kromatográfiás jellemzésénél

Miután bizonyítást nyert, hogy a molekuláris lenyomatú polimerek kromatográfiás viselkedését a nemlineáris elmélet jól leírja, megvizsgáltam, hogy milyen következményekkel jár az az ellentmondásos gyakorlat, hogy a MIP-ek kromatográfiás jellemzésénél a lineáris kromatográfiában megszokott fogalmakat, az ott érvényes tartalommal használják. Konkrétan azt vizsgáltam meg, hogy milyen mértékben jellemezhetők a MIP-ek a kromatográfiás mérésekből meghatározott retenciós tényezőkkel (k), szelektivitási tényezőkkel (α) és imprintelési faktorokkal (IF). Egyrészt kísérleti adatokkal, másrészt számítógépes szimulációkkal sikerült megmutatnom, hogy ezen paraméterek használata aggályos.

A retenciós tényezőt a retenciós időből (t_R) számítjuk, amely a beinjektált komponens átlagos tartózkodási ideje. Szimmetrikus csúcsok esetén a retenciós idő a csúcsmaximumhoz tartozó idő, aszimmetrikus csúcsok esetén ez az állítás nem igaz, a csúcs súlypontját kell meghatározni. A MIP irodalomban a retenciós időt mindig a csúcsmaximumhoz tartozó idővel azonosítják. A k retenciós tényezőt a $t_R = t_0(1+k)$ összefüggésből számítják. A kapott eredményt úgy értelmezik, hogy minél nagyobb egy anyagra a k értéke, annál nagyobb az adott anyagra a MIP oszlop visszatartása. Azt gondolják tehát, hogy a k érték alkalmas különböző MIP-ek összehasonlítására (tudniillik, hogy melyik tartja vissza jobban a templátot), illetve adott MIP-en a különböző anyagok megkötődésének az összehasonlítására. Az alábbiakban be fogom mutatni, hogy ezek a következtetések a MIP-ek nemlineáris izotermái miatt nem általánosan érvényesek. (Megjegyzem, hogy ha a k -t a csúcsok súlypontjából határoznák meg, az sem lenne megfelelő.)

Mindenekelőtt megmutatom, hogy k értéke függ a beinjektált anyag koncentrációjától. Emiatt nem használható a beinjektált anyag és az oszlop közötti kölcsönhatás mértékének számszerű jellemzésére. A 26. ábrán láthatók kísérleti eredményeim, melyek szerint különböző koncentrációjú fenitoin-oldatokat injektálva ugyanarra a fenitoin-MIP oszlopra a csúcsmaximumokból meghatározott k értékek a koncentráció növekedésével csökkennek. Ugyanezen az ábrán az is látható, hogy a NIP esetén ez a hatás jóval kisebb, összefüggésben azzal, hogy ott a csúcsalak majdnem szimmetrikus. Ezek a tapasztalati eredmények összhangban vannak a nemlineáris kromatográfia elméletével is. A korábban bemutatott 10. ábrán jól látható, hogy a kromatográfiai csúcsok maximuma a beinjektált koncentráció csökkenésével egyre nagyobb időértékekhez tolódik, vagyis nő a látszólagos k érték. A MIP-ek kromatográfiai vizsgálata során már más szerzőknek is feltűnt a retenciós idő koncentrációfüggése, de ezt egyrészt nem a nemlineáris kromatográfiai elmélet alapján értelmezték, másrészt nem jutottak arra az egyértelmű következtetésre, hogy a retenciós tényező nem alkalmas a vizsgált anyag és az oszlop közötti kölcsönhatás jellemzésére.

A szelektivitási tényező (α) a lineáris kromatográfiában két csúcs retenciós tényezőjének hányadosa $\alpha = \frac{k_2}{k_1}$. Mivel a lineáris kromatográfiában $k_i = K_i \frac{V_s}{V_m}$, ahol K_i az i anyag megoszlási hányadosa V_s és V_m pedig az álló illetve a mozgófázis térfogata,

ezért $\alpha = \frac{K_2}{K_1}$. Ez az összefüggés azt mutatja, hogy a lineáris kromatográfiában a szelektivitási tényező két egyensúlyi állandó hányadosa, és így maga is egy állandó. Ennek megfelelően α a lineáris kromatográfiában jól használható a szelektivitás számszerű jellemzésére. A szelektivitás nem függ sem az egyes anyagok koncentrációjától, sem az egyéb kromatográfiás paraméterektől (pl. térfogatáram, oszlop geometriai paraméterei, stb.), de természetesen függ az eluenstől és a hőmérséklettől. A MIP irodalomban a szelektivitási tényezőt igen gyakran számítják a mért retenciók időkből, és úgy interpretálják, mintha ez valóban csak a két vizsgált anyagtól, a töltettől, az eluenstől és a hőmérséklettől függene. Ez azonban nincs így. A 27. ábrán bemutatott kísérleteim tanúsága szerint a két anyag (fenitoin, timin) szelektivitási tényezője egy fenitoin MIP oszlopon erősen függ a beinjektált minta koncentrációjától: mindkét komponensre nézve 0,5 mM-os mintát injektálva $\alpha=1,38$, míg 0,05 mM-os koncentrációkat injektálva $\alpha=2,12$. Itt is felvetődik az a kérdés, hogy a szelektivitási tényező koncentrációfüggése magyarázható-e a nemlineáris kromatográfia elméletével. Fentebb már megmutattam, hogy a retenciók tényező koncentrációfüggése következik a nemlineáris elméletből, ez azonban nem jelenti azt, hogy két anyag k értékeinek hányadosa is minden esetben koncentrációfüggő kell, hogy legyen. Az rögtön belátható, hogy, ha a zavaró anyag koncentrációja nem változik, csak a templáté, akkor a templát csúcsának eltolódása miatt α értéke koncentrációfüggő lesz. Másrészt viszont, ha két anyagnak teljesen egyforma az izotermája, és mindig egymással azonos koncentrációban injektáljuk őket, akkor a szelektivitási tényező értékére mindig 1-et kapunk. Azt mondhatjuk tehát, hogy a nemlineáris kromatográfiában α értéke csak speciális esetekben lehet független a koncentrációtól. α koncentrációfüggése ennél konkrétan is vizsgálható, ha ismert a két anyag izotermája. Ebben az esetben ugyanis a kromatogramok számítógépen szimulálhatóak. A 28. ábrán bemutattam egy racém elegy szimulált elválasztását. α értéke itt is erősen függ a beinjektált koncentrációtól. α koncentrációfüggésénél is jóval meglepőbb, hogy értéke függ a kromatográfiás oszlop hosszától, illetve belső átmérőjétől. Ezt ismét szimulált kromatogramok adataival mutatom be. Az 5. táblázat bal oldalán különböző hosszúságú, de egyforma belső átmérőjű, míg a táblázat jobb oldalán különböző belső átmérőjű, de azonos hosszúságú oszlopokat hasonlítottam össze. A beinjektált minta minden esetben azonos volt. Jól

