

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

**Imidazólium-alapú ionfolyadékok szerepe az analitikai
kémiai elválasztások hatékonyságában**

PhD értekezés

Farkas Emerencia

Témavezetők

Dr. Makszin Lilla

egyetemi adjunktus

Fenyvesiné Dr. Páger Csilla

egyetemi adjunktus



Pécs, 2024

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke (angolul és magyarul)	5
1 Bevezetés	7
2 Irodalmi áttekintés	8
2.1 Az ionfolyadékok általános jellemzése	8
2.1.1 Az ionfolyadékok mint „zöld” oldószerek.....	9
2.1.2 Az imidazólium-alapú ionfolyadékok: szerkezet és tulajdonságok	10
2.2 Az imidazólium-alapú ionfolyadékok alkalmazási lehetőségei az analitikai kémia területén.....	12
2.2.1 Imidazólium-alapú ionfolyadékok alkalmazása kapilláris elektroforézisben.....	13
2.2.2 Imidazólium-alapú ionfolyadékok alkalmazása a gázkromatográfia területén.....	17
3 Célkitűzések	28
4 Anyagok és módszerek	30
4.1 Kapilláris zónaelektroforézis módszerfejlesztés.....	30
4.1.1 Felhasznált anyagok.....	30
4.1.2 Kapilláris zónaelektroforézis kísérletek.....	31
4.1.3 Statisztikai elemzés.....	31
4.2 Gázkromatográfias-tömegspektrometriás módszerfejlesztés	32
4.2.1 Felhasznált anyagok és GC oszlopok	32
4.2.2 GC-MS elemzés.....	33
4.2.3 Validálási eljárás.....	34
4.2.4 Molekulamodellőzés	35
4.3 A tenyésztési körülmények hatásának vizsgálata baktériumok és bakteriális endotoxinok zsírsavösszetételére gázkromatográfias-tömegspektrometriás módszerrel.....	35
4.3.1 Felhasznált anyagok.....	35
4.3.2 Felhasznált baktériumtörzsek	35

4.3.3 Baktériumtenyésztés	36
4.3.4 Endotoxinok kinyerése.....	36
4.3.5 Származékképzési eljárás.....	36
4.3.6 GC-MS elemzés.....	37
4.3.7 Validálási eljárás.....	38
4.3.8 Statisztikai elemzés.....	39
5 Eredmények.....	40
5.1 Imidazólium-alapú ionfolyadékok alkalmazása fehérjék elválasztására kapillaris zónaelektroforézis módszerrel.....	40
5.1.1 Modell fehérjék elválasztása ionfolyadékok jelenlétében	40
5.1.2 EOF kísérletek.....	45
5.1.3 Statisztikai elemzés.....	45
5.1.4 Valós minták elválasztása kapillaris zónaelektroforézis módszerrel.....	47
5.2 Az ionfolyadék kölcsönhatás szerepe zsírsav-metil-észterek elválasztásában – többszörösen telítetlen geometriai izomerek elválasztása GC-MS módszerrel	49
5.2.1 A zsírsav-metil-észterek retenciós viselkedése különböző polaritású oszlopok alkalmazásával	49
5.2.2 A kromatogramok értékelése	56
5.2.3 Az ionfolyadék-FAME kölcsönhatások.....	59
5.3 A tenyésztési körülmények hatásának vizsgálata baktériumok és bakteriális endotoxinok zsírsavösszetételére gázkromatográfiás-tömegspektrometriás módszerrel.....	61
5.3.1 Az ionfolyadék-alapú oszlopon történő elválasztás bemutatása	61
5.3.2 A kromatográfiás módszer értékelése.....	63
5.3.3 A baktériumok zsírsavprofilja	64
6 Eredmények értékelése	82
6.1 Az ionfolyadék komponenseket tartalmazó bevonat hatása fehérjék elválasztására kapillaris zónaelektroforézisben	82

6.2 A kapilláris zónaelektroforézis elválasztási mechanizmusa ionfolyadékok jelenlétében	85
6.3 A kapilláris zónaelektroforézis módszer alkalmazhatósága.....	86
6.4 Zsír-sav-metil-észterek elválasztási tulajdonságainak jellemzése eltérő polaritású GC oszlopok alkalmazásával.....	87
6.5 A tenyésztési körülmények hatása baktériumok és bakteriális endotoxinok zsír-savösszetételére GC-MS módszerrel.....	88
7 Összefoglalás.....	94
8 Summary	96
Mellékletek	98
Köszönetnyilvánítás	111
Irodalomjegyzék.....	112
Megjelent közlemények.....	129

Rövidítések jegyzéke (angolul és magyarul)

ANOVA	analysis of variance; varianciaanalízis
Apo-tf	apotransferrin; apotranszferrin
BAME(s)	bacterial acid methyl ester(s); bakteriális zsírsav-metil-észter(ek)
BGE	background electrolyte; pufferoldat
[bmim] ⁺	1-butyl-3-methylimidazolium cation; 1-butil-3-metil imidazólium kation
[bmim][BF ₄]	1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate; 1-butil-3-metil imidazólium tetrafluoro-borát
CE	capillary electrophoresis; kapilláris elektroforézis
CLA	conjugated linoleic acid; konjugált linolsav
Cyt c	cytochrome c; citokróm c
CZE	capillary zone electrophoresis; kapilláris zónaelektroforézis
ECL	equivalent chain length; ekvivalens lánc hossz
EI	electron impact; elektronütköztetési ionizáció
[emim][BF ₄]	1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate; 1-etil-3-metil imidazólium tetrafluoro-borát
EOF	electroosmotic flow; elektroozmotikus áramlás
FA(s)	fatty acid(s); zsírsav(ak)
FAME(s)	fatty acid methyl ester(s); zsírsav-metil-észter(ek)
FID	flame ionization detector; lángionizációs detektor
GC-MS	gas chromatography-mass spectrometry; gázkromatográfia-tömegspektrometria
IL(s)	ionic liquid(s); ionfolyadék(ok)
LCFA(s)	long chain fatty acid(s); hosszú szénláncú zsírsav(ak)
LOD	limit of detection; kimutatási határ
LOS(s)	lipooligosaccharide(s); lipooligoszacharid(ok)
LOQ	limit of quantification; meghatározási határ
LPS(s)	lipopolysaccharide(s); lipopoliszacharid(ok)/endotoxin(ok)
LSER	linear solvation energy relationship; lineáris szolvatációs energia kapcsolat
Lys	lysozime; lizozim

MANOVA	multivariate analysis of variance; többutas varianciaanalízis
MCFA(s)	medium chain fatty acid(s); közepes szénláncú zsírsav(ak)
MUFA(s)	monounsaturated fatty acid(s); egyszeresen telítetlen zsírsav(ak)
Myo	myoglobin; mioglobin
PHA(s)	polyhydroxyalkanoate(s); polihidroxi-alkanoát(ok)
PSAE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PSAE ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
PSAE PAO1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
PSAE PAO1 LPS(s)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 lipopolysaccharide; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 lipopoliszacharid (endotoxin)
PSAE PR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> polyresistant; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> polirezisztens
<i>P. Putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
PUFA(s)	polyunsaturated fatty acid(s); többszörösen telítetlen zsírsav(ak)
RSD	relative standard deviation; relatív standard deviáció
RTIL(s)	room temperature ionic liquid(s); szobahőmérsékletű ionfolyadék(ok)
SAFA(s)	saturated fatty acid(s); telített zsírsav(ak)
SCFA(s)	short chain fatty acid(s); rövid szénláncú zsírsav(ak)
SD	standard deviation; standard deviáció
VLCFA(s)	very long chain fatty acid(s); nagyon hosszú szénláncú zsírsav(ak)

1 Bevezetés

"Az ionfolyadékok (ILs) a kémiai sokoldalúság és fenntarthatóság ideális kombinációi (Walden, 1927.)." – nyilatkozta Paul Walden német származású kémikus és vezető szakértő az ionfolyadékok területén, amellyel kiválóan összefoglalta ezen anyagok széleskörű alkalmazhatóságának lehetőségét. Ezek a szobahőmérsékleten folyékony halmazállapotú, ionos összetételű anyagok rendkívül változatos szerkezeti egységekkel rendelkeznek, amelyek lehetővé teszik az eltérő karakterű, akár poláris, apoláris, amfifil, vagy ionos molekulákkal való kölcsönhatás kialakítását (Schröder, 2017.).

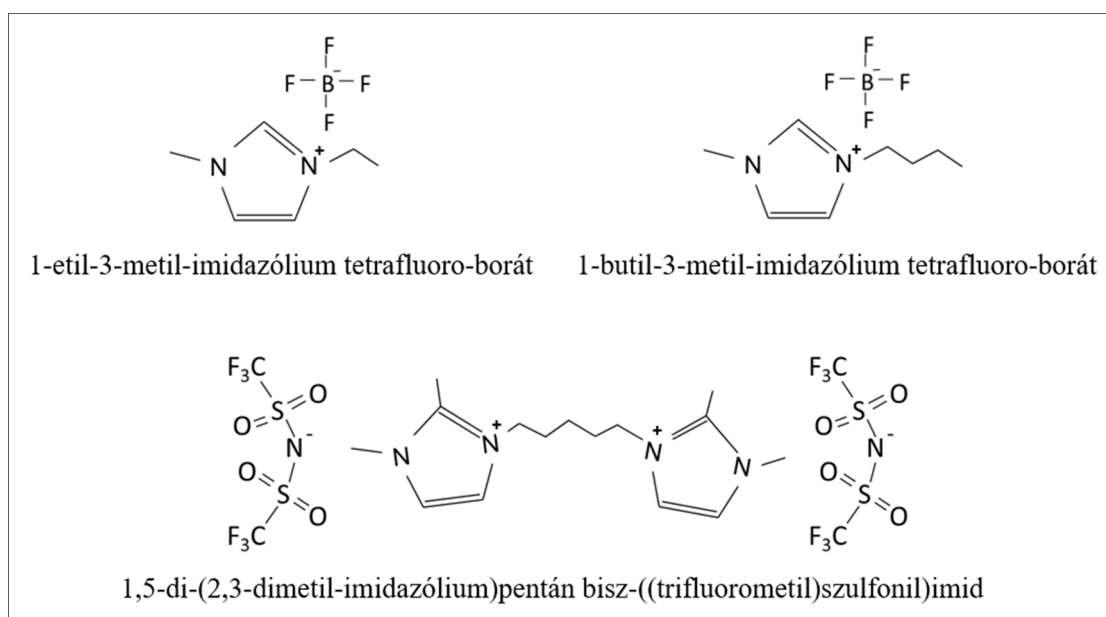
Jellemzően egy szerves kationból (mint az ammónium, imidazólium, piridinium, piperidinium vagy pirrolidinium) és egy halogenidből, vagy más szervetlen (esetleg fluorozott), vagy szerves anionból állnak. Manapság az egyik legáltalánosabban használt és tanulmányozott ionfolyadékok családját az imidazólium-alapú ionfolyadékok alkotják. Egyedülálló tulajdonságaik – mint az alacsony olvadáspont, elhanyagolható gőznyomás, nagy hőstabilitás, valamint jó oldékonyság – vonzó reagensekké teszik őket a kémia számos területén. Ily módon jelentős figyelem övezi alkalmazásukat az analitikai kémiai eljárásokban, azáltal, hogy lehetővé teszik az egyes vegyületek hatékonyabb elválasztását (Kowalski, Olędzka, Plenis, Roszkowska, & Bączek, 2023.).

A modern analitikai kémia egyik legnagyobb kihívása a komplex biológiai minták hatékony és megbízható elválasztása. Disszertációm célja az imidazólium-alapú ionfolyadékok felhasználásának bemutatása két jelentős kémiai elválasztási technikában: kapilláris zónaelektroforézisben (CZE) fehérjék elválasztása céljából és gázkromatográfiás-tömegspektrometriás (GC-MS) elemzésekben bakteriális eredetű zsírsavak tanulmányozására. Munkánk során nagy hangsúlyt fektetünk az egyes technikákban az ionfolyadékok alkalmazásával elérhető hatékonyságnövelés szemléltetésére. Az ionfolyadékok használata ugyanis több előnyt is kínál. Egyrészt, puffer komponensként alkalmazva és a kapilláris dinamikus bevonata által megakadályozhatják a komponensek kitapadását a kapilláris belső felületére és növelhetik az elektroforetikus elválasztások hatékonyságát. Másrészt, gázkromatográfiás állófázisként lehetővé teszik az oszlopok polaritásának és hatékonyságának szabályozását. Elképzeléseink alapján az ionfolyadékokkal kialakuló specifikus kölcsönhatások kulcsszerepet játszanak az analitikai kémiai eljárások hatékonyságának javításában. Munkánk során ezen folyamatok mélyebb megértésére tettünk kísérletet.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 Az ionfolyadékok általános jellemzése

Az ionfolyadékok az 1900-as évek elején tűntek fel, új perspektívát teremtve a kémia számos területén (Walden, 1914.). Fokozódó érdeklődést azonban a 2000-es évektől kezdődően váltottak ki környezetbarát természetük és sokoldalú alkalmazási lehetőségeik által. Szerkezetüket tekintve ionos összetételű anyagok, amelyek a sóknak egy alacsony olvadásponttal rendelkező csoportját alkotják. Ezt az alacsony olvadáspontot az alkotó ionok nagy térfogata és aszimmetriája eredményezi, mivel rendszerint egy nagyméretű nitrogéntartalmú kationból, mint az ammónium, imidazólium, piridinium, piperidinium, pirrolidinium; vagy egy foszfortartalmú kationból, mint a foszfónium, és egy hozzájuk gyengén koordinálódó halogenid, fluorozott vagy szerves anionból állnak. Az **1. ábra** a doktori munka során alkalmazott ionfolyadékok szerkezeti képletét mutatja be.