látható, hogy a szelektivitási tényező egyaránt függ úgy az oszlop hosszától és annak belső átmérőjétől. Ez azt jelenti például, hogy ha két laboratóriumban ugyanazt a töltetet ugyanolyan koncentrációjú mintával vizsgálják, de eltérő méretű oszlopokban, akkor várhatóan eltérő adatot fognak kapni a MIP szelektivitására. Ez pedig azt jelenti, hogy a MIP-ekkel kapcsolatos kutatás teljesen téves irányokba is mehet, ha a kromatográfiásan meghatározott jellemzők alapján próbálunk újabb, a korábbiaknál jobb MIP-eket előállítani, de nem vesszük figyelembe a nemlineáris viselkedésből adódó következményeket.

Továbbmenve, a nemlineáris kromatográfiában a szelektivitási tényező (α) és a felbontás (R) közötti összefüggés nem áll fenn abban a formában, amely a lineáris kromatográfiából ismert. Lineáris kromatográfiában R értékét a Gauss görbe alakú csúcs szélességével fejezzük ki, de nemlineáris kromatográfiában a csúcsok korántsem Gauss görbe alakúak. Tehát, még ha két egyforma injektált koncentrációnak megfelelő csúcs maximumaiból meghatározott α értékek felhasználhatók is a MIP-ek (koncentrációfüggő) szelektivitásának durva jellemzésére $\alpha > 1$ a templátnak a zavaró vegyülethez viszonyított nagyobb retencióját jelzi), ez az α nehezen engedi megbecsülni, milyen jó a két vegyület elválasztása. Az elválasztás hatékonysága nagymértékben függ ugyanis attól is, hogy mennyire elhúzódó az először eluálódó vegyület csúcsa.

A molekuláris lenyomatú polimerek további jellemzésére használt mennyiség az imprintelési faktor (IF). Az imprintelési faktoralatt azt kívánják kifejezni, hogy mennyire volt sikeres az imprintelés. Ehhez az imprintelt polimert a nem imprintelt kontroll polimerrel hasonlítják össze. Ha az imprintelt polimer jobban köti a templátot, mint a nem imprintelt, akkor az imprintelést sikeresnek tekintik. A két polimeren való kötődés valamilyenfajta mérőszámait egymással osztva kapjuk az imprintelési faktort. Amint látható, az imprintelési faktornak nincs szabatos definíciója. Ha a MIP több templátot köt, mint a NIP az még nem bizonyítja, hogy a MIP-en a templátra specifikus kötőhelyek alakultak ki. Cormack és munkatársai bebizonyították például [94], hogy ha egy karbonsav templát (2,4-D, növényvédőszer) helyett ecetsavat alkalmaznak imprintelésre, a kapott polimer kötőképessége a 2,4-D-re nézve nagyobb, mint az egyáltalán nem imprintelt polimeré. Ebben az esetben a megnövekedett kötődés nyilván nem tulajdonítható a 2,4-D-vel való imprintelődésnek. Bárhog definiálunk is azonban

egy imprintelési faktort, attól elvárjuk, hogy a MIP és a NIP közti különbséget elég egyértelműen jellemezze. Az alábbiakban azt fogom megmutatni, hogy a kromatográfiásan mért IF még ennek az általános elvárásnak sem felel meg.

A kromatográfiás imprintelési faktort a templát MIP-en illetve NIP-en mért retenciós tényezőjének hányadosaként adják meg:

$$IF = \frac{k_{MIP}}{k_{NIP}}$$

10. Egyenlet

Fentebb már megmutattam, hogy a templát retenciós tényezője függ a beinjektált minta koncentrációjától. Ugyanakkor a 26. ábrán az is látható, hogy az általam vizsgált esetben a NIP retenciós tényezője alig függ a beinjektált minta koncentrációjától. Ennek

megfelelően az $IF = \frac{k_{MIP}}{k_{NIP}}$ erős koncentrációfüggést mutat, tehát nem alkalmas az

imprintelés hatékonyságának egyetlen mérőszámmal való jellemzésére. Az adott példában a koncentrációt 0,01 mM-ról 2 mM-ra növelve az IF 4,33-ról 1,65-re csökkent.

Ezek a kromatográfiás mérésekből kapott mérőszámok (k , α , IF) nem alkalmasak a MIP-ek jellemzésére, különböző MIP-ek összehasonlítására. A legjobb megoldás az adszorpciós izoterma mérése lenne, de ismert egyensúlyi koncentrációhoz tartozó megoszlási hányados is megfelelő a polimerek jellemzésére. Ez az adat ugyan koncentrációfüggő, viszont egyrészt modellfüggetlen, másrészt egy szűkebb koncentrációtartományban szemléletesen írja le a MIP viselkedését. Különböző templátokra készült MIP-ek összehasonlítására is alkalmas azonos egyensúlyi koncentrációtartományban mérve. Fontos megjegyezni, hogy a nagy megoszlási hányados önmagában nem feltétlenül előny, mert nem jelent egyben nagy szelektivitást is, hanem inkább a templát-MIP kötés eltérő karakterére utal. Azonkívül a kívánt felhasználástól is függ, hogy mekkora megoszlási hányados az ideális.