1. ábra A doktori munka során alkalmazott ionfolyadékok szerkezeti képlete

A hőmérséklet széles skáláján, 100 °C és annál alacsonyabb hőmérsékleteken folyadék halmazállapotot alakítanak ki, így általánosan csak olvadt sóknak, vagy szobahőmérsékletű ionfolyadékoknak (RTILs) nevezik őket (Soukup-Hein, Warnke, & Armstrong, 2009.). Számos lenyűgöző tulajdonsággal rendelkeznek, mint például elhanyagolható gőznyomás, jó kémiai és hőstabilitás, nem gyúlékonyak, valamint szerves és szervetlen oldószerekkel is jól elegyednek

(Tokuda, Hayamizu, Ishii, Susan, & Watanabe, 2004.). A felismerés, hogy egyes termodinamikai sajátosságok, mint az olvadáspont, viszkozitás, vezetőképesség, termikus és kémiai stabilitás az ionok felépítésétől függenek (Dzyuba & Bartsch, 2002.), lehetővé teszi új funkcionális anyagok tervezését, miszerint a kationok és anionok megfelelő megválasztásával személyre szabottan, speciális alkalmazások számára hozhatók létre különböző tulajdonságú ionfolyadékok. Ezenfelül az ionfolyadékokban a poláris és apoláris molekulareszkek együttesen vannak jelen, amely által olyan reakcióközegként történő alkalmazásuk is közkedvelt, ahol eltérő karakterű anyagok egyidejű oldása szükséges (Mandal, Sarkar, & Samanta, 2004.). Ebben az esetben a poláris molekulák a poláris részben oldódnak, amelybe kation és anion sorolható, míg az apoláris molekulák az alkiláncokkal lépnek kölcsönhatásba. Mindezek alapján nem meglepő, hogy az ionfolyadékok a legkülönbözőbb kémiai szintézisekben alkalmazhatók, csak néhány iparilag fontos példát említve: Friedel-Crafts (Xiao & Malhotra, 2005.), Heck (Bellina & Chiappe, 2010.) és Diels-Alder reakciók (Fischer, Sethi, Welton, & Woolf, 1999.). Rendkívül változatos felhasználási lehetőségük miatt igen ígéretesek továbbá a kémiai eljárások széles skálájában, mint az elválasztásban (Berthod, Ruiz-Angel, & Carda-Broch, 2008.), az elektrokémiában (Chakraborti & Roy, 2009.), vagy az ún. „zöld” kémiai alkalmazásokban (Welton, 2011.).

2.1.1 Az ionfolyadékok mint „zöld” oldószerek

Egyre nagyobb az igény olyan környezetbarát anyagok iránt, amelyek felválthatják a hagyományosan alkalmazott, egészségre és környezetre káros oldószereket. Az ionfolyadékok számos tulajdonságuknak köszönhetően zöld oldószereknek tekinthetők, amellyel fokozott érdeklődést váltanak ki a zöld kémia területén. Az emberi egészségre és környezetre gyakorolt hatásukat töretlenül vizsgálják, ugyanakkor környezetbarát természetük továbbra is vita tárgyát képezi (Flieger & Flieger, 2020.).

Nagy kémiai és termikus stabilitásuk, elhanyagolható gőznyomásuk és az ebből adódó rendkívül alacsony illékonyosságuk következtében ígéretes alternatívának számítanak a széles körben használt illékony szerves oldószerekkel szemben. Az ionfolyadékok hatékony visszanyerésére alkalmas technológiák kidolgozása folyamatos fejlesztés alatt áll, ily módon a használt ionfolyadékok mára már hatékonyan regenerálhatók. Számos szerző az ionfolyadékok hatékony újrafelhasználásáról számolt be néhány egymást követő ciklus után is (Abu-Eishah, 2011.). Újrahasznosításukhoz legáltalánosabban desztillációt, vagy ioncserélő gyantákat

alkalmaznak (Zhou, és mtsai., 2018.), de az elektrokémiai módszerek, mint az elektrolízis is alkalmasnak bizonyultak az ionfolyadékok visszanyerésére (Wang, Nie, Zhang, Zhang, & Li, 2012.). Az ionfolyadékok emellett az energiatárolásban és az energiatermelésben is használhatók, mint például lítium-akkumulátorokban (Balducci, 2017.), vagy energiatároló és átalakító rendszerekben (Watanabe, és mtsai., 2017.). Ezenfelül katalizátorként is hasznosíthatók, elősegítve a fenntarthatóbb kémiai folyamatokat (Welton, 2004.).

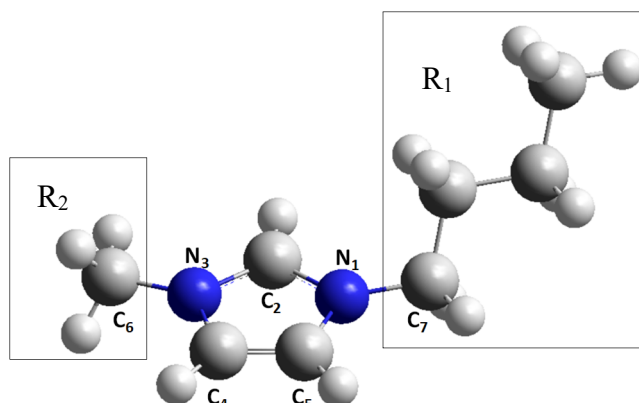
Fontos azonban megjegyezni, hogy az ionfolyadékok sem teljesen környezetbarátok. Smiglak és mtsai. számos imidazólium-, piridinium- és foszfónium-alapú ionfolyadék gyúlékony tulajdonságairól számoltak be (Smiglak, és mtsai., 2006.). Továbbá új eredmények születtek toxicitásukkal és nehézkes biológiai lebonthatóságukkal kapcsolatban. Bár jelenleg nincsenek adatok az emberi egészségre gyakorolt toxicitásukról, megfigyelték, hogy az ionfolyadékok mérsékelten mérgezőek lehetnek egyes mikroorganizmusokra és állatokra (Pham, Cho, & Yun, 2010.). Mások szerint vízdoldékonyságuk révén könnyen bejuthatnak a hidroszférába, ami növelheti a vízi környezet, és az ott élő szervezetek potenciális veszélyeztetettségét (Michalaki, Kakavas., Giannouli, & Grintzalis, 2023.). Nagy stabilitásuknak köszönhetően pedig biológiailag nehezen bonthatók le, így hosszú ideig fenn is maradhatnak ebben a környezetben (Arednarczyk, Zgórska, & Grabinska-Sota, 2011.). Ugyanakkor a fent felsorolt tulajdonságok alapján az ionfolyadékok vitathatatlanul kevésbé terhelik a környezetet az általánosan használt illékony oldószerekhez képest, az eredmények pedig felvetik az új, zöldebb ionfolyadékok tervezésének szükségességét.

2.1.2 Az imidazólium-alapú ionfolyadékok: szerkezet és tulajdonságok

Doktori munkámban imidazólium kation-alapú ionfolyadékokkal foglalkoztam, így a továbbiakban – ahol azt külön nem jelzem – ezen anyagokra vonatkozó eredményeket mutatom be.

Az imidazólium-alapú ionfolyadékok az egyik leggyakrabban használt és kutatott ionfolyadékok családját alkotják. Ezek az anyagok rendkívül változatos szerkezetet mutatnak a kationban található alkilcsoportok hosszúsága, valamint az anionok variációja szerint. Az imidazólium gyűrű nitrogénatomjaihoz kapcsolódó R_1 és R_2 alkilcsoportoktól függően az ionfolyadékok lehetnek protikus, vagy aprotikus jellegűek. Amennyiben az R_1 vagy R_2 hidrogénatom, protikus ionfolyadékról, abban az esetben pedig, amikor az egyes és hármas

számú nitrogénatomhoz egyaránt alkilcsoport, valamint a gyűrű kettes, négyes és ötös szénatomjaihoz hidrogénatomok kapcsolódnak, aprotikus ionfolyadékról beszélünk (**2. ábra**).



2. ábra Az 1-butil-3-metil-imidazólium-kation ($[\text{bmim}]^+$) molekulamodellje

Jelen munkában a $[\text{bmim}]^+$, $[\text{emim}]^+$ stb. jelölés használatos, ahol a hármas számú nitrogénatomhoz metil, az egyes számú nitrogénatomhoz pedig butil, etil, stb. alkilcsoport kapcsolódik.

Jelen tudásunk szerint az ionfolyadékok szerkezete a folyadékfázisban rendezettséget mutat, amelyet az ionok közötti ionos, valamint egyéb irányított kölcsönhatások tesznek lehetővé. Az imidazólium-alapú ionfolyadékok esetében a kölcsönhatások a kation és az anion közötti hidrogénkötésekre, valamint Coulomb (elektrosztatikus) kölcsönhatásokra épülnek (Ab Rani, és mtsai., 2011.). Protikus ionfolyadékok esetében a hidrogénkötéses hálózat a hangsúlyosabb, míg az aprotikus ionfolyadékoknál a folyadékfázist alkotó ionok egymással Coulomb-kölcsönhatás és hidrogénkötés mellett van der Waals kölcsönhatáson keresztül is kapcsolódnak (Anderson, Ding, Welton, & Armstrong, 2002.; Fumino, Wulf, & Ludwig, 2008.). NMR, IR és konduktometriás vizsgálatok mellett elméleti kémiai számítások egyaránt alátámasztották a hidrogénkötések jelenlétét az ionfolyadékok kationjai és az anionjai között (Dymek, Grossie, Fratini, & Adams, 1989.; Suarez, Einloft, Dullius, de Souza, & Dupont, 1998.). Huang és mtsai. megállapították (Huang, Chen, Sun, & Wang, 2001.), hogy a C_2 szénhez (**2. ábra**) kapcsolódó hidrogénatom részt vesz az anionnal kialakuló hidrogénkötésben tiszta, azaz társoldószer jelenléte nélkül, az $[\text{emim}][\text{BF}_4]$ ionfolyadékban. Hasonló eredmények születtek Suarez, valamint Lin és mtsai. által a $[\text{bmim}][\text{PF}_6]$ és $[\text{bmim}][\text{BF}_4]$ ionfolyadékok vizsgálata során (Lin, Ding, Chang, & Lue, 2004.).

Fontos továbbá megemlíteni egyes ionfolyadékok amfifil jellegét. Az ionfolyadékokban eltérő szerkezetű, poláris és apoláris tulajdonságú molekularészeket találunk, melyek további

hozzájárulást adnak a kialakuló folyadékszerkezethez (Schröder, 2017.). Sajátos tulajdonságokkal rendelkezik a hidrofób tulajdonságú alkil- vagy aromás csoportokat tartalmazó kationok és a hidrofil jellegű anionok kombinációja. Annak fényében, hogy a hosszú láncú ionfolyadékok felépítése hasonló a felületaktív anyagokéhoz, valamint felületaktív tulajdonságokkal is rendelkeznek, az ilyen ionfolyadékok vizes oldatban micellákat képezhetnek (Łuczak, Hupka, Thöming, & Jungnickel, 2008.; Schröder, 2017.).

Mindezek következtében az ionfolyadékok számos szerves és szervetlen anyag számára kiváló oldószerek (Pereiro, Araujo, & Esperanca, 2012.), amelyet változatos kölcsönhatásaik tovább fokoznak. A hidrogénkötések kialakítása során egyaránt viselkedhetnek proton donorként és akceptorként, továbbá a molekulán belül nagymértékű töltésdelokalizáció érvényesül (Melo, Rodrigues, & Bogel-Łukasik, 2012.). Ezen fontos jellemzőik mellett az ionfolyadékok más anyagokkal való kölcsönhatása során számos specifikus és nem specifikus kölcsönhatás is megfigyelhető, mint például van der Waals, dipól-dipól, diszperzív, π - π , n - π és elektrostatikus (Coulomb) kölcsönhatások (Freire, és mtsai., 2010.).

2.2 Az imidazólium-alapú ionfolyadékok alkalmazási lehetőségei az analitikai kémia területén

Az ionfolyadékok analitikai területen történő alkalmazása a napjainkban folyó kutatások egy igen aktív területe. Számos figyelemre méltó tulajdonsággal rendelkeznek (mint az alacsony illékonyosság, magas stabilitás, valamint a szerves és szervetlen oldószerekkel mutatott jó elegyedésük), ezenfelül a kationok és az anionok változtatásával a kémiai és fizikai tulajdonságaik speciális alkalmazások számára egyedileg hangolhatók. Ezek a tulajdonságok együttesen teszik őket alkalmazhatóvá számos kémiai területen.

Az ionfolyadékok analitikai kémiában való felhasználását illetően a közelmúltban végzett vizsgálatok a kromatográfia területén főként az ionfolyadék-funkcionalizált állófázisok kifejlesztésére összpontosultak. Sikeresnek bizonyultak állófázisként a gázkromatográfiában (Talebi, Patil, & Armstrong, 2020.) és a folyadékkromatográfiában (LC) (Zhou, és mtsai., 2020.), pszeudo-állófázisként a micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC) esetében (Niu, Qiu, Li, Liu, & Jiang, 2009.), valamint kapilláris elektroforézisben (CE) a kapillárisok felületének módosítására (Corradini, Nicoletti, & Bonn, 2009.). Ezenkívül közkedvelt oldószerként történő felhasználásuk mintaelőkészítési folyamatokban (Feng, és mtsai., 2020.), mátrix-segített lézer deszorpció/ionizációs tömegspektrometriában (MALDI-MS) és extrakciós eljárásokban (Abdelhamid, 2018.), királis szelektorként enantioszelektív

elválasztásban (Stavrou & Kapnissi-Christodoulou, 2013.), valamint mozgófázis adalékanyagként folyadékromatográfiás módszerek esetén (Lenca & Poole, 2017.).

2.2.1 Imidazólium-alapú ionfolyadékok alkalmazása kapilláris elektroforézisben

A kapilláris elektroforézis módszerek számos előnyük mellett főként kis mintaigényük, gyorsaságuk, valamint nagy elválasztási hatékonyságuk folytán egyre elterjedtebbek az elválasztástudományban. Számos felhasználási területen alkalmazhatók, mint például biomolekulák (aminosavak, peptidek, fehérjék, szénhidrátok, nukleinsavak), királis vegyületek, szervetlen ionok, szerves savak, sejtek és vírusok elválasztásában. A kapilláris zónaelektroforézis a leggyakrabban alkalmazott kapilláris elektroforetikus módszer. Az elválasztás alapja, hogy egy vékony, általában 25-75 μm belső átmérőjű, pufferoldattal (BGE) töltött kvarc kapillárisban elektromos erőtér hatására a mintakomponensek eltérő töltés/tömeg arányuk alapján különböző sebességgel vándorolnak, és diszkrét zónákba válnak szét. Az elkülönült zónák azonosítására leggyakrabban UV-látható fényabszorpciós detektort alkalmaznak.