Az irodalomban fellelhetőek adatok (például a 8. Táblázatban bemutatott forrásokban), melyekből megoszlási hányados számolható. Általában a szerzők ezt a számolást nem végzik el. A számolást elvégezve megállapítottam, hogy a megoszlási hányadosokban különböző MIP-eken –akár azonos koncentrációtartományban is– nagyságrendi különbségek lehetnek. A 8. Táblázatban ezt a 2,4,5-triklórfenoxi-ecetsav és a propranolol adatainak összevetésén láthatjuk, 0,0001 mM koncentrációnál.

8. Táblázat Különböző MIP-ek mért megoszlási hányadosai (az adszorpciós izotermákból számolva)

Templát	c (mM)	D (l/kg)	Hivatkozás
teofilin	3,2	26,2	[85]
	0,3	105	
2,4,5-triklórfenoxi-ecetsav	0,0001	7,5	[86]
	0,001	4,75	
koleszterol	0,1	260	[87]
	0,9	60	
timolol	0,005	560	[88]
	0,04	150	
metszulforon metil	0,066	54	[89]
	0,31	52	
	2,2	6,6	
fenitoin	0,2	75	[90]
	1	45	
	2,35	26,4	
2-aminopiridin	0,7	42	[91]
	2,35	28	
etil adenin-9-acetát	0,4	29	[75]
	4	10	
9-etiladenin	0,1	236	[92]
	1	52	
	10	12	
Fmoc-L-Trp	0,2	23 (l/l)	[79]
	2	14,5 (l/l)	
	20	7,9 (l/l)	
S-propranolol	1,00E-06	5,00E+04	[54,93]
	1,00E-04	1,50E+04	

A MIP-ek várható kromatográfiás viselkedéséről az ad közelítő információt ha meghatározzuk a megoszlási hányadost egy a detektorral még detektálható kis koncentrációnál és egy olyan koncentrációnál, ami a várható minták legnagyobb koncentrációjának felel meg. Ha a két megoszlási hányados nagyon különböző, akkor elnyúló kromatográfiás csúcsokra számíthatunk.

5.5. A nemlineáris izoterma következményei a MIP-ek kromatográfiás elválasztásra történő alkalmazásánál

A MIP-ek kromatográfiás elválasztásokra történő alkalmazását erősen korlátozza a csúcsok (elsősorban a templátcsúcs) tailingje. Ennek ellenére sok kísérlet történt arra, hogy a MIP-eket kromatográfiás elválasztásra használják. Az ezekről a próbálkozásokról szóló beszámolók feltűnő módon nem említik azt, hogy tapasztalták volna az elválasztandó vegyületek versengésének a hatását. Ez azért meglepő, mert a MIP-ek alkalmazásának más területein, pl. binding assay a versengés szerepe elsődleges. A kromatográfiás elválasztások során a szomszédos csúcsok alkotói csak fokozatosan válnak el egymástól az oszlopon való végighaladás során. Addig, amíg a két csúcs részlegesen átfed, a csúcsokhoz tartozó összetevők versenyezhetnek a kötőhelyekért. A versenyzés azt jelenti, hogy mindkét anyagból kevesebb kötődik meg, mint amennyi a másik anyag távollétében megkötődne. Azt várnánk tehát, hogy a két csúcs alakjára, és így az elválasztás jóságára is komoly hatással lehet a versengés. Kérdés tehát, hogy miért nem tűnt fel a versengés hatása a MIP oszlopokkal dolgozó kutatóknak. Erre a kérdésre számítógépes szimulációkkal és kísérletekkel is megpróbáltam választ adni.

A versengés hatását úgy lehet legegyszerűbben ellenőrizni, hogy a két elválasztandó anyagot először külön-külön injektáljuk az oszlopra, majd pedig együttesen. Ha a versengés befolyásolja a csúcsok alakját, akkor az együttes injektálás esetén más lesz a csúcsok alakja, mint a külön injektálásnál. Először a szimulációval kapott eredményt mutatom meg. A 29. ábrán két vegyület (enantiomerek) elválasztását szimuláltam. A külön injektáláshoz tartozó csúcsokat folytonos vonallal, az együttes injektáláshoz tartozókat szaggatott vonallal jelöltem. Az eredmény azt mutatja, hogy az elsőként eluálódó csúcs együttes injektálás esetén valamivel hamarabb eluálódik, mint a külön injektálásnál. A csúcs alakja csak kis mértékben változik. A második csúcs esetében az együttes injektálásnak semmilyen hatása nem látható, a folytonos és szaggatott vonallal rajzolt csúcsok gyakorlatilag teljesen átfednek. A számításhoz használt paramétereket a 7. Táblázat mutatja be. Feltettem, hogy mindkét anyagra külön-külön a Langmuir izoterma érvényes melyek paraméterei a 7. Táblázatban láthatók.

$$q_1 = \frac{a_1 c_1}{1 + b_1 c_1}$$

11. Egyenlet

$$q_2 = \frac{a_2 c_2}{1 + b_2 c_2}$$

12. Egyenlet

Feltettem továbbá, hogy az együttes adszorpciót a kompetitív Langmuir izoterma írja le:

$$q_1 = \frac{a_1 c_1}{1 + b_1 c_1 + b_2 c_2}$$

13. Egyenlet

$$q_2 = \frac{a_2 c_2}{1 + b_1 c_1 + b_2 c_2}$$

14. Egyenlet

A szimulációhoz hasonló eredményt kaptam kísérletileg is. A kísérletben fenitoinra imprintelt kompozit-MIP oszlopot használtam, amire fenitoint és hidroxifenitoint injektáltam. A külön injektálással kapott csúcsokat folytonos vonallal, az együttes injektálással kapott kromatogramot szaggatott vonallal ábrázoltam. Az együttes injektálás itt is csak kis mértékű torzulást okoz a csúcsokban. Mivel átlapoló csúcsokról van szó ezt úgy láttuk be, hogy a külön injektált csúcsokat összeadtuk, és az összeg teljes fedésben volt az együttes injektálással kapott kromatogrammal. Felvetődhet, hogy a szimulációnál miért nem a fenitoin MIP viselkedését szimuláltam. Ennek oka, hogy két anyag együttes izotermájának pontos kimérése nagyon nehéz feladat, és ha el is végezzük, kétséges, hogy sikerül-e egyszerű modellegyenletet illeszteni a kapott függvényre. Ezért ettől a megoldástól eltekintettem.