A vándorló részecskék sebessége (v) egyenesen arányos az elektroforetikus mozgékonysággal (μ_e) és az elektromos térerővel (E). Az elektroforetikus mozgékonyság továbbá egyenesen arányos a részecske töltésével (q), valamint fordítottan arányos a részecske hidrodinamikai sugarával (r) és az oldat viszkozitásával (η). Az alkalmazott elektromos erőtér hatására tehát a különböző töltésű és méretű részecskék eltérő, de állandó sebességgel vándorolnak, így elkülöníthetők egymástól. Az összefüggések alapján látható, hogy a kisméretű, de nagy töltésű részecskék rendelkeznek a legnagyobb mozgékonysággal.

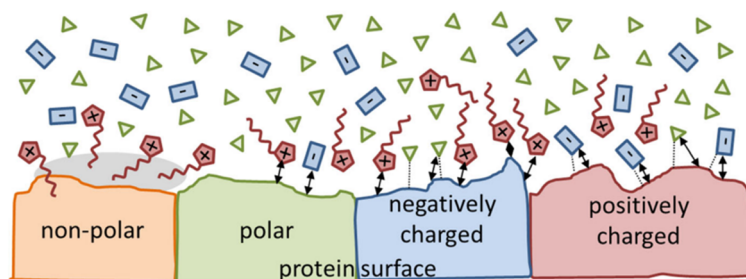
A kapillárison belül, a töltéssel rendelkező felület mentén, elektromos erőtér hatására az elektrolit oldatok elektrooszmotikus áramlása (EOF) alakul ki, amely a CE technikák működésének alapja. Az EOF a folyadékáram dugószerű profilját eredményezi, lehetővé téve az oldatban lévő valamennyi részecske egyidejű vizsgálatát. Általános esetben az EOF sebessége egy nagyságrenddel is nagyobb lehet, mint a komponensek vándorlási sebessége, így az összes részecskét, függetlenül azok töltésétől, azonos irányban, negatív töltésű kapilláris fal mellett, a negatív pólus (katód) felé szállítja.

Előfordulhatnak azonban olyan esetek is, amikor a kapilláris felületi töltésének megváltoztatására van szükség, hiszen az elválasztandó komponensek, mint például a fehérjék, hajlamosak lehetnek a kapilláris falára adszorbeálódni. Az elválasztani kívánt anyagok

kapilláris felületére történő adszorpciójának megakadályozására különféle módszerek használhatók. Korábbi eljárásokban alacsony pH-jú (McCormick, 1988.), vagy nagy ionerősségű puffereket alkalmaztak (Chen, Kelly, Palmieri, Biehler, & Schwartz, 1992.), de a legáltalánosabb megközelítés a kapilláris belső falának módosításán alapul (Hjertén, 1985.). A fedetlen szilícium-dioxid kapillárisfalon kovalens vagy nem kovalens kölcsönhatásokon alapuló bevonatot lehet létrehozni. Számos kutatócsoport beszámolt arról, hogy ionfolyadékok kovalensen kapcsolhatók a kapilláris belső falához, azzal tartósan módosítva a felületet (Qin & Li, 2002.; Qin, Wei, & Li, 2003.). A kovalens kapcsolat mellett dinamikus bevonat is létrehozható ionfolyadékok használatával, mely bevonat előnye az egyszerűbb kialakítás, és az így kapott kellően stabil felület (Jiang, Wang, & Lv, 2006.; Wu, Wei, Su, Xu, & Chen, 2008.; Corradini, Nicoletti, & Bonn, 2009.; Guo, Chen, Zhou, Wang, & Zhang, 2013.). Jelen ismereteink szerint az ionfolyadékok jelenléte az alkalmazott pufferoldatban egyrészt a kapilláris falán bevonat képződése révén megváltoztathatja az elektroosmotikus áramlás irányát, másrészt az elválasztandó komponensek és az ionfolyadékok között speciális kölcsönhatások alakulnak ki, így befolyásolva az elválasztást. Az ionfolyadékok alkalmazása vizes és nemvizes eljárásokban egyaránt sikeresnek bizonyult. Vaher és *mtsai.* dialkilimidazolium-alapú ionfolyadékokat használtak puffer komponensként nemvizes CE-ben, vízben oldhatatlan anyagok elválasztására (Vaher, Koel, & Kaljurand, 2001.), valamint hasonló ionfolyadékokat alkalmaztak karbonsavak, fenolos és polifenolos vegyületek elválasztására is (Vaher, Koel, & Kaljurand, 2002.; Vaher, Koel, & Kaljurand, 2002.). Eredményeik azt mutatták, hogy az acetonitril tartalmú közegben az elválasztás fő mechanizmusa az ionfolyadék-anion és a vizsgált molekula közötti heterokonjugáción alapul. Lu és *mtsai.* szintén nemvizes rendszerben választottak el aromás savakat, pufferként különböző aniont tartalmazó ionfolyadékok ([emim][Cl] és [emim][HSO₄]) alkalmazásával (Lu, Wang, Kong, Zhong, & Breadmore, 2014.), és eltérő migrációs sorrendet figyeltek meg az elválasztáshoz használt ionfolyadékok függvényében. Mindezek alapján a szerzők azt feltételezik, hogy az elválasztásban az ionfolyadékok anionjai és a vizsgálandó anyagok közötti heterokonjugáció játszik domináns szerepet. Yanes és *mtsai.* reprodukálható módszerről számoltak be a szőlőmag-kivonatokból izolált polifenolos vegyületek azonosítására, imidazolium-alapú ionfolyadékok puffer komponensként történő felhasználásával (Yanes, Gratz, Baldwin, Robison, & Stalcup, 2001.). Az ionfolyadékok egyaránt meghatározó szerepet töltenek be a fehérje elválasztások során, azon belül is az eljárás hatékonyságának növelésében.

2.2.1.1 Fehérjék elválasztása

Az ionfolyadékok és fehérjék között intermolekuláris kapcsolatok jöhetnek létre, amelyek hidrogénkötésen, hidrofób- és elektrosztatikus kölcsönhatásokon alapulnak. A kapilláris bevonó képességükön túl ezek a tulajdonságok teszik az ionfolyadékokat kiváló puffer komponensekké fehérjék CE elválasztásában, ezenfelül számos tanulmány szerint hozzájárulnak a fehérje elválasztás hatékonyságának és szelektivitásának növeléséhez (Corradini, 2023.; Kowalski, Olędzka, Plenis, Roszkowska, & Bączek, 2023.; Hajba & Guttman, 2024.). Fontos azonban megjegyezni, hogy az ionfolyadékok befolyásolhatják a fehérjék 3D szerkezetét, stabilizálhatják, vagy éppen destabilizálhatják azt (Shukla & Mikkola, 2020.). Az ionfolyadék tartalmú oldatokban a fehérjék stabilitását és aktivitását több tényező is befolyásolja, mint például az ionfolyadék-anion természete (Noritomi, Minamisawa, Kamiya, & Kato, 2011.), az ionfolyadék-kationokban található alkilcsoportok hossza (Machado, és mtsai., 2014.), valamint az ionfolyadékok egyéb fizikai-kémiai tulajdonságai (Gao, Zhang, Zhang, & Zhou, 2015.). Egy nemrégiben végzett tanulmány kimutatta, hogy az imidazólium-alapú felületaktív ionfolyadékok módosíthatják a lizozim enzim aktivitását, szerkezetét és stabilitását, és az IL-lizozim kölcsönhatás az ilyen típusú ionfolyadékok összetételétől és koncentrációjától függ (Rather, Dar, Singh, Rather, & Bhat, 2020.). Bár a kutatások szerint az ionfolyadékok anionjai erősebb hatást gyakorolnak a fehérjék stabilitására, mint a kationok (Todinova, 2016.; Diddens, 2017.), szimulációs vizsgálatok kimutatták, hogy vizes közegben a kationok koncentrációja általánosan meghaladja az anionokét a fehérjék felületén, függetlenül azok töltésétől (Klahn, Lim, Seduraman, & Wu, 2011.; Haberler, Schröder, & Steinhauser, 2012.). Ennek hátterében egyrészt a tömbfázis anionokból és vízmolekulákból álló hidrogénkötéses hálózata állhat, másrészt a kationok jelentős mobilitása a nempoláris és poláris jellegű fehérjefelületeken. A **3. ábra** a fehérje-oldószer kölcsönhatásokat mutatja be imidazólium-alapú ionfolyadékok esetében vizes közegben.



3. ábra A fehérje és az oldószer molekulák között kialakuló kölcsönhatások bemutatása, ahol a vörös az imidazólium kationt, a kék az aniont, a zöld a vízmolekulát jelöli. (Schröder, 2017.) (A pontozott vonal a hidrogénkötéseket, a szürke terület a diszperziós kölcsönhatásokat, a nyilak a Coulomb-kölcsönhatásokat mutatják)

Az ionfolyadék–fehérje (Harada, és mtsai., 2018.; El-Hady & Albishri, 2018.), valamint a víz–ionfolyadék–fehérje (Smiatek, 2017.; Schröder, 2017.; Saha & Mukherjee, 2018.) kölcsönhatások kísérleti és elméleti vizsgálatait számos összefoglaló tanulmány ismerteti. A víz–ionfolyadék–fehérje rendszerek tanulmányozására irányuló számítási vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy az ionfolyadék-anionokkal való kölcsönhatásokat főként a Coulomb-erők és a hidrogénkötések uralják, az ionfolyadék-kationokkal kialakuló kölcsönhatások Coulomb- és diszperziós kölcsönhatásokból állnak, a vízmolekulák pedig Coulomb-kölcsönhatásokkal és hidrogénkötésekkel kapcsolódnak a fehérjék megfelelő tulajdonságú részeihez (Klahn, Lim, Seduraman, & Wu, 2011.; Haberler, Schröder, & Steinhauser, 2012.).

Az imidazólium-alapú ionfolyadékokat széles körben alkalmazzák fehérjék vizes közegben végrehajtott CE elválasztásai során, mind puffer adalékként, mind pedig a kapillárisok bevonására. Erre vonatkozóan Jiang és mtsai. 1-alkil-3-metil-imidazólium-alapú ionfolyadékokkal bevont szilika kapillárisok alkalmazását írták le bázikus fehérjék vizsgálatában (Jiang, és mtsai., 2003.), ahol az ionfolyadékok 30-110 mM koncentrációjú vizes oldatait használták pufferoldatként. Ilyen körülmények között anód irányú EOF alakult ki, és valamennyi komponens alapvonal-elválasztása nagy hatékonysággal valósult meg. A szerzők az elválasztás mechanizmusát a fehérjék és a kapilláris falán lévő, illetve az oldatban található szabad imidazólium-ionok közötti asszociációval írták le. Hasonló eredmények születtek Wu és mtsai. által, akik 1-butil-3-metil-imidazólium tetrafluoro-borát ionfolyadékot használtak a kapillárisfal bevonására, valamint puffer komponensként bázikus és savas fehérjék CE elválasztására (Wu, Wei, Su, Xu, & Chen, 2008.). A 10 mM koncentrációjú pufferoldat alkalmazásával, anód irányú EOF mellett, a fehérjék kiváló elválasztását érték el. A bevonat

létrehozásakor továbbá azt találták, hogy a kialakult bevonat legalább 120 órán keresztül stabil volt, anélkül, hogy a futtatások között regenerálásra lett volna szükség. Corradini és *mtsai.* szintén 1-alkil-3-metil-imidazólium tetrafluoro-borát ionfolyadékokat alkalmaztak a kapilláris bevonása során, valamint puffer adalékanyagként bázikus fehérjék CE elválasztására (Corradini, Nicoletti, & Bonn, 2009.). Az elválasztásokat 4,0 pH-jú acetát puffer oldattal végezték, ionfolyadékok hozzáadása nélkül, illetve ionfolyadékok felhasználásával 0,2-6,0 mM koncentrációban. Az ionfolyadék-alapú kapilláris bevonat a korábbiaktól eltérő módon katód irányú EOF-t eredményezett, javítva a csúcsok alakját és felbontását a bevonat nélkül kapott eredményekhez képest. Megállapították, hogy a fehérjék és az imidazólium-kation közötti hidrofób kölcsönhatások fontos szerepet játszanak a fehérjék elektromigrációs viselkedésében. Guo és *mtsai.* szintén bázikus fehérjék sikeres elválasztásáról számoltak be katód irányú EOF mellett, pirrolidinium-alapú ionfolyadék kis koncentrációban való alkalmazásával puffer adalékanyagként a 40 mM koncentrációjú, 4,0 pH-jú foszfát pufferhez (Guo, Chen, Zhou, Wang, & Zhang, 2013.). A kutatók feltételezik, hogy az ionfolyadékok hidrogénkötéseket és elektrosztatikus kölcsönhatásokat alakítanak ki a kapillárisfal felületével, míg a fehérjék esetében hidrogénkötések, ion-dipól/ion-indukált dipól kölcsönhatások és hidrofób kölcsönhatások lépnek fel, befolyásolva a szelektivitást és a felbontást a fehérje elválasztások során.

2.2.2 Imidazólium-alapú ionfolyadékok alkalmazása a gázkromatográfia területén

A gázkromatográfia a termikusan stabil, illékony, szerves és szervetlen vegyületek elválasztására, minőségi és mennyiségi meghatározására alkalmas módszer. Széles körben alkalmazható, többek között szénhidrogének, növényvédőszer, környezetszennyező anyagok, élelmiszerek, valamint gyógyszerek összetételének meghatározására. Amellett, hogy a módszer hatékony és kevés mintát igényel, a minta komponensei nem károsodnak az elválasztás során, ami lehetővé teszi azok további vizsgálatát kapcsolódó technikákkal, például tömegspektrométerrel.

A gázkromatográfiában a mozgófázis egy inert gáz (vivőgáz), míg az állófázis lehet folyadék, vagy szilárd halmazállapotú. Az eljárás során a minta gőz formában kerül bevezetésre a kapilláris oszlopba/kolonnába, ahol a folyamatosan áramló vivőgáz hajtja előre a komponenseket. Más kromatográfiás eljárással szemben, itt a mozgófázis nem lép

kölcsönhatásba a mintával, a komponensek az állófázissal történő kölcsönhatásuk erősségének fordított sorrendjében jelennek meg a detektorban, lehetővé téve azok azonosítását és mennyiségi meghatározását.

Gázkromatográfiában az egyik legelterjedtebb detektor típus a lángionizációs detektor, valamint a tömegspektrométerrel kapcsolt technikák. Az elválasztott komponensek detektorjel-idő függvénye a kromatogram, melynek főbb jellemzői a retenciós idő (t_R : a minta adagolásától számítva az adott komponens maximális koncentrációjának megjelenéséig eltelt idő), valamint a csúcs alatti terület. Előbbi a minőségi, utóbbi pedig a mennyiségi adatokat szolgáltatja. A GC-MS kapcsolt technikában a mintakomponensek elválasztását a gázkromatográf végzi, míg a tömegspektrométer a detektor szerepét tölti be. A mai modern GC kapilláris oszlopok (0,25-0,35 mm belső átmérő) esetében az optimális áramlási sebesség 1-2 ml/perc, amit az MS vákuumrendszere már hatékonyan kezel. Ennek köszönhetően a két készülék közvetlenül összekapcsolható. A tömegspektrométerben az elkülönült komponensekből ionok képződnek, amelyek fajlagos tömegük (tömeg/töltés) alapján elválaszthatók egymástól, csökkentett nyomás, elektromos vagy mágneses mezők segítségével. Az elválasztott ionok intenzitásának folyamatos mérésével egy ionáram intenzitás - fajlagos tömeg függvényt, azaz tömegspektrumot kapunk, amely a minőségi meghatározás alapja.

A gázkromatográfiás eljárások hatékonyságában az elválasztási körülmények közül az oszlop tulajdonságai kulcsszerepet játszanak. Az elválasztás a hagyományos polimer állófázisok esetén, mint a polisziloxán, vagy polietilén-glikol, főként az elválasztani kívánt vegyületek és állófázisok közötti gőznyomás és polaritás különbség eredménye, viszont ez gyakran korlátozza az elválasztás hatékonyságát és az egydimenziós gázkromatográfiában kihasználható kémiai kölcsönhatásokat. Ezenkívül a többdimenziós eljárásoknál hatékonyan alkalmazható állófázisok száma, - ahol legalább két oszlopot alkalmaznak az elválasztható (és ideálisan azonosítható) vegyületek számának növelésére - szintén korlátozott a rendelkezésre álló oszlopok közötti szelektivitáskülönbség hiánya miatt. E korlátozások leküzdéséhez további egyéb kölcsönhatások szükségesek az állófázis és az elválasztandó anyagok között. Az újfajta ionfolyadék-állófázisok célja, hogy lehetőséget biztosítsanak a gázkromatográfia új elválasztási mechanizmusainak.

2.2.2.1 Az ionfolyadék-alapú gázkromatográfiás oszlopok bemutatása

Az ionfolyadék-alapú állófázisok a gázkromatográfiás oszlopoknak egy új, nagy hőstabilitású és polaritású osztályát képviselik. Az ilyenfajta oszlopok használata különösképp

azokban az esetekben lehet előnyös, amikor az elválasztáshoz nagy polaritású állófázis és magas hőmérséklet szükséges. Továbbá egyes izomerek jobb felbontását is eredményezhetik, amelyek a hagyományos állófázisok alkalmazásával eddig nehézségekbe ütköztek. Bár ezekben a kutatásokban elsősorban zsírsav-metil-észterek (FAMES) elválasztására fókuszáltak (Zeng, és mtsai., 2013.), az ionfolyadék-alapú oszlopok igen népszerűek még illóolajok (Cagliero, és mtsai., 2017.), klórozott szénhidrogének és peszticidek (de Boer, Blok, & Ballesteros-Gómez, 2014.) elválasztásában is.

2008-tól kezdődően kiváló elválasztási tulajdonságokkal rendelkező di- és trikationos ionfolyadék-alapú oszlopok kerültek kereskedelmi forgalomba (Sigma Aldrich, 2014.). Ezek az oszlopok főként nitrogén és foszfor tartalmú kationokon alapulnak, és az SLB-IL mozaikszóval, valamint az egyedi, McReynolds konstansok (McReynolds, 1970.) alapján meghatározott polaritásszámmal azonosítják őket (pl. SLB-IL59, SLB-IL60, SLB-IL61, SLB-IL76, SLB-IL82, SLB-IL100 és SLB-IL111). Ezenfelül 2016-ban kifejlesztették az új generációs, rendkívül inert oszlopokat, amelyeket a három leggyakrabban alkalmazott ionfolyadék (SLB-IL60i, SLB-IL76i és SLB-IL111i) felhasználásával hoztak létre. Ugyan már 1959-től történtek próbálkozások különböző ionfolyadékok GC állófázisként való alkalmazására (Barber, Phillips, Tusa, & Verdin, 1959.), azonban ezek az állófázisok alacsony hatékonyságot és gyenge termikus stabilitást mutattak, amely korlátozta gyakorlati felhasználásukat. A di- és trikationos ionfolyadékok viszont olyan egyedi tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek rendkívül hasznosak GC állófázisként való alkalmazásukra. Ezek az ionfolyadékok nagyobb hőstabilitást mutatnak, mint a hagyományos polimer állófázisokat tartalmazó oszlopok (Patil R. A., Talebi, Sidisky, & Armstrong, 2017.), továbbá jól nedvesítőek, amely elősegíti a borítatlan falú szilika oszlopok bevonását (Armstrong, He, & Liu, 1999.). Nagy viszkozitásuk elősegíti az ionfolyadék-bevonat fenntartását, még a különösen magas hőmérséklet alkalmazása mellett is (Patil R. A., Talebi, Xu, Bhawal, & Armstrong, 2016.), alacsony illékonyságuk pedig hozzájárul az ilyen körülmények között gyakran jelentkező oszlopvérzés („bleeding”) minimalizálásához (Patil R. A., Talebi, Sidisky, Berthod, & Armstrong, 2018.). Az ionfolyadék-alapú állófázisok a kölcsönhatások széles skáláját képesek kialakítani az elválasztandó anyagokkal (Anderson, Ding, Welton, & Armstrong, 2002.). Kettős természetüknél fogva egyedülálló elválasztást biztosítanak mind a poláris, mind az apoláris molekulák számára az összetett mintákban (Armstrong, He, & Liu, 1999.; Sun & Armstrong, 2010.).

Az ionfolyadék-töltetű GC oszlopok teljesítménye és szelektivitása sokak érdeklődését felkeltette, és számos közlemény vizsgálta különböző alkalmazási lehetőségeiket.

Általánosságban a GC állófázisok kölcsönhatásainak megértésére és az állófázisok jellemzésére különböző próba vegyületeket alkalmaznak. Erre jó példa a Rohrschneider és McReynolds által kifejlesztett módszer (McReynolds, 1970.), amely során öt „informatív” próba vegyület retenciós viselkedését hasonlítják össze különböző állófázisok alkalmazásával. A próba vegyületek közé tartozik a benzol a π - π kölcsönhatások, az 1-butanol a hidrogénkötés donor és akceptor kölcsönhatások, a 2-pentanon a gyenge hidrogénkötés akceptor és dipól kölcsönhatások, a nitropropán a poláris kölcsönhatások és a piridin a bázikus vagy erős hidrogénkötés-akceptor kölcsönhatások vizsgálatára. Az IL-állófázisok átlagos polaritását az öt próba vegyület McReynolds-állandójának összegeként kapjuk. A Rohrschneider–McReynolds megközelítés hátránya, hogy mindössze öt próba vegyületet használ az ionfolyadékok kölcsönhatásainak leírására.

Ezzel szemben Abraham egy szolvatációs paraméter modellt tervezett az oldott anyag és az oldószer molekulák közötti folyadék- vagy gázfázisban létrejövő kölcsönhatások jellemzésére (Abraham M. H., 1993.). A lineáris szolvatációs energia kapcsolat (LSER) néven ismert modell különböző próba vegyületeket használ, amelyek számos kölcsönhatás kialakítására képesek, így lehetővé téve az állófázisok átfogó jellemzését (Abraham, Poole, & Poole, 1999.; Abraham, Ibrahim, & Zissimos, 2004.). Az LSER modellben a többféle próba vegyület használata széleskörű információt nyújt az elválasztandó anyagok és az IL állófázisainak kölcsönhatásairól. A modell különböző fázisállandókat használ, amelyek azt mérik, hogy az állófázis képes-e kölcsönhatásba lépni a vizsgálandó anyaggal π vagy nem kötő elektronpárok, dipól-dipól kölcsönhatások, diszperziós erők, vagy a hidrogénkötés savassága/bázikussága, azaz a hidrogénkötés donor/akceptor hajlama révén. A proton donor/akceptor hajlam lényegesen eltérő lehet a különböző ionfolyadékok esetében, amely szükségessé teszi a protonaktivitás megértését és szabályozását az ionfolyadékok különféle alkalmazásaiban, ahol az oldott anyagok vagy a folyamatok nagyon érzékenyek a közegben lévő protonaktivitásra. MacFarlane és *mtsai*. (MacFarlane, és *mtsai*., 2010.) hidratált ionfolyadékok tulajdonságait írták le, amelyeknek belső protonpufferelő hatásuk van, és ezáltal képesek szabályozni a protonaktivitást ionos közegben. Ez azt jelenti, hogy ezek az ionfolyadékok önmagukban képesek szabályozni és stabilizálni a pH-t, külső pufferanyagok hozzáadása nélkül. A pufferhatás az ionfolyadékokat felépítő anionok és kationok, valamint ezek sav-bázis konjugátumai között lezajló sav-bázis reakciók révén jönnek létre. Ismert továbbá, hogy az ionfolyadékok hidrolízise során keletkező egyensúlyi termékek is hozzájárulnak az ionfolyadék-víz rendszerek pufferhatásához (Cui, és *mtsai*., 2010.). Az ionfolyadékok ezen tulajdonsága lehetővé teszi, hogy az oldat protonaktivitása (pH-ja) viszonylag állandó

maradjon, még akkor is, ha savat vagy bázist adunk hozzá, egészen addig a bizonyos mértékig, amikor az oldat erősen savas vagy bázikus állapotba kerül.

Az IL-állófázisok esetén általánosságban a dipolaritás, a hidrogénkötés bázikusság és a diszperziós kölcsönhatások dominálnak. A diszperziós erők értékei közel állandónak bizonyultak az összes kereskedelmi forgalomban kapható IL állófázisnál, valamint alacsonyabbak, mint az apoláris tulajdonságú polisziloxán-alapú állófázisoké (Weber & Andersson, 2014.). Az SLB-IL sorozat összes állófázisa hasonló dipolaritás értéket mutatott, csupán az SLBIL-100 esetén mértek valamivel magasabb értéket (Weber & Andersson, 2014.). Az SLB-IL állófázisok esetében a hidrogénkötés savassága a polaritás növekedésével általánosan növekedik (kivéve az SLB-IL59-et).

Az ionfolyadék-alapú állófázisok retenciós viselkedésének, elválasztási hatékonyságának és szelektivitásának vizsgálatára egyaránt közkedvelt a különböző funkciós csoportokkal rendelkező, eltérő polaritású vegyületekből álló tesztkeverékek elemzése. Ilyen keverékek például a zsírsav-metil-észterek izomer keverékei, vagy a poláris és apoláris vegyületekből álló keverékek (Breitbach & Armstrong, 2008.; Payagala, és mtsai., 2008.). Az oszlopok szelektivitásának értékelésére az ekvivalens lánchossz (ECL) a legelterjedtebb módszer, amely a telítetlen zsírsav-metil-észterek retencióján alapul (Talebi, Patil, Sidisky, Berthod, & Armstrong, 2018.). Az ECL egy bevált módszer a FAME-komponensek relatív retenciós idejének jellemzésére a telített FAME komponensek retenciójával történő összehasonlítás alapján. Egy telítetlen FAME ECL értéke kiszámítható két telített FAME komponens retenciós idejének felhasználásával, amelyek közrefogják a telítetlen FAME csúcsát. Az értékek meghatározása lehetővé teszi a különböző állófázisok szelektivitásának összehasonlítását, átfedési mintáinak értékelését, hiszen azokat a komponenseket, amelyek elválasztása során az ECL értékük közötti különbség kevesebb, mint 0,05 egység, kromatográfiai szempontból átfedőnek tekintjük. A telítetlen zsírsavak ECL értékeinek becslése továbbá elősegíti az ismeretlen szerkezetek lehetséges értelmezését. Az ECL-értékek szignifikáns növekedést mutatnak az oszlop polaritásának növekedésével az IL oszlopok esetében, különösen a többszörösen telítetlen FAME-k esetében (Zeng, és mtsai., 2013.; Lin, Wasta, & Mjøs, 2014.; Talebi, Patil, Sidisky, Berthod, & Armstrong, 2018.). Továbbá a kereskedelemben kapható oszlopok közül a legnagyobb ECL értékekkel rendelkező, rendkívül poláris SLB-IL111 kivételes szelektivitást nyújt a telítetlen FAME-k elválasztására.

2.2.2.2 Zsír-sav-metil-észterek vizsgálata

A zsírsavak (FAs) sokrétű biológiai szerepet töltenek be az élő szervezetben. Alapvető építőkövei a foszfolipideknek és a glikolipideknek, ezáltal a sejtmembránok fontos összetevői, energiaraktározó molekulák és az eikozanoidok prekursorai, amelyek hormonként és intracelluláris hírvivőként is működnek. Figyelemreméltó szerkezeti sokféleséget mutatnak, szerkezetük szerint a következő osztályokba sorolhatók: telített zsírsavak (SAFAs), egyszeresen telítetlen (MUFAs) és többszörösen telítetlen (PUFAs) *cisz-transz* konfigurációjú zsírsavak, elágazó láncú zsírsavak (*izo* és *anteizo* formák), hidroxizsírsavak és ciklikus, vagy más néven ciklopropán-zsírsavak. A zsírsavak továbbá szénatomszámuk alapján is megkülönböztethetők, előfordulnak 6-nál kevesebb szénatomot tartalmazó rövid láncú zsírsavak (SCFAs), 7-12 szénatomos közepes láncú zsírsavak (MCFAs), 13-21 szénatomos hosszú láncú zsírsavak (LCFAs) és 22-24 szénatomos nagyon hosszú láncú zsírsavak (VLCFAs).