Felvetődik az a kérdés is, hogy a fenitoin és a hidroxifenitoin valóban versengenek-e a fenitoin MIP kötőhelyeiért. Ennek eldöntésére egy olyan kísérletet végeztem, amelynek alkalmazhatóságát először szimulációval mutatom be. A kísérlet lényege, hogy a jobban visszatartott anyagot egyszer a tiszta eluensbe, egyszer pedig a kevésbé visszatartott anyag eluensben készült oldatába injektálom. A szimulációval kapott kromatogramokat a 31. ábra mutatja. A jobban visszatartott anyag két kromatogramját szaggatott illetve folytonos vonallal ábrázoltam. Bemutattam az ábrán azt is, hogy a második kísérletben az eluenshez hozzáadott gyengén visszatartott anyag koncentrációsintje időben nem állandó, hanem egy pozitív és egy negatív csúcsot is mutat. Az ábráról az a tanulság vonható le, hogy ha az erősebben visszatartott anyagot a gyengébben visszatartott anyag oldatába injektáljuk, akkor az erősen visszatartott anyag csúcsa a versengés hatására balra tolódik, azaz kisebb retenciós időnél jelentkezik, a csúcs alakja is megváltozik,

kevésbé elnyúló lesz. Ha ezt a jelenséget akarjuk alkalmazni annak bizonyítására, hogy a fenitoin és a hidroxifenitoin versengenek a kötőhelyekért, akkor figyelembe kell vennünk, hogy az alkalmazott UV detektor mindkét anyagot érzékeli. Mivel a két anyag moláris abszorbanciája nem sokban különbözött, ezért megvizsgáltam, hogy a szimulációban milyen hatása van annak, ha a második kísérletben a két anyag kromatogramját összeadom. Az eredményt a 32. ábra mutatja. Ezen az ábrán az látható, hogy az erősebben visszatartott anyag csúcsának eltolódása jól megfigyelhető továbbra is, és az eltolódás mértéke azonos. Ugyanakkor megjelenik egy plusz csúcs is kis retenciós időnél. A fenitoinos oszloppal végzett kísérleti eredmény 33. ábra ugyanezeket a vonásokat mutatja. Ez arra enged következtetni, hogy a fenitoin és a hidroxifenitoin valóban versengenek a kötőhelyekért.

Az eddig bemutatott szimulációs és kísérleti példák azt mutatták, hogy a versengés hatása a szokványos mérési körülmények között nem feltétlenül jelentkezik számottevő mértékben a kromatogramokon. Kérdés azonban, hogy vannak-e olyan kromatográfiai körülmények, amikor a versengés hatása sokkal nyilvánvalóbb. Különböző szimulációs kísérletek után azt tapasztaltam, hogy rövid oszlopon a hatás sokkal kifejezettebb, akkor is, ha az izoterma egyenletek, és az izoterma paraméterek ugyanazok, mint a korábban bemutatott szimulációs számításoknál. A 34. ábrán az együttes injektálásnál a kevésbé visszatartott anyag csúcsa lényegesen előbbre tolódik, a jobban visszatartott anyag csúcsának felszálló ága kissé előbbre kerül, és az éles csúcs helyett egy plató jön létre. Az is megfigyelhető, hogy a két anyag kromatográfiai elválasztása az együttes injektálás esetén szinte tökéletes, jóllehet a külön injektálással kapott csúcsok jelentősen átlapolnak. Ebből az eredményből és a korábban bemutatott tipikusabb esetből is arra a következtetésre juthatunk, hogy az együttes injektálás a versengő anyagok elválasztását valamelyest javítja. Ilyen értelemben a versengés tehát valamennyire javítja az első csúcs tailingje miatt rossz elválasztást.

A versengés hatása megfigyelhető még abban az esetben is, ha a két versengő anyag nem az elválasztandó mérendő anyagok, hanem egyrészt a templát, másrészt egy nem detektálható anyag, ami még jelen van a mintában. A 36. ábrán látható a szimulált kromatogramokon, hogy a nem detektálható anyag koncentrációját növelve a templát csúcsa előretolódik és deformálódik. Ugyanez a hatás figyelhető meg akkor is, ha fenitoin MIP oszlopra fenitoint injektálunk egyre vizesebb oldatból (35. ábra).

Ez utóbbi mérésnek távolabbra is mutató tanulsága, hogy a MIP-ek kromatográfiás alkalmazásakor különleges, nem várt mátrixhatások léphetnek fel. Olyan anyagok is zavarhatnak, amelyek a templáthoz szerkezetileg nem hasonlítanak. Ezt azért is érdemes megjegyezni, mert a kompetitív binding assayben egyes szerzők u.n. „non related probe” molekulákat használnak a templát versenytársaként, ugyanakkor eddig senki sem mutatott rá arra, hogy ez azt jelenti, hogy váratlan mátrixhatások léphetnek fel a MIP-ek alkalmazása során.