Az esszenciális zsírsavak tanulmányozása egyre növekvő érdeklődésnek örvend, köszönhetően az emberi táplálkozásra és egészségre gyakorolt relevanciájuknak. Az élettani szempontból legnagyobb jelentőségű többszörösen telítetlen zsírsavak, 18, 20 vagy 22 szénatomot és 2-6 kettős kötést tartalmaznak. Az n-3 esszenciális zsírsav C18:3n-3 (α -linolénsav), az n-6 esszenciális zsírsav C18:2n-6 (linolsav), valamint metabolitjaik, a C22:6n-3 (dokozaheksaénsav) és a C20:4n-6 (arachidonsav) kiemelkedő fontosságúak a zsírsav-elemzésekben különféle biológiai hatásuk miatt, mint a gyulladásos folyamatok befolyásolása (Calder, 2001.), valamint a neuro- és kardiovaszkuláris védelem nyújtása (Landgraf-Leurs, és mtsai., 1990.; Endo & Arita, 2016.). Továbbá a konjugált linolsav (CLA) izomerek vizsgálata egyaránt különös érdeklődésre tart számot az utóbbi években, mivel ezek a lipidfrakció minor komponenseiként jelennek meg, valamint megtalálhatók a hús- és tejtermékekben (Grinari, és mtsai., 2000.; Delmonte, és mtsai., 2011.; Delmonte, és mtsai., 2012.). A növényi olajok részleges hidrogénezése során a CLA-kon kívül a linolsav több konstitúciós és geometriai izomerje is képződik, melyek közül a C18:2n-6 izomerek jelentős mennyiségben található meg a margarinban és más étkezési zsírokat tartalmazó termékekben (Ratnayake & Pelletier, 1992.). Az esetleges élettani hatások miatt az Európai Unióban intenzív szabályozást vezettek be az élelmiszerekben található *transz*-zsírok minimalizálására (< 2 g/100 g zsír) (Zuchowska-Grzywacz & Kowalska, 2019.). Ehhez kapcsolódóan Baylin és mtsai. azt találták (Baylin, Kabagambe, Siles, & Campos, 2002.), hogy a teljes *transz*-zsírsav bevitel legalkalmasabb

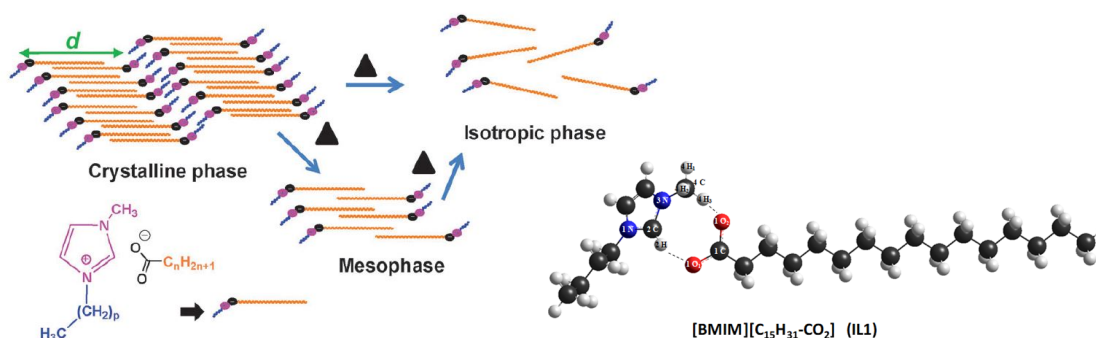
mutatói a C18:2n-6ct (cisz,transz-9,12-oktadekadiénsav), valamint a C18:2n-6tc (transz,cisz-9,12-oktadekadiénsav) zsírsavak.

A változatos szénatomszámú és telítettségű zsírsavak vizsgálata, hasonló szerkezetük miatt gyakran nehézségekbe ütközik. A lángionizációval (FID) vagy MS detektálással kombinált gázkromatográfia nagy kromatográfiás felbontást biztosít, így ez a legelterjedtebb technika a zsírsavak meghatározására (Delmonte, és mtsai., 2011.; Delmonte, és mtsai., 2012.). Általánosságban zsírsavakat a gázkromatográfiás vizsgálatok előtt metil-észter formába alakítják át, amelynek célja a karboxilcsoportok polaritásának csökkentése, valamint illékonyosságuk növelése a molekulák között fellépő erős intermolekuláris kölcsönhatások csökkentésével, ami ezzel együtt a zsírsavak forráspont csökkenéséhez is vezet. A kapott zsírsav-metil-észterek nagy stabilitással rendelkeznek, amely gázkromatográfiával hatékonyan és mennyiségileg elemezhető. A gyártói ajánlások alapján a *cisz/transz* izomerek hatékony elválasztásához nagy polaritású állófázisokat, az omega-3 zsírsavak meghatározásához közepes polaritású állófázisokat javasolnak, míg az apoláris oszlopok alkalmazását a különböző lánchosszúságú komponensek átfedésének elkerülésére ajánlják (David, Sandra, & Vickers, 2005.).

Az elmúlt években a zsírsav-metil-észterek elválasztására a különböző polaritású és nagy hőstabilitású ionfolyadék-állófázisú GC-oszlopok kerültek bevezetésre, a hagyományosan alkalmazott polisziloxán- és polietilén-glikol-alapú oszlopok alternatívájaként. Fanali és *mtsai.* által végzett szakirodalmi áttekintés (Fanali, Micalizzi, Dugo, & Mondello, 2017.) részletesen bemutatja az IL-alapú oszlopok széleskörű alkalmazását zsírsav-metil-észterek analízisében. A feldolgozott munkákban az SLB-IL111 rendkívül poláris oszlopot sikeresen használták különböző eredetű tejzsírok (Delmonte, és mtsai., 2012.; Gomez-Cortes, Rodriguez-Pino, Juarez, & de La Fuente, 2017.; Yurchenko, és mtsai., 2018.), olajok (mint lenmagolaj (Gomez-Cortes, Brenna, Lawrence, & de La Fuente, 2016.), halolaj (Fardin-Kia, és mtsai., 2013.), vagy különféle étkezési olajok (Guo, és mtsai., 2017.)) és gyorséttermi minták (Tyburczy, és mtsai., 2012.) zsírsav-összetételének meghatározására. Továbbá az SLB-IL111 oszlopot alkalmazták *cisz/transz* egyszeresen telítetlen zsírsavak C14:1-től C20:1-ig történő elválasztására (Delmonte, és mtsai., 2011.). Az ionfolyadék-alapú oszlopok és további, kereskedelemben kapható oszlopok (SP-2560 és CP-Sil88) teljesítményének összehasonlítása során azt találták, hogy a polisziloxán és polietilén-glikol állófázisokhoz képest az ionfolyadék állófázisok a FAME-k jobb elválasztását mutatták a C16, C18 és C20 régiókban és a konjugált linolsav izomer régiókban. Zeng és *mtsai.* zsírsav-metil-észterek elúciós viselkedését vizsgálta számos kereskedelemben kapható foszfónium- és imidazólium-alapú ionfolyadék kapilláris oszlop,

valamint az apoláris jellegű SLB-5ms polimer oszlop alkalmazásával (Zeng, és mtsai., 2013.). Az oszlopok jellemzésére a lineáris szolvatációs energia kapcsolat megközelítést alkalmazták a zsírsav-metil-észterek ECL indexei alapján. Kimutatták, hogy a legerősebb kölcsönhatás a π -elektronokat tartalmazó vegyületekkel (mint pl. a FAME elektronban gazdag kettős kötése) az SLB-IL111 állófázis esetében jön létre.

Ezenkívül az ionfolyadékok és zsírsavak kölcsönhatásaira vonatkozóan Biswas és *mtsai.* (Biswas, Dule, Samanta, Ghosh, & Mandal, 2014.) munkája alapján következtethetünk, ahol különböző lánc hosszúságú zsírsav-anionokat és imidazólium-kationokat tartalmazó ionfolyadékok sorozatát állították elő, és az ionok közötti kölcsönhatásokat számításon alapuló módszerekkel vizsgálták meg. Azt találták, hogy a zsírsav-anion lánc hosszának csökkenésével a molekulák rétegekbe rendeződnek az ionfolyadék ionos összetevői között létrejövő, túlnyomórészt elektrosztatikus kölcsönhatások miatt. A rétegekben belül az alkotó ionok továbbá hidrofób (lanc-lanc) kölcsönhatások és hidrogénkötések révén kapcsolódnak egymáshoz (4. ábra).



4. ábra Az imidazólium-kationok és zsírsav-anionok között kialakuló kölcsönhatások szemléltetése (Biswas, Dule, Samanta, Ghosh, & Mandal, 2014.)

Emellett Jing és *mtsai.* (Jing, Lan, Qiu, & Zhu, 2016.) metil-imidazólium-alapú ionfolyadékok és lipid kettősréteg mint modell sejtmembrán kölcsönhatásait vizsgálták fluoreszcens képalkotás, fény- és röntgenszórási technikák alkalmazásával. Az ionfolyadékok és a lipid kettősréteg között létrejövő erős hidrofób kölcsönhatás a [mim]-kationok beépüléséhez vezetett a kettősrétegbe, és a kettősréteg duzzadását okozta. Az ionfolyadék koncentrációját tovább növelve, a lipid kettősréteg felbomlása következett be, ami ionfolyadék-lipid micellák képződéséhez vezetett a vizes közegben. Hasonló eredmények születtek az ionfolyadék-ionok és a lipid kettősréteg interakcióinak molekuladinamikai szimulációk által végzett vizsgálataiban során, ahol azt találták, hogy a kationok spontán beépülnek a lipid

kettősrétegbe, függetlenül az alkyllánc hosszától (Bingham & Ballone, 2012.; Lim, Jaenicke, & Klahn, 2015.). A hidrophil anionok, mint például a kloridion, hajlamosak szabadon diszpergálni a vizes környezetben, míg a jelentősen hidrofób bisz(trifluoro-metán-szulfonil)imid aniont tartalmazó ionfolyadékok esetében mind a kation, mind az anion beépült a lipid kettős rétegbe.

2.2.2.3 Baktériumok zsírsav-összetételének vizsgálata

A baktériumok többsége sejtfalszerkezetük alapján besorolható a Gram-pozitív, vagy Gram-negatív csoportokba (Gram, 1884.). A Gram-pozitív baktériumok sejtfalának elsődleges összetevője a peptidoglikán, mely vastag réteggént nyújt védelmet a baktériumok számára, de tartalmaznak továbbá teikolsav- és lipoteikolsav-láncokat is, amelyek a sejtekhez történő adhézióért felelősek (ez elengedhetetlen a fertőzés kialakulásához). A Gram-negatív sejtfal szerkezete a Gram-pozitívéhoz képest lényegesen összetettebb. A Gram-negatív baktériumok külső felületét úgynevezett lipopoliszacharid (LPS, endotoxin), vagy lipooligoszacharid (LOS) jellegű makromolekulák borítják (Lukácová, Barák, & Kazár, 2008.), amelyeket az endotoxikus tulajdonságú foszfolipid részük (lipid A) köt a Gram-negatív baktériumok külső sejtmembránjához, míg az antigén tulajdonságú O-poliszacharid egységük az intercelluláris térbe nyúlik (Lüderitz, és mtsai., 1982.). Ez a külső felület megvédi a baktériumot az antimikrobiális szerektől, valamint a gazdaszervezetben való megtapadásban, illetve a fertőzőképességben is szerepet játszik.

A minőségi és mennyiségi zsírsavösszetétel meghatározás több mint 60 éve jelent hatékony eszközt a mikroorganizmusok megkülönböztetésére (Abel, Schmertzing, & Peterson, 1963.). A teljes celluláris zsírsav-tartalom, a baktériumprofil, közvetlen és stabil expressziója a sejtgénomnak. A bakteriális zsírsavakat ennél fogva rendszeresen használják rendszertani besorolásokhoz, valamint azonosítási célokra (Nguyen, és mtsai., 2023.; Carrasco, Roldán, Valenzuela-Ibaceta, & Lagos-Moraga, 2024.). A zsírsavak elsősorban a citoplazmatikus membránban helyezkednek el mint a foszfolipidek és glikolipidek alkotóelemei, továbbá a Gram-pozitív baktériumok sejtfalának lipoteikolsav összetevőiben, valamint a Gram-negatív baktériumok külső membránjának lipopoliszacharid régiójában. A bakteriális endotoxinok zsírsavakból és szénhidrátláncokból épülnek fel, melyek közül a zsírsavak típusa és mennyisége határozza meg toxikus aktivitásukat.

Ismert, hogy különböző környezeti tényezők, mint a hőmérséklet és a pH, a baktériumok bioszintézisét befolyásolják (Kropinski, Lewis, & Berry, 1987.; Akulava, és mtsai., 2024.). A szerkezetváltozások nyomán követésére a membrán lipidek és a hozzájuk kapcsolódó zsírsavak

alkalmas biomarkerek lehetnek, mivel ezek minden élő sejt nélkülözhetetlen alkotóelemei, nagy szerkezeti sokféleséggel és magas biológiai specifitással rendelkeznek. A zsírsav-analízisekre legáltalánosabban a gázkromatográfiát, illetve ennek tömegspektrometriával kapcsolt technikáját alkalmazzák, mely gyors, reprodukálható és hatékony eszközt kínál a baktériumokban végbemenő változások felderítéséhez (Abel, Schmetzing, & Peterson, 1963.; Moss & Dees, 1975.; Hoffmann, Fischer, & Whittaker, 2010.; de Santana-Filho, és mtsai., 2012.).

A *Pseudomonas* egyike a legtöbbet vizsgált és orvosi szempontból fontos baktériumnemzetségnek, mivel különféle fajaik jelentős hatással vannak a közegészség állapotára. A *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, PSAE) és a *Pseudomonas putida* (*P. putida*) Gram-negatív patogén baktériumok, amelyek a fluoreszcens *Pseudomonas* törzsek tagjai. A *P. aeruginosa* súlyos légúti és húgyúti nozokomiális fertőzéseket okoz, és az egyik legelterjedtebb kórokozó az ilyen típusú betegségekben. A *P. putida* gyakran felelős a katéterrel összefüggő véráramfertőzésért, továbbá okozhat még epeút gyulladást, epehólyag gyulladást, tüdőgyulladást vagy húgyúti fertőzéseket. Az endotoxinok kettős biológiai hatással rendelkeznek, egyfelől az immunrendszer általános serkentői, másfelől nagy mennyiségben a véráramba kerülve az immunrendszer túlterhelődhet és szepszist, vagy szeptikus sokkot is okozhatnak.

Számos tanulmányban kimutatták, hogy a bakteriális sejtmembrán zsírsavtartalma megváltozik a környezeti feltételek változásaira reagálva, mint például a hőmérséklet (Kropinski, Lewis, & Berry, 1987.; Akulava, és mtsai., 2024.), a pH (Russell, és mtsai., 1995.), az inkubációs idő (Mrozik, Labuzek, & Piotrowska-Seget, 2005.) változásai, vagy a táptalajban jelenlévő kémiai anyagok hatására (Mrozik, Piotrowska-Seget, & Labuzek, 2004.). Továbbá nagyszámú kísérlet történt a membrán zsírsav-összetételének változása és élettani jelentősége közötti kapcsolatok feltárására. Ma már azt feltételezik, hogy a zsírsav-összetétel befolyásolja a sejtmembrán fluiditását, rugalmasságát és permeabilitását. Zhang és Rock (Zhang & Rock, 2008.) átfogóan vizsgálta a bakteriális sejtmembrán zsírsav-összetételének változása által kiváltott hatásokat, és azt találták, hogy az egyenes láncú telített zsírsavak nagy merevségű és alacsony permeabilitású membrán kettősréteget hoztak létre. Továbbá megfigyelték azt is, hogy a *cisz*-telítetlen zsírsavak jelenléte a sejtmembránban nagyobb permeabilitást eredményezett. A tapasztalatok szerint az elágazó láncú zsírsavak a membrán fluiditását befolyásolják, így például az *anteizo*-zsírsavak fluidabb membránszerkezetet alakítanak ki, mint az *izo*-zsírsavak. A ciklopropán-zsírsavak jelenléte csökkenti a sejtmembrán permeabilitását (Cronan & Luk, 2022.), a többszörösen telítetlen zsírsavak pedig fontosak a membrán fluiditásának

fenntartásában (Sanderson, 2013.). Segura és *mtsai*. (Segura, Duque, Mosqueda, Ramos, & Junker, 1999.) vizsgálatukban rámutattak, hogy a kedvezőtlen körülmények hatására kialakuló hosszú és rövid szénláncú zsírsavak arányának változása szerepet játszik a membrán fluiditásának szabályozásában. Megállapították, hogy a hosszú szénláncú zsírsavak magasabb aránya megakadályozhatja a szennyező anyagok/toxikus vegyületek/antibiotikumok membránba való bejutását. A *cisz*-telítetlen zsírsavak megfelelő *transz* konfigurációba való átalakulását szintén kimutatták a környezeti változásokra adott válaszként, amely a sejtmembrán gyors merevségéhez vezet (Eberlein, Baumgarten, Starke, & Heipieper, 2018.). A különböző környezeti „stresszek” a bakteriális endotoxinokban is idézhetnek elő változásokat, amelyek a baktérium biofilmjének kialakulásához vezethetnek (Eberlein, Baumgarten, Starke, & Heipieper, 2018.). Chao és *mtsai*. a *P. aeruginosa* baktérium biofilmjének, valamint planktontenyészetek zsírsavprofiljának összehasonlítása során bemutatta, hogy az egyes zsírsavosztályok aránya hogyan befolyásolja a sejtmembrán tulajdonságait (Chao, Wolfaardt, & Arts, 2010.). A korábbi eredményektől eltérően azt figyelték meg, hogy a biofilmekben található telített zsírsavak arányának, illetve a zsírsavak lánchosszának csökkenése, kevésbé merev membránszerkezetet eredményezett. Akulava és *mtsai*. 74 darab, hideg környezetből izolált és különböző hőmérsékleten tenyésztett baktérium lipid- és általános sejtbiokémiai profilját vizsgálták, valamint a hőmérséklet által kiváltott változásokat tanulmányozták (Akulava, és *mtsai*., 2024.). Eredményeik azt mutatják, hogy a hőmérséklet-ingadozások változásokat idéznek elő a sejtek lipidjeiben, amely kiterjed a teljes lipidtartalomra, a zsírsavösszetételre és a lipidosztályok felépítésére is. Ezenkívül számottevő módosulásokat figyeltek meg a baktériumok további sejtkomponenseiben is, mint például a fehérjékben. A szerzők a változásokat taxonómia-specifikusnak tekintik, azaz bár a baktériumok sejt szerkezete hasonló, mégis eltérő módon reagálnak az egyes hőmérsékletváltozásokra, és gyakran különböző kémiai reakciókat mutatnak a környezeti feltételek változásaira.

3 Célkitűzések

A PhD munka elsődleges célja az imidazólium kation-alapú ionfolyadékok alkalmazása olyan kapilláris zónaelektroforézis, valamint gázkromatográfiás elválasztástechnikai módszerek kidolgozásában, amelyekkel elsősorban fehérjék és zsírsavak minősége és mennyisége határozható meg különféle eredetű biológiai mintákból (humán könny, tojásfehérje, bakteriális sejtmembrán). Célul tűztük ki továbbá azon folyamatok átfogó leírását, amelyek során az ionfolyadékok hozzájárulnak az analitikai kémiai elválasztások hatékonyságnöveléséhez.

Munkánk során tehát a következő célokat tűztük ki:

1. Imidazólium-alapú ionfolyadékok vizes elegyeinek alkalmazása pufferoldatként, illetve a kapillárisfal bevonásához, bázikus fehérjék (citokróm c, lizozim, miogloblin, tripszin, apo-transzferrin) elválasztására kapilláris zónaelektroforézis módszerrel. Az elválasztási paraméterek, mint az alkalmazott feszültség, az ionfolyadék típusa, a pufferoldat pH-ja és koncentrációja, valamint a kapilláris hossz optimalizálása. A kidolgozott módszer statisztikai értékelése, valamint alkalmazhatóságának igazolása biológiai minták (tojásfehérje és humán könny) fehérjeösszetételének meghatározásával. Az ionfolyadékkal töltött kapillárisban megvalósuló elválasztás mechanizmusának bemutatása.

2. Különböző töltetű és polaritású gázkromatográfiás oszlopok (apoláris tulajdonságú HP-5MS és közepes/magas polaritású DB-225MS polisziloxán-alapú oszlopok, valamint rendkívül magas polaritású ionfolyadék-alapú SLB-IL111 oszlop) elválasztási szelektivitásának vizsgálata változatos szénatomszámú és telítettségű zsírsav-metil-észterek hatékony megkülönböztetése céljából. Az optimális mérési paraméterek kidolgozása egy C4–C24 szénatomszámú, változatos szerkezetű, telített, többszörösen telítetlen (2–6 kettős kötést tartalmazó), *cisz/transz*-, omega-3, 6-zsírsav-metil-észter standard keverékre vonatkozóan. A kidolgozott módszer megbízhatóságának és pontosságának igazolása statisztikai elemzés és validáció révén. Az ionfolyadék-alapú oszlop elválasztási hatékonyságának háttérben álló kölcsönhatások bemutatása.

3. Az extrém poláris ionfolyadék-alapú SLB-IL111 oszlop zsírsav-metil-észterek meghatározásában mutatott kiváló elválasztási tulajdonságait figyelembe véve (2. pont), az oszlop felhasználása baktériumok és bakteriális endotoxinok zsírsavösszetételének külső hatások által bekövetkező változásainak nyomon követésére. Az eltérő hőmérséklet, táptalaj,

valamint inkubációs idő hatásának vizsgálata a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó baktériumok és bakteriális endotoxinok zsírsavösszetételére GC-MS módszerrel. Az optimális mérési paraméterek kidolgozása, a módszer validálása és statisztikai értékelése. A zsírsavösszetételben bekövetkező változások bakteriális sejtmembrán tulajdonságaira gyakorolt hatásának bemutatása.

4 Anyagok és módszerek

4.1 Kapilláris zónaelektroforézis módszerfejlesztés

4.1.1 Felhasznált anyagok

A vizsgálatokhoz az 1-etil-3-metil-imidazólium tetrafluoro-borát ([emim][BF₄]) (≥ 98%, Alfa Aesar, Kandel, Németország) és 1-butil-3-metil-imidazólium tetrafluoro-borát ([bmim][BF₄]) (≥ 97%, Sigma Aldrich, Steinheim, Németország, és Saint Louis, MO, USA) ionfolyadékokat; a lizozim (lys; csirke tojásfehérje; ≥ 90%; 14,3 kDa), lizozim (humán; 17,0 kDa), albumin (csirke tojásfehérje; ≥ 98%; 44,3 kDa), citokróm c (cyt c; lószív; ≥ 95%; 12,4 kDa), miogloblin (myo; lószív; ≥ 90%; 17,0 kDa), tripszin (try; szarvasmarha hasnyálmirigy; 23,8 kDa) és apo-transzferrin (apo-tf; humán; ≥ 98%; 76–81 kDa) (Sigma Aldrich, Steinheim, Németország, és Saint Louis, MO, USA) fehérje standard-eket; valamint az acetont (99,9% HPLC tisztaságú), nátrium-hidroxid és foszforsav (85%) (Sigma Aldrich, Steinheim, Németország, és Saint Louis, MO, USA) oldószereket használtuk.

Első lépésben 10 mg/ml koncentrációjú fehérje törzsoldatokat készítettünk desztillált víz segítségével. A mérésekhez felhasznált mintákat a fehérje törzsoldatokból állítottuk elő úgy, hogy az oldatban mindegyik fehérje végső koncentrációja 1 mg/ml legyen. A csirke tojásfehérjét liofilizáltuk, majd desztillált vízzel 4 mg/ml koncentrációjú oldatot készítettünk és felhasználás előtt centrifugáltuk. A humán könnymintákat ugyanazon személytől gyűjtöttük. Mind a tojásfehérje, mind a könnymintákat 4 °C-on tároltuk. A humán, illetve tojásfehérje eredetű lizozim LOD értékeinek meghatározására szolgáló kalibrációt 250-2000, valamint 125-2000 µg/ml koncentrációtartományban, a megfelelő lizozim standard-ek felhasználásával végeztük.

Az ionfolyadékokból 400 mM koncentrációjú törzsoldatokat készítettünk desztillált víz felhasználásával. A törzsoldatok hígításával 25 és 125 mM koncentrációtartományban oldatokat készítettünk. A két ionfolyadék a vizsgált koncentrációtartományban teljes mértékben elegyedett vízzel, és tiszta, áttetsző oldatokat kaptunk. A törzsoldat pH értéke azonban kezdetben csökkent, majd 10 nap eltelte után változatlan maradt és a koncentrációtól függően 1,5 és 2,7 közötti, stabil pH érték volt mérhető (MacFarlane, és mtsai., Ionic liquid “buffers”— pH control in ionic liquid systems, 2010.). Ezen keverékek viszkozitását és vezetőképességi paramétereit irodalmi adatokból határoztuk meg (Malham & Turmine, 2008.; Grishina, Ramenskaya, & Gruzdev, 2013.; Stoppa, Hunger, & Buchner, 2009.). Az IL-víz elegyeket a

kapillárisok előkezelésére, azaz a kapilláris belső felületének bevonására, valamint pufferként használtuk a CE kísérletekben. Összehasonlításképp pufferoldatnak 40 mM koncentrációjú foszfátpuffert (pH 2,2) is alkalmaztunk. Az EOF mérésekhez mintaként acetont használtunk, melyet desztillált vízben oldottunk fel 5-szörös hígításban.

4.1.2 Kapilláris zónaelektroforézis kísérletek

A CE-kísérleteket UV-detektorral felszerelt Agilent 7100 kapilláris elektroforézis készülékkel (Agilent Technologies, Waldbronn, Németország) végeztük. Az elválasztásokat a Polymicro Technologies-tól (Phoenix, AZ, USA) vásárolt kvarc kapillárisokban (fused silica, 50 μm i.d.) hajtottuk végre. A kapillárisok teljes hossza 51 és 96,5 cm között változott, ahol az effektív hossz minden esetben 8,5 cm-rel volt rövidebb a teljes hosszánál. A kapillárisokat a nap elején kondicionáltuk desztillált vízzel (5 perc), 0,1 M NaOH-dal (20 perc), majd újbóli desztillált vízzel (10 perc) történő mosással. A bevonat nélküli kapillárisokkal végzett kísérleteknél ezt követően a kapillárist a kívánt pufferoldattal mostuk. A bevonat elkészítésekor a kapillárist a megfelelő koncentrációjú (25 és 125 mM között) IL-víz eleggyel mostuk 30 percig. Injektálás előtt 5 perces mosást végeztünk a megfelelő koncentrációjú IL-víz eleggyel, hogy a kapillárist megtöltsük a megfelelő pufferoldattal. A mintákat 50 mbar nyomással 5 másodpercig injektáltuk. A mérések között a kapillárist desztillált vízzel 5 percig mostuk. Az alkalmazott feszültséget +10 és +20 kV között változtattuk anódos injektálás mellett, kivéve az EOF méréseket, amikor +18 vagy -18 kV feszültséget alkalmaztunk. Az elektroferogramokat 200 nm-en rögzítettük és a ChemStation szoftverrel (B. 04.00 és 7.01 verzió, Agilent Technologies) értékeltük ki. A kapilláriskazetta hőmérsékletét a mérések folyamán 20 °C-on tartottuk.

4.1.3 Statisztikai elemzés

A fehérjék vándorlási idejét, idő szerint korrigált csúcs alatti területeit és felbontási értékeit az SPSS 25.0 statisztikai szoftverrel dolgoztuk fel. Többutas varianciaanalízist (MANOVA) végeztünk a független változók függő változókra gyakorolt lehetséges szignifikáns hatásának meghatározására. A döntési szintet az $\alpha = 0,05$ esetén határoztuk meg, és a statisztikai elemzések során az eredményeket $p < 0,05$ teljesülése esetében tekintettük szignifikánsnak. A vándorlási időt, az idővel korrigált csúcs alatti területet és a felbontást függő változónak, míg

az alkalmazott feszültséget, az ionfolyadék típusát és az ionfolyadék koncentrációt független változónak tekintettük. Wilks-féle lambda indexet számítottunk, hogy meghatározzuk az elválasztási paraméterek lehetséges szignifikáns hatásait a vándorlási időre, az idővel korrigált csúcs alatti területre és a felbontásra. A csoportok (ionfolyadék típus; ionfolyadék koncentráció) összehasonlítására független mintás t-próbát alkalmaztunk. Az adatokat átlagként fejeztünk ki az elemzésekhez. A csúcsok közötti felbontásokat az $R = 2\Delta t / (w_1 + w_2)$ egyenlet alapján számítottuk ki, ahol Δt a migrációs idők különbsége, a w_1 és w_2 pedig a megfelelő szomszédos csúcsok alapvonalon vett szélessége. A lizozim minták LOD értékeit 3-as jel/zaj arány alapján számítottuk ki, míg a LOQ kiszámítása esetén 10-es jel/zaj arányt alkalmaztunk.