5.6. A nemlineáris kromatográfia következményei MIP-ek tulajdonságainak optimalásánál

A MIP-eket előállító szakemberek fő törekvése, hogy valamilyen gyakorlati alkalmazáshoz a lehető legjobb tulajdonságokkal rendelkező MIP-et állítsanak elő. Az optimalás alapja a már előállított MIP-ek jellemzése, majd ennek alapján olyan újabb MIP előállítása, amely a gyakorlat céljaira jobban megfelel. Ez a célkitűzés felveti azt a kérdést, hogy mikor felel meg jobban egy MIP egy adott gyakorlati feladatra. Tekintsük példaként a kromatográfiás alkalmazást: itt komoly problémát jelent a csúcsok tailingje. Az optimalás célja lehet tehát a tailing valamilyen módon való csökkentése, például olyan MIP előállításával, aminél ez a tailing kisebb lesz. Ahhoz, hogy ezt a feladatot megoldjuk, szükséges valamilyen elképzelés arról, hogy mi okozza ezt a tailinget. Korábban már említettem, hogy az irodalomban a MIP-eknél tapasztalt tailing magyarázatául vagy olyan tényezőket hoztak fel, amelyek a lineáris kromatográfiában a diszperziót növelik (pl.: nagy szemcseméret, szabálytalan alakú és heterodiszperz szemcsék), vagy olyan magyarázatot adtak, hogy a kötőhelyek kötése erősségének a diszperziója nagy. Értekezésemben megmutattam, hogy a tailing oka elsősorban a nemlineáris izoterma. Ennek megfelelően az optimalás fő céljaként az izoterma nemlinearitásának javítását kellene tekinteni. Érdekes módon ilyen javaslatról az irodalomban nem tudunk. A diszperzitást okozó tényezők javításával (pl.: szemcseméret, szemcsealak) sokat foglalkoztak, de munkám alapján érthető módon nem sok sikerrel. A kötőhelyek diszperzítésének csökkentésére irányuló törekvések pedig

önmagukban még nem elégségesek, hiszen ha csak egyféle kötőhely lenne a MIP-en, akkor is Langmuir izoterma megjelenését várnánk. A helyes cél tehát az lenne, hogy csak egyféle kötőhely legyen, de annak a koncentrációja az állófázison legyen nagyon nagy és a kötés erőssége (a Langmuir izoterma b paramétere) legyen viszonylag kicsi. Így elérhető lenne, hogy a Langmuir izotermának a lineáris szakaszán dolgozzunk viszonylag nagy oldatkonzentrációknál is. A linearitás feltétele ugyanis, hogy $b \cdot c \ll 1$, azaz $c \ll 1/b$, másrészt pedig az $a = b \cdot q_{\text{kötőhely}}$ összefüggés miatt, ha b kicsi, akkor $q_{\text{kötőhely}}$ -nek olyan nagyoknak kell lennie, hogy a lineáris megoszlási hányados kellő retenciót ($k > 1$) adjon az oszlopon.

6. Következtetések (tézisek)

1. Új, a konkrét izoterma ismeretétől független módszert dolgoztam ki annak vizsgálatára, hogy egy MIP kromatográfiás állófázisként az alkalmazás koncentrációtartományában nemlineáris viselkedést mutat-e.
2. Bizonyítottam, hogy a fenitoinra imprintelt, metakrilamid funkcionális monomerrel készült, módosított szilikagél - MIP kompozit nemlineáris állófázisként viselkedik. Korábban ezt csak egyetlen MIP-re igazolták, amely az általam használttól lényegesen eltérő funkcionális monomerrel, és egészen más templátra készült.
3. Általam előállított tömb illetve u.n. kompozit molekuláris lenyomatú polimerek kromatográfiás viselkedését tanulmányozva és azt modellszámításokkal összevetve megállapítottam, hogy a molekuláris lenyomatú polimerek jellemzésére használt kromatográfiás kísérleti adatok (pl.: k , α , IF) alkalmatlanok az egyes polimerek kvantitatív jellemzésére. Felismertem, hogy a MIP-ek kromatográfiás viselkedésének leírására általánosan használt paraméterek (pl. k , α , IF), amelyek a csúcsmaximum relatív pozíciójának meghatározásán alapulnak, olyan kísérleti paraméterektől is függenek, amelyek hatását az alkalmazók eddig nem írták le, így az oszlop hosszától és belső átmérőjétől.
4. Javaslatot tettem a MIP-ek közelítő jellemzésére a megoszlási hányadosokkal. Ez az adat ugyan koncentrációfüggő, viszont egyrészt modelfüggetlen, másrészt egy szűkebb koncentrációtartományban szemléletesen írja le a MIP viselkedését. Rámutattam, hogy a különféle templátokra készült MIP-ek között - azonos koncentrációtartományban - nagyságrendi különbségek lehetnek a megoszlási hányados tekintetében.
5. Rámutattam, hogy a szakirodalomban nagyon elterjedt nézettel szemben a MIP-ek kromatográfiás csúcsai tailingjének kiküszöböléséhez nem lenne elég a kötőhelyek sokak által megkísérelt homogénebbé tétele, hiszen az izoterma így is nemlineáris maradhatna.

6. Számítógépes szimulációval és kísérleti mérésekkel megmutattam, hogy a szokásos kromatográfiás körülmények között a versengés hatása jóval kevésbé jelentkezhet, mint egyensúlyi adszorpció esetén, amit például a versengő módszereknél használnak.
7. Megvizsgáltam a templát és más anyagok közti versengést kromatográfiás oszlopon, de nem a szokásos elúciós rendszerben, hanem az egyik anyagot konstans (nem nulla) koncentrációban áramoltatva. Modellszámításokkal összhangban azt tapasztaltam, hogy ilyenkor a versengés jobban észlelhető, mint a két anyag együttes injektálása esetén. Modellszámításokkal és kísérletekkel megmutattam, hogy ha a beinjektált minta a mérendő anyag mellett valamilyen versengő anyagot (pl.:vizet), a mérendő anyaghoz képest nagy koncentrációban tartalmaz, akkor a mérendő anyag csúcsa torzult alakot vehet fel.

7. Összefoglalás

Értekezésem tárgya a molekuláris lenyomatú polimerek vizsgálata, különös tekintettel azok analitikai alkalmazásaira.

A molekuláris lenyomatú polimerek (az angol szakkifejezés „molecularly imprinted polymers” közkeletű rövidítésével: MIP-ek) szelektív szorbensek. A szelektív adszorpciós képesség a gyakorlatban számos helyen alkalmazható, például a környezetvédelmi technológiákban, a különféle vegyipari technológiákban és az analitikai kémiában. Ennek megfelelően a MIP-ek iránt komoly érdeklődés mutatkozik. A MIP-ek adszorpciós izotermái általában nemlineárisak, még egészen kis koncentrációk esetén is. Ennek következményeit azonban a MIP-ekkel foglalkozó kutatók eddig szinte egyáltalán nem ismerték fel. Értekezésem fő tárgya ezen következmények vizsgálata.