4.2 Gázkromatográfiás-tömegspektrometriás módszerfejlesztés

4.2.1 Felhasznált anyagok és GC oszlopok

A módszerfejlesztés során egy 52 darab, C4-től C24-ig terjedő lánchosszúságú zsírsav-metil-észter komponenseket tartalmazó GLC-674 (Nu-Chek-Prep Inc., Elysian, MN, USA) és egy 4 darab, linolsav-metil-észter komponenseket tartalmazó CRM47791 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) referencia standard keveréket alkalmaztunk. A komponensek listája és koncentrációja a vásárolt törzsoldatokban a gyártók leírásaiban található (Nu-Check-Prep, Inc., 2024; Merck). A GLC-674 referencia standard esetén 1 mg/ml koncentrációjú (a komponensek összkoncentrációja), a CRM47791 standard esetében 0,08 mg/ml összkoncentrációjú törzsoldatot készítettünk n-hexánnal. Az oldatokat az analízis előtt -20 °C-on tároltuk. A GC minőségű n-hexán oldószert a Merck Chemical Co-tól (Darmstadt, Németország) vásároltuk.

Az elválasztásokat három különböző polaritású gázkromatográfiás oszlopon végeztük, egy apoláris tulajdonságú 5% fenil- 95% metil-polisziloxán fázisösszetételű HP-5MS oszlopon (hosszúság: 25 m; belső átmérő: 0,20 mm; filmvastagság: 0,33 μm ; Agilent, Waldbronn, Németország); egy közepes/magas polaritású 50% ciano-propil-fenil- 50% metil-polisziloxán fázisösszetételű DB-225MS oszlopon (hosszúság: 30 m; belső átmérő: 0,25 mm; filmvastagság: 0,25 μm ; Agilent, Waldbronn, Németország); valamint egy rendkívül nagy polaritású 1,5-di-(2,3-dimetil-imidazólium)pentán bisz-((trifluorometil)sulfonil)imid fázisösszetételű SLB-IL111 oszlopon (hosszúság: 30 m; belső átmérő: 0,25 mm; filmvastagság: 0,20 μm ; Sigma, St. Louis, MO, USA). Az első használat előtt az oszlopokat a gyári ajánlások szerint

kondicionáltuk, azaz a hőmérsékletet 24 °C-ról 200 °C-ra emeltük 15 °C/perc sebességgel, és ezen a hőmérsékleten tartottuk 30 percig. Ezt követően 20 °C/perc sebességgel olyan hőmérsékletre emeltük, amely 10 °C-kal a legmagasabb ajánlott érték alatt volt, és ezen a hőmérsékleten 120 percig tartottuk.

4.2.2 GC-MS elemzés

A zsírsav-metil-észter komponensek elemzésére GC-MS készüléket (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) használtunk, amely egy gázkromatográfból (6890N) és egy quadrupole tömegspektrométerből (5975) állt. A kromatográfias körülmények a következők voltak: hélium vivógáz áramlási sebessége: 1,5 ml/perc; befecskendezési mód: splitless; az injektor, az ionforrás és a kvadrupól tömeganalizátor hőmérséklete 250 °C, 230 °C és 150 °C. Az injektált mennyiség automata mintavevő alkalmazásával 1 µl. A tömegspektrométert elektronütköztetési ionizáció (EI) üzemmódban, 70 eV ionizációs energia alkalmazása mellett használtuk, valamint a pásztázott tömegtartomány 50–450 amu volt.

A zsírsavak elválasztásához megfelelő módszerek kidolgozása során az adott oszlopokra vonatkozó szakirodalmat (Hartig, 2008.; He, és mtsai., 2018.; Zeng, és mtsai., 2013.) vettük alapul, majd a módosítások után a következő beállításokat találtuk megfelelőnek:

A HP-5MS oszlop esetében az oszlop hőmérsékletét kezdetben 50 °C-on tartottuk 2 percig, majd 170 °C-ra emeltük 10 °C/perc sebességgel, és ezen a hőmérsékleten tartottuk 2 percig, majd 190 °C-ra emeltük 4 °C/perc sebességgel, és ezen a hőmérsékleten tartottuk 5 percig, majd 290 °C-ra emeltük 5 °C/perc sebességgel, és ezen a hőmérsékleten tartottuk 2 percig, majd 320 °C-ra emeltük 20 °C/perc sebességgel, és a végső hőmérsékleten tartottuk 2 percig. Az átvezető kapilláris (transfer line) hőmérsékletét 280 °C-ra állítottuk be.

A DB-225MS oszlop esetében az oszlop hőmérsékletét kezdetben 50 °C-on tartottuk 2 percig, majd 170 °C-ra emeltük 10 °C/perc sebességgel, és ezen a hőmérsékleten tartottuk 2 percig, majd 190 °C-ra emeltük 2,5 °C/perc sebességgel, és ezen a hőmérsékleten tartottuk 5 percig, majd 220 °C-ra emeltük 5 °C/perc sebességgel és ezen a hőmérsékleten tartottuk 2 percig, majd 230 °C-ra emeltük 10 °C/perc sebességgel, és a végső hőmérsékleten tartottuk 8 percig. Az átvezető kapilláris hőmérsékletét 230 °C-ra állítottuk be.

Az SLB-IL111 oszlop esetében az oszlop hőmérsékletét kezdetben 40 °C-on tartottuk 4 percig, majd 220 °C-ra emeltük 4,5 °C/perc sebességgel, ezt követően 260 °C-ra emeltük 20 °C/perc sebességgel, és a végső hőmérsékleten tartottuk 1 percig. Az átvezető kapilláris

hőmérsékletét 260 °C-ra állítottuk be. Az adatok elemzését a GC/MSD CHEMSTATION (D.03.01 verzió, Agilent) szoftverrel végeztük. A zsírsavak azonosítása a keverékekben mutatott relatív koncentrációjuk, valamint az MS könyvtár segítségével történt (AMDIS 2.64 verzió, NIST; Freeware; (chemdata.nist.gov)).

4.2.3 Validálási eljárás

Az optimális körülmények elérése érdekében a három oszlopon végzett GC–MS kísérleteket szisztematikusan tanulmányoztuk. A két FAME standard keveréket úgy vizsgáltuk, hogy különböző kísérleti elrendezésekben mindkét standard-del legalább három elemzést végezzünk. A keverékekből öt-öt koncentrációból álló oldatsorozatot készítettünk n-hexánban, a GLC-674 esetében 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 és 1 mg/ml, a CRM47791 keverékre vonatkozóan pedig 0,008; 0,02; 0,04; 0,06 és 0,08 mg/ml koncentrációkban. A kapott eredményekből meghatároztuk a válaszjel linearitását, a kimutatási (LOD) és meghatározási (LOQ) határt, a rendszeralkalmasságot, a napon belüli és napok közötti ismételhetőséget, valamint a pontosságot. A kalibrációs görbéket három ($n = 3$), azonos körülmények között végrehajtott párhuzamos mérés eredményeiből határoztuk meg. Az LOD és LOQ értékeket a (Dodds, McCoy, Rea, & Kennish, 2005.)-ben leírtak szerint számítottuk. A kromatográfias módszerek validálására a (Taverniers, de Loose, & van Bockstaele, 2004.)-ban található irányelveket alkalmaztuk. A rendszeralkalmasságot a hét ($n = 7$), azonos körülmények között, egy napon belül végzett vizsgálatból kapott retenciós idő és koncentráció relatív hiba (RSD) értékeivel fejeztük ki. A rendszeralkalmasság általános kritériumaként a retenciós idő esetén az $RSD < 2\%$, a koncentrációra vonatkozóan az $RSD < 10\%$ feltételt alkalmaztuk. A módszerek precizitását napon belüli és napok közötti kísérletekkel is ellenőriztük. A napon belüli ismételhetőséget minden minta három ($n = 3$), azonos körülmények között, egy napon belül végzett párhuzamos méréséből számítottuk, a napok közötti ismételhetőséget pedig minden minta három ($n = 3$) párhuzamos elemzéséből kaptuk, amelyet három egymást követő napon ismételtünk meg ($n = 9$). A napon belüli és a napok közötti ismételhetőség általános kritériumaként az $RSD < 10\%$ feltételt alkalmaztuk. Az ismételhetőség átlagértékeit RSD-értékekkel fejeztük ki. Az átlagos pontosság általános kritériumaként azt a feltételt vettük alapul, hogy az RSD-értékek 80 és 120% között legyenek.

4.2.4 Molekulamodellzés

Az 1,5-di-(2,3-dimetil-imidazólium)pentán bisz-((trifluorometil)sulfonil)imid ionfolyadék és a linolsav-metil-észter geometriai izomerjei (C18:2n-6tt, C18:2n-6tc, C18:2n-6ct és C18:2n-6cc) közötti kölcsönhatások bemutatására a két molekula egymáshoz viszonyított lehetséges pozícióit a HyperChem 7.51 szoftverrel (HyperChem™ Professional 7.51, Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, USA) határoztuk meg. A molekulák geometriai optimalizálása a legalacsonyabb energiájú struktúrákat, azaz a kémiai szerkezet legstabilabb formáit jeleníti meg. Kezdeti lépésként az ionfolyadék és az adott geometriai izomer molekulamodelljét egyenként létrehoztuk, majd az MM+ molekula mechanikai erőter módszerével optimalizáltuk (Allinger, 1997.). A molekuláris rendszerek létrehozása után a két molekula egymáshoz viszonyított helyzetét azonos MM+ módszerrel optimalizáltuk.

4.3 A tenyésztési körülmények hatásának vizsgálata baktériumok és bakteriális endotoxinok zsírsavösszetételére gázkromatográfiás-tömegspektrometriás módszerrel

4.3.1 Felhasznált anyagok

A GC-MS elemzésekhez egy 26 darab, C11-C20 lánchosszúságú, telített, telítetlen, elágazó láncú, hidroxil-, és ciklopropán gyűrűt tartalmazó zsírsav-metil-észter keveréket (Bacterial Acid Methyl Ester (BAME) CP Mix, Matreya LLC., State College, PA, USA) alkalmaztunk. A komponensek listája a gyártó leírásában található (Matreya LLC). A vásárolt 10 mg/ml koncentrációjú metil-kaproátos törzsoldatot n-hexánnal tízszeresére hígítottuk. A zsírsavak azonosításához a GLC-463 referencia standard-et (Nu-Chek-Prep Inc., Elysian, MN, USA) is felhasználtuk. Az oldatokat -20 °C-on tároltuk. A GC minőségű oldószereket, azaz n-hexánt, acetont, piridint és ecetsavanhidridet a Merck Chemical Co-tól (Merck, KGaA, Darmstadt, Németország) vásároltuk.

4.3.2 Felhasznált baktériumtörzsek

A kísérletek során a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (PSAE PAO1), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (PSAE ATCC 27853), *Pseudomonas putida* (*P. Putida*) és *Pseudomonas aeruginosa* polirezisztens (PSAE PR) baktériumokat használtunk. A

baktériumok a Pécsi Tudományegyetem Orvosi Mikrobiológia és Immunitástani Intézet saját telepgyűjteményéről származnak.

4.3.3 Baktériumtenyésztés

Az általunk vizsgált törzseket Müller-Hinton agarra (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) és 5%-os birkavér agar táptalajra szélesztettük, majd legalább 1 napig inkubáltuk 25 °C, 37 °C és 42 °C hőmérsékleteken. A baktériumtörzsek zsírsavösszetételét 1, 3 és 5 napos inkubációt követően határoztuk meg. A törzsek antimikrobiális érzékenységét korongdiffúziós módszerrel határoztuk meg, amelyhez az Oxoid Ltd. (Basingstoke, Egyesült Királyság) termékét használtuk, és maradéktalanul betartottuk a cég által javasolt protokollt. A *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 érzékeny volt a ciprofloxacinra, a ceftazidimre és az imipenem – cilasztatinra, a *Pseudomonas aeruginosa* polirezisztens pedig szintén ezekkel az antimikrobiális szerekkel szemben mutatott rezisztenciát.

4.3.4 Endotoxinok kinyerése

Vizsgálataink során a 25 °C-on, 37 °C-on és 42 °C-on tenyésztett *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 baktériumokból kivont endotoxinokat elemeztük. A tenyésztést követően a baktériumokat 5000 g-vel centrifugáltuk 10 percig 4 °C-on. Az üledékeket kétszer mostuk 4 °C-on fiziológiás sóoldattal (500 ml), és acetonban szárítottuk. Az LPS-eket forró fenol-víz extrakciós módszerrel izoláltuk (Westphal & Jann, 1965.). A lipopoliszacharidokat dialízissel és ultracentrifugálással tisztítottuk 4 °C-on háromszor 100 000 g-vel négy órán keresztül, majd liofilizáltuk.