Új, a konkrét izoterma ismeretétől független módszert dolgoztam ki annak vizsgálatára, hogy egy MIP kromatográfiás állófázisként nemlineáris viselkedést mutat-e. Bizonyítottam, hogy a fenitoinra imprintelt, metakrilamid funkcionális monomerrel készült szilikagél MIP kompozit nemlineáris állófázisként viselkedik. Ezzel általánosabb bizonyítást nyert, hogy a MIP-ek nemlineáris állófázisok. Megállapítottam, hogy a MIP-ek kromatográfiás viselkedésének leírására általánosan használt paraméterek (pl. k , α , IF), amelyek a csúcsmaximum relatív pozíciójának meghatározásán alapulnak, nemcsak a kölcsönható anyagok (MIP, eluens és minta) anyagi minőségétől függenek, hanem számos kísérleti paramétertől is, például a minta koncentrációjától, továbbá olyan paraméterektől, amelyek hatására az alkalmazók eddig nem is gondoltak, mint az oszlop hossza és belső átmérője. Így a korábban gyűjtött adatok legfeljebb csak durva összevetésekre alkalmasak.

A MIP-ek kromatográfiás alkalmazásainál sose számolnak be a templát és a tőle elválasztandó anyagok közti versengésről. Számítógépes szimulációval megmutattam, hogy a szokásos kromatográfiás körülmények között a versengés hatása valóban jóval kevésbé jelentkezik, mint egyensúlyi adszorpció esetén, amit a versengő módszereknél használnak.

8. Summary

The subject of my thesis is the investigation of molecularly imprinted polymers (MIP), in particular with respect to their analytical applications.

MIPs are selective sorbents. Selective adsorption is a practically useful property, e.g., in environmental technology, in chemical industry and in analytical chemistry. This explains the wideranging interest for MIPs.

The adsorption isotherms of MIPs are usually nonlinear even down to very low concentrations. The far reaching consequences of this nonlinearity have not been fully recognized yet. Some of the important consequences are being described in my thesis.

I have created and verified a novel experimental method for detecting the nonlinear chromatographic behavior of MIP stationary phases in the concentration range of their intended application. I have proved the nonlinear chromatographic behavior of a phenytoin imprinted MIP made with methacrylic amide functional monomer in the pores of a modified silica stationary phase.

I have proved both by experiments and by computer modeling that the characterization of MIPs by chromatographic experimental parameters like k , α and the imprinting factor (IF) is not appropriate. I have discovered that these parameters, which are all based on measuring the position of the peak maximum, show an unexpected dependence on apparently irrelevant experimental data like the length or inner diameter of the chromatographic column.

I have shown experimentally and by computer modeling that competition between coinjected analytes is much less discernible in MIP HPLC than in non-transient techniques like batch competitive binding assays or sensors.

9. Irodalomjegyzék

- [1] A. Berezki, Doktori értekezés, 2003.
- [2] M.V. Polyakov, Zhur. Fiz. Khim., (1931) 799.
- [3] F.H. Dickey, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1949) 227.
- [4] G. Wulff, in A. Sarhan, Angewandte Chemie, (1972), 364.
- [5] T. Takagishi, in K. I.M., Biopolymers, (1972), 483.
- [6] R. Arshady, K. Mosbach, Macromolecular Chemistry and Physics-Makromolekulare Chemie 182 (1981) 687.
- [7] L. Andersson, B. Sellergren, K. Mosbach, Tetrahedron Letters 25 (1984) 5211.
- [8] G. Vlatakis, L.I. Andersson, R. Muller, K. Mosbach, Nature 361 (1993) 645.
- [9] Analytica Chimica Acta, 591 (2007).
- [10] Bioseparation, 10 (2002).
- [11] Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 804 (2004).
- [12] Analyst, 126 (2001).
- [13] M. Komiyama, Molecular imprinting : from fundamentals to applications, Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
- [14] B. Sellergren, Molecularly imprinted polymers : man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry, Elsevier, Amsterdam ; New York, 2001.
- [15] K. Mosbach, K. Haupt, Journal of Molecular Recognition 11 (1998) 62.
- [16] E. Yilmaz, K. Mosbach, K. Haupt, Analytical Communications 36 (1999) 167.
- [17] E. Yilmaz, O. Ramstrom, P. Moller, D. Sanchez, K. Mosbach, Journal of Materials Chemistry 12 (2002) 1577.
- [18] O. Bruggemann, K. Haupt, L. Ye, E. Yilmaz, K. Mosbach, Journal of Chromatography A 889 (2000) 15.
- [19] A.G. Mayes, K. Mosbach, Analytical Chemistry 68 (1996) 3769.
- [20] R.J. Ansell, K. Mosbach, Journal of Chromatography A 787 (1997) 55.
- [21] Z.S. Liu, C. Zheng, C. Yan, R.Y. Ga, Electrophoresis 28 (2007) 127.
- [22] H. Aoki, N. Tanaka, T. Kub, K. Hosoya, Journal of Separation Science 32 (2009) 341.
- [23] H.F. Zou, X.D. Huang, M.L. Ye, Q.Z. Luo, Journal of Chromatography A 954 (2002) 5.
- [24] L. Idziak, A. Benrebouh, F. Deschamps, Analytica Chimica Acta 435 (2001) 137.
- [25] Q. Osmani, H. Hughes, K. Flavin, J. Hedin-Dahlstrom, C.J. Allender, J. Frisby, P. McLoughlin, Analytical and Bioanalytical Chemistry 391 (2008) 1229.
- [26] N.M. Maier, W. Lindner, Analytical and Bioanalytical Chemistry 389 (2007) 377.
- [27] J. Haginaka, H. Sanbe, H. Takehira, Journal of Chromatography A 857 (1999) 117.

- [28] J. Haginaka, Y. Sakai, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 22 (2000) 899.
- [29] J. Haginaka, Y. Sakai, S. Narimatsu, *Analytical Sciences* 14 (1998) 823.
- [30] M. Kempe, K. Mosbach, *Journal of Chromatography A* 664 (1994) 276.
- [31] J. Haginaka, H. Sanbe, *Journal of Chromatography A* 913 (2001) 141.
- [32] Z. Cobb, B. Sellergren, L.I. Andersson, *Analyst* 132 (2007) 1262.
- [33] W.M. Mullett, M. Walles, K. Levsen, J. Borlak, J. Pawliszyn, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 801 (2004) 297.
- [34] <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/supelmip.html>
- [35] E. Caro, R.M. Marce, F. Borrull, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, *Trends in Analytical Chemistry* 25 (2006) 143.
- [36] C. Chassaing, J. Stokes, R.F. Venn, F. Lanza, B. Sellergren, A. Holmberg, C. Berggren, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 804 (2004) 71.
- [37] P.D. Martin, G.R. Jones, F. Stringer, I.D. Wilson, *Analyst* 128 (2003) 345.
- [38] K. Moller, U. Nilsson, C. Crescenzi, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 811 (2004) 171.
- [39] F.G. Tamayo, J.L. Casillas, A. Martin-Esteban, *Analytica Chimica Acta* 482 (2003) 165.
- [40] L.I. Andersson, A. Paprica, T. Arvidsson, *Chromatographia* 46 (1997) 57.
- [41] A.G.V. de Prada, O.A. Loaiza, B. Serra, D. Morales, P. Martinez-Ruiz, A.J. Reviejo, J.M. Pingarron, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (2007) 227.
- [42] F. Lanza, B. Sellergren, *Chromatographia* 53 (2001) 599.
- [43] C. Nilsson, S. Nilsson, *Electrophoresis* 27 (2006) 76.
- [44] P. Spegel, L. Schweitz, S. Nilsson, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 6608.
- [45] L. Ye, P.A.G. Cormack, K. Mosbach, *Analytical Communications* 36 (1999) 35.
- [46] L. Ye, R. Weiss, K. Mosbach, *Macromolecules* 33 (2000) 8239.
- [47] E. Yilmaz, K. Haupt, K. Mosbach, *Angewandte Chemie-International Edition* 39 (2000) 2115.
- [48] L. Ye, P.A.G. Cormack, K. Mosbach, *Analytica Chimica Acta* 435 (2001) 187.
- [49] J. Svenson, I.A. Nicholls, *Analytica Chimica Acta* 435 (2001) 19.
- [50] M.T. Muldoon, L.H. Stanker, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (1995) 1424.
- [51] M. Siemann, L.I. Andersson, K. Mosbach, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (1996) 141.
- [52] L.I. Andersson, R. Muller, G. Vlatakis, K. Mosbach, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (1995) 4788.
- [53] H. Bengtsson, U. Roos, L.I. Andersson, *Analytical Communications* 34 (1997) 233.
- [54] L.I. Andersson, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 111.
- [55] L. Ye, I. Surugiu, K. Haupt, *Analytical Chemistry* 74 (2002) 959.
- [56] L. Ye, K. Mosbach, *Journal of the American Chemical Society* 123 (2001) 2901.
- [57] S. Marx, Z. Liron, *Chemistry of Materials* 13 (2001) 3624.
- [58] R.J. Ansell, K. Mosbach, *Analyst* 123 (1998) 1611.
- [59] C. Alexander, L. Davidson, W. Hayes, *Tetrahedron* 59 (2003) 2025.

- [60] D. ROBINSON, K. MOSBACH, *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* (1989) 969.
- [61] T. Takeuchi, J. Haginaka, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 728 (1999) 1.
- [62] T.A. Sergeeva, S.A. Piletsky, A.A. Brovko, E.A. Slinchenko, L.M. Sergeeva, T.L. Panasyuk, A.V. El'skaya, *Analyst* 124 (1999) 331.
- [63] K. Haupt, K. Mosbach, *Biochemical Society Transactions* 27 (1999) 344.
- [64] J.L. Suarez-Rodriguez, M.E. Diaz-Garcia, *Analytica Chimica Acta* 405 (2000) 67.
- [65] K. Haupt, K. Noworyta, W. Kutner, *Analytical Communications* 36 (1999) 391.
- [66] F.L. Dickert, P. Forth, P.A. Lieberzeit, G. Voigt, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 366 (2000) 802.
- [67] M. Jenik, A. Seifner, S. Krassnig, K. Seidler, P.A. Lieberzeit, F.L. Dickert, C. Jungbauer, *Biosensors & Bioelectronics* 25 (2009) 9.
- [68] M. Jenik, A. Seifner, P. Lieberzeit, F.L. Dickert, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394 (2009) 523.
- [69] M. Riskin, R. Tel-Vered, T. Bourenko, E. Granot, I. Willner, *Journal of the American Chemical Society* 130 (2008) 9726.
- [70] M. Riskin, R. Tel-Vered, O. Lioubashevski, I. Willner, *Journal of the American Chemical Society* 131 (2009) 7368.
- [71] X.B. Hu, Q. An, G.T. Li, S.Y. Tao, B. Liu, *Angewandte Chemie-International Edition* 45 (2006) 8145.
- [72] C. Baggiani, F. Trotta, G. Giraudi, G. Moraglio, A. Vanni, *Journal of Chromatography A* 786 (1997) 23.
- [73] G. Guiochon, S.G. Shirazi, A.M. Katti, *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*, Academic Press, Boston, 1994.
- [74] R.J. Umpleby, M. Bode, K.D. Shimizu, *Analyst* 125 (2000) 1261.
- [75] R.J. Umpleby, S.C. Baxter, M. Bode, J.K. Berch, R.N. Shah, K.D. Shimizu, *Analytica Chimica Acta* 435 (2001) 35.
- [76] R.J. Umpleby, S.C. Baxter, A.M. Rampey, G.T. Rushton, Y.Z. Chen, K.D. Shimizu, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 804 (2004) 141.
- [77] Y.B. Chen, M. Kele, P. Sajonz, B. Sellergren, G. Guiochon, *Analytical Chemistry* 71 (1999) 928.
- [78] Y.B. Chen, M. Kele, I. Quinones, B. Sellergren, G. Guiochon, *Journal of Chromatography A* 927 (2001) 1.
- [79] H.J. Kim, K. Kaczmarek, G. Guiochon, *Journal of Chromatography A* 1101 (2006) 136.
- [80] P. Sajonz, M. Kele, G.M. Zhong, B. Sellergren, G. Guiochon, *Journal of Chromatography A* 810 (1998) 1.
- [81] K. Miyabe, G. Guiochon, *Biotechnology Progress* 16 (2000) 617.
- [82] O.Y.F. Henry, D.C. Cullen, S.A. Piletsky, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382 (2005) 947.
- [83] S.A. Piletsky, E. Terpetschnig, H.S. Andersson, I.A. Nicholls, O.S. Wolfbeis, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 364 (1999) 512.
- [84] K. Haupt, *Reactive & Functional Polymers* 41 (1999) 125.
- [85] W.G. Dong, M. Yan, Z. Liu, G.S. Wu, Y.M. Li, *Separation and Purification Technology* 53 (2007) 183.