4.3.5 Származékképzési eljárás

A zsírsav-metil-észterek baktériumokból és endotoxinokból történő preparálását a Sharmili és munkatársai által kidolgozott metil-észter módszer (As & Ramasamy, 2016.), valamint a bakteriális eredetű zsírsavak gázkromatográfiás vizsgálatára általánosan alkalmazott MIDI protokoll (Sasser, 1990.) felhasználásával végeztük. A baktériumtenyészetek izolált telepeinek egy kacsnyi mennyiségét első lépésben 1 ml 3,75 M-os NaOH és 50%-os vizes metanolos

oldatban 100 °C-on 30 percig elszappanosítottuk, majd mielőbb szobahőmérsékletre hűtöttük. Ezt követően a szabad zsírsavakat metilálással metil-észter-származékokká alakítottuk 2,0 ml 3,25 M-os HCl-os metanolos oldatban 80 °C-on 10 percig, majd gyorsan lehűtöttük szobahőmérsékletre. A zsírsav-metil-észtereket a vizes fázisból 1,25 ml hexán és metil-tercier-butil-éter elegyével (1:1 v:v) rázótermosztátban 10 percig extraháltuk, a megsavanyított alsó fázist kiöntöttük, majd az extraktumot mostuk és semlegesítettük 3,0 ml 0,3 M-os NaOH-oldattal 5 percig rázótermosztátban, végül centrifugáltuk 2000 x g fordulaton 5 percig. Az így kapott felső szerves fázis volt a végső zsírsav-metil-észter extraktum. A hidroxizsírsavak ionfolyadék-alapú oszlopon való kimutathatósága érdekében a kapott extraktumon az analízis előtt acetilezést végeztünk (de Santana-Filho, és mtsai., 2012.). Azaz, a hexános fázist nitrogénárammal bepároltuk, majd piridin (100 µl) és ecetsavanhidrid (100 µl) keverékével 100 °C-on 1 órát inkubáltuk. A kapott reakcióelegyet nitrogénáram alatt újra bepároltuk, majd acetonnal 1 mg/mL végső koncentrációjú oldatot készítettünk. Az oldatokat az analízis előtt – 20 °C-on tároltuk.

4.3.6 GC-MS elemzés

A zsírsav-metil-észter komponensek elemzésére GC-MS készüléket (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) használtunk, amely egy gázkromatográfból (6890N) és egy quadrupole tömegspektrométerből (5975) állt. A kromatográf és a detektor mérési körülményei a következők voltak: hélium vivőgáz áramlási sebessége: 1,5 ml/perc; befecskendezési mód: splitless; az injektor, az ionforrás és a kvadrupól tömeganalizátor és az átvezető kapilláris hőmérséklete 250 °C, 230 °C, 150 °C és 260 °C. Az injektált minta mennyiség 1 µl, automata mintavevő alkalmazásával. A tömegspektrométert elektronütköztetési ionizáció (EI) üzemmódban, 70 eV ionizációs energia alkalmazása mellett használtuk, valamint a pásztázott tömegtartomány 50–400 amu volt. A vizsgálatokhoz a rendkívül magas polaritású 1,5-di-(2,3-dimetil-imidazólium)pentán bisz-((trifluorometil)sulfonil)imid fázisösszetételű SLB-IL111 oszlopot (hosszúság: 60 m; belső átmérő: 0,25 mm; filmvastagság: 0,20 µm; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) használtunk. Az első használat előtt az oszlopot a gyári ajánlások szerint kondicionáltuk, azaz a hőmérsékletet 24 °C-ról 200 °C-ra emeltük 15 °C/perc sebességgel, és ezen a hőmérsékleten tartottuk 30 percig, majd 20 °C/perc sebességgel a legmagasabb ajánlott értéknél 10 °C-kal alacsonyabb hőmérsékletre emeltük, és ezen a hőmérsékleten 120 percig tartjuk.

A megfelelő elválasztási módszer megtalálásához a korábbi munkánkban, a változatos szénatomszámú és telítettségű zsírsav-metil-észterek elválasztására és a különböző állófázisú GC-oszlopok tesztelésére alkalmazott módszer (4.2.2 *GC-MS elemzés* fejezet) szolgált alapul, amit az alábbiak szerint módosítottuk: kezdetben az oszlop hőmérsékletét 50 °C-ra emeltük, amelyen 0 percig tartottuk, majd 4,5 °C/perc sebességgel 220 °C-ra emeltük, és ezen a hőmérsékleten tartottuk 1 percig, ezt követően 50 °C/perc sebességgel 260 °C-ra emeltük, és ezen a végső hőmérsékleten tartottuk 2 percig. Az adatok elemzését a GC/MSD CHEMSTATION (D.03.01 verzió, Agilent) szoftverrel végeztük. A zsírsavak azonosítása a retenciós idők, a keverékekben mutatott relatív koncentrációjuk, valamint az MS könyvtár segítségével történt (AMDIS 2.64 verzió, NIST; Freeware; (chemdata.nist.gov)).

4.3.7 Validálási eljárás

A kidolgozott GC-MS módszert a kromatográfias módszerek validálására vonatkozó irányelvek (Taverniers, de Loose, & van Bockstaele, 2004.) szerint validáltuk, és a validálási paraméterek elfogadási kritériumait a nemzetközi ajánlások (FDA Laboratory Manual Volume II: Methods, Method Verification and Validation.), valamint Karnes és March munkája (Karnes & March, 1993.) alapján határoztuk meg. Az acetilezett BAME CP Mix standard keverékből egy öt koncentrációból álló oldatsorozatot (0,1; 0,25; 0,5; 0,75 és 1 mg/ml acetonban) készítettünk. Minden mintát legalább háromszor analizáltunk azonos körülmények között. A kapott eredményekből meghatároztuk a válaszjel linearitását, a kimutatási és meghatározási határt, a rendszeralkalmasságot, a napon belüli és napok közötti ismételhetőséget, valamint a pontosságot. A kalibrációs görbéket három ($n = 3$), azonos körülmények között végrehajtott párhuzamos mérés eredményeiből határoztuk meg. A LOD és a LOQ értékeket a (Dodds, McCoy, Rea, & Kennish, 2005.)-ban leírtak szerint számítottuk. A rendszeralkalmasságot a hét ($n = 7$), azonos körülmények között, egy napon belül végzett vizsgálatból kapott retenciós idő és koncentráció relatív hiba (RSD) értékeivel fejeztük ki. A rendszeralkalmasság általános kritériumaként a retenciós idő esetén a $RSD < 2\%$, a koncentrációra vonatkozóan a $RSD < 10\%$ feltételt alkalmaztuk. A módszerek precizitását napon belüli és napok közötti kísérletekkel is ellenőriztük. A napon belüli ismételhetőséget minden minta három ($n = 3$), azonos körülmények között, egy napon belül végzett párhuzamos analízisből számítottuk, a napok közötti ismételhetőséget pedig minden minta három ($n = 3$) párhuzamos elemzéséből kaptuk, amelyet három egymást követő napon ismételtünk meg ($n = 9$). A napon belüli és a napok közötti

ismételhetőség általános kritériumaként az $RSD < 10\%$ feltételt alkalmaztuk. Az ismételhetőség átlagértékeit RSD-értékekkel fejeztük ki. Az átlagos pontosság általános kritériumaként azt a feltételt vettük alapul, hogy az RSD-értékek 80 és 120% között legyenek.

4.3.8 Statisztikai elemzés

A retenciós idő, az idővel korrigált csúcs alatti terület és a csúcs alatti területszázalék értékeit az SPSS 28.0 statisztikai szoftverrel dolgoztuk fel. Többutas varianciaanalízist (MANOVA) végeztünk a független változók függő változókra gyakorolt lehetséges szignifikáns hatásának meghatározására. Független változónak a tenyésztési hőmérsékletet (25; 37; 42 °C), a táptalaj típusát (agar, véres agar) és a tenyésztési időt (1, 3, 5 nap) vettük. Wilks-féle lambda indexet számítottunk, hogy meghatározzuk a tenyésztési feltételek lehetséges szignifikáns hatását a retenciós időre, az idővel korrigált területre és a zsírsavkomponensek csúcs alatti területszázalékára vonatkozóan. A csoportok (tenyésztési hőmérséklet; tenyésztési idő) összehasonlítására ANOVA elemzést használtunk. A döntési szintet az $\alpha = 0,05$ estén határoztuk meg, és a statisztikai elemzések során az eredményeket $p < 0,05$ teljesülése esetében tekintettük szignifikánsnak.

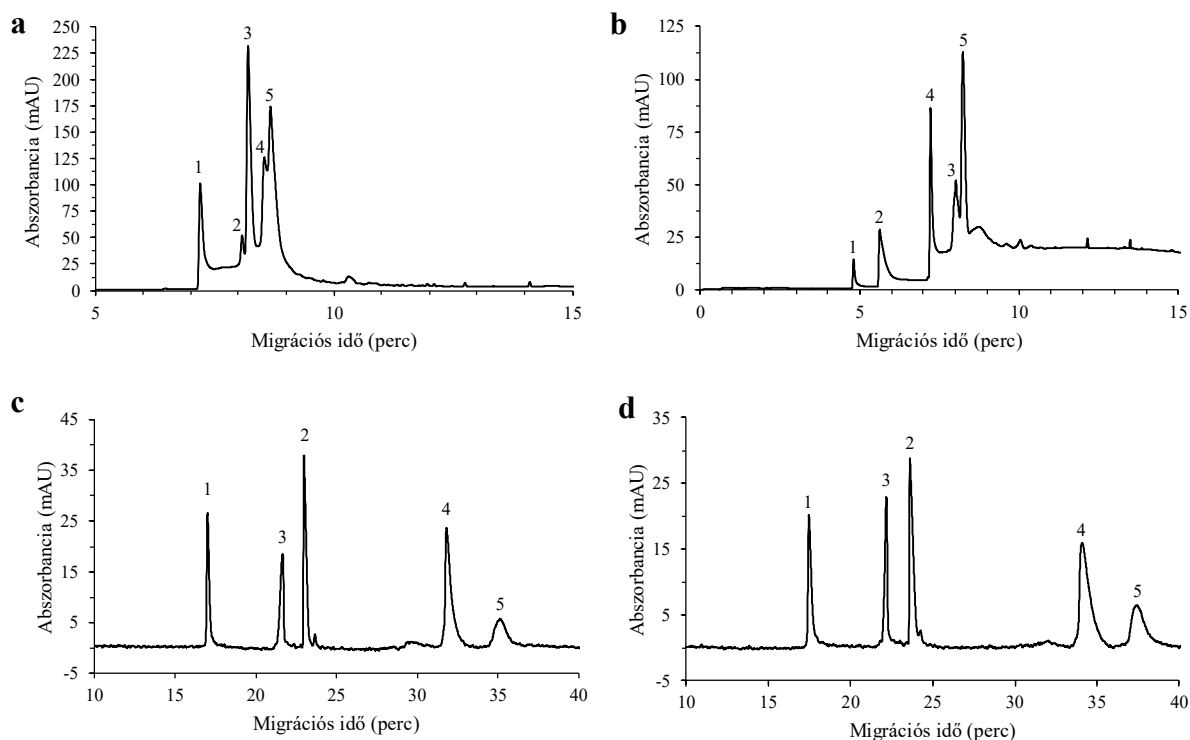
5 Eredmények

5.1 Imidazólium-alapú ionfolyadékok alkalmazása fehérjék elválasztására kapilláris zónaelektroforézis módszerrel

5.1.1 Modell fehérjék elválasztása ionfolyadékok jelenlétében

A kutatás során egy öt fehérjét [citokrom c (pI: 10,2), csirke tojásfehérjéből származó lizozim (pI: 11,35), mioglobint (pI: 6,97), tripszint (pI: 10,5) és apo-transzferrint (pI: 6,1)] tartalmazó standard keverék kapilláris zónaelektroforézis vizsgálatát végeztük el bevonat nélküli és bevonattal rendelkező kapillárisok felhasználásával (Mező, Páger, Makszin, & Kilár, 2020.). A kapillárisok belső falának módosításához 1,3-dialkilimidazólium kation-alapú ionfolyadékok, azaz [emim][BF₄], valamint [bmim][BF₄] és víz különböző koncentrációjú elegyeit használtuk. A zónaelektroforézis kísérletek során foszfátpuffert, illetve ionfolyadékok vizes elegyeit alkalmaztuk pufferoldatként, és megvizsgáltuk a különféle kísérleti paraméterek hatását az elválasztásra.

Kezdetben a kísérleteket bevonat nélküli kapillárisokban végeztük, amelyhez 40 mM koncentrációjú foszfátpuffert (pH 2,2) használtunk. A fehérjekeverék elektroferogramja az **5a ábrán** látható, ahol az abszorbanciát (fényelnyelést) a migrációs idő függvényében ábrázoltuk. Az alkalmazott kísérleti körülmények között a vizsgált fehérjék pozitív töltésűek voltak és a bevonat nélküli kapillárisban az alapvonal szerinti elválasztásuk nem valósult meg. Az elválasztás során a fehérjék töltés/méret aránya alapján a cyt c, lys, myo, try és apo-tf migrációs sorrend alakult ki.



5. ábra Az 5 fehérjét tartalmazó standard keverék elválasztása kapillaris zónaelektroforézis módszerrel (a, b) foszfátpuffer, valamint (c) [bmim][BF₄] és (d) [emim][BF₄] ionfolyadék-víz elegyet tartalmazó pufferoldat alkalmazásával. A kapillarisokat (a) bevonat nélküli állapotban, továbbá (b, c) [bmim][BF₄] és (d) [emim][BF₄] ionfolyadék-víz eleggyel létrehozott bevonattal használtuk. A csúcsok sorszámai a következőket jelölik: (1) citokróm c, (2) lizozim, (3) miogloblin, (4) tripszin és (5) apo-transzferrin. A szomszédos csúcsok felbontásai a következők: (c) $R_{1-3} = 15,29$; $R_{3-2} = 3,43$; $R_{2-4} = 16,78$; $R_{4-5} = 3,1$; (d) $R_{1-3} = 12,59$; $R_{3-2} = 3,82$; $R_{2-4} = 12,53$; $R_{4-5} = 2,31$. Kísérleti körülmények: a foszfát puffer koncentrációja: 40 mM; az ionfolyadékok koncentrációja: 100 mM; pH = 2,2; fehérjék koncentrációja: 1 mg/ml; kapillaris: 51 cm (42,5 cm a detektorig) × 50 μm belső átmérő; minták injektálása: 50 mbar 5 másodpercig; alkalmazott feszültség: +18 kV; hőmérséklet: 20 °C; UV-detektálás 200 nm-en.

Az ionfolyadékok elválasztásra gyakorolt hatásának vizsgálatára különböző koncentrációjú ionfolyadék-víz elegyeket alkalmaztunk a kapillarisok kondicionálása során, valamint pufferoldatként. Amikor az ionfolyadék tartalmú törzsoldatot (400 mM) desztillált vízzel elkészítettük, és a törzsoldatot közvetlenül ezután a megfelelő koncentrációra hígítottuk, az így kapott pufferrel nem sikerült megvalósítani az elválasztást. A törzsoldat 10 napos szobahőmérsékleten történő