- [86] C. Baggiani, C. Giovannoli, L. Anfossi, C. Tozzi, *Journal of Chromatography A* 938 (2001) 35.
- [87] C.C. Hwang, W.C. Lee, *Journal of Chromatography A* 962 (2002) 69.
- [88] H. Hiratani, C. Alvarez-Lorenzo, *Biomaterials* 25 (2004) 1105.
- [89] J. Bastide, J.P. Cambon, F. Breton, S.A. Piletsky, R. Rouillon, *Analytica Chimica Acta* 542 (2005) 97.
- [90] J. Zhou, X.W. He, Y.J. Li, *Analytica Chimica Acta* 394 (1999) 353.
- [91] J. Zhou, X.W. He, *Analytica Chimica Acta* 381 (1999) 85.
- [92] D. Spivak, M.A. Gilmore, K.J. Shea, *Journal of the American Chemical Society* 119 (1997) 4388.
- [93] T. Pap, G. Horvai, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 804 (2004) 167.
- [94] C. Legido-Quigley, J. Oxelbark, E. De Lorenzi, A. Zurutuza-Elorza, P.A.G. Cormack, *Analytica Chimica Acta* 591 (2007) 22.

10. Saját publikációk jegyzéke

Idegen nyelvű, az értekezés témájához szorosan kapcsolódó cikkek:

B. Tóth, K. László, G. Horvai, Chromatographic behavior of silica–polymer composite molecularly imprinted materials, *J. Chromatogr. A* 1100 (2005) 60–67, IF:3,096

B. Tóth, T. Pap, V. Horvath, G. Horvai, Nonlinear adsorption isotherm as a tool for understanding and characterizing molecularly imprinted polymers *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 29–33, IF:3,554

B. Tóth, T. Pap, V. Horvath, G. Horvai, Which molecularly imprinted polymer is better?, *Anal. Chim. Acta* 591 (2007) 17–21, IF:3,186

Magyar nyelvű, az értekezés témájához szorosan kapcsolódó cikk:

Tóth Blanka, Pap Tímea, Horváth Viola, Horvai György, Molekuláris lenyomatú polimerek: kombinatorikus előállítás, nemlineáris kromatográfia és pszeudo-immunanalitika, *Magyar Kémiai Folyóirat* 111 (2005) 110-113

Idegen nyelvű, az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó cikkek:

F. Phillips, K. Kaczor, N. Gandhi, B. D. Pendley, R. K. Danish, M. R. Neuman, B. Toth, V. Horvath, E. Lindner, Measurement of sodium ion concentration in undiluted urine with cation-selective polymeric membrane electrodes after the removal of interfering compounds, *Talanta* 74 (2007) 255–264, IF:3,374

V. Horvath, B. Lorantfy, B. Tóth, J. Bogнар, K. Laszlo, G. Horvai, Preparation of terbutylazine imprinted polymer microspheres using viscous polymerization solvents, *Journal of Separation Science* 32 (2009) 3347-3358, IF:2,551

11. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Horvai Györgynek, akitől rengeteget tanultam, és aki nagyon sok segítséget nyújtott a kísérleti munka kezdetétől egészen az értekezés befejezéséig.

Szeretném megköszönni Dr. Pap Tímeának a sok segítséget a laboratóriumi munka elsajátításában. Dr. Horváth Violának köszönettel tartozom türelméért és segítőkészségéért. A Farmakokinetikai csoport volt és jelenlegi munkatársainak: Dr. Egresi Andreának, Zsebi Zoltánnak, Giorgio Ceolinnak köszönöm, hogy biztosították a kellemes munkakörnyezetet.

Szeretném megköszönni Dr. Szőke Éva Professzor Asszonynak a Gyógyszerésztudományi Doktori Iskola vezetőjének, hogy ösztöndíjat biztosított számomra, ezzel segítve munkámat. Hálával tartozom Tóth Lenkének, a Semmelweis Egyetem Farmakognóziai Intézetéből, hogy a doktori eljárással kapcsolatos ügyintézésben segítségemre volt.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Pokol György dékán úrnak, hogy lehetővé tette, hogy a Budapest Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszékén végezzem munkámat.

Szeretném megköszönni a segítségét mindazoknak, akik kísérleti munkámat segítették: Dr. László Krisztinának, aki a nitrogénadszorpciós méréseket végezte és értelmezésükben segített, Dr. Marthi Katalinnak, aki az elektronmikroszkópos és az elektronsugaras mikroanalízises méréseket végezte, Dr. Ohmacht Róbertnek, aki a kromatográfiás oszlopok megtöltésében nyújtott szakszerű segítséget.

Végül szeretném megköszönni családomnak a támogatást, amit nyújtottak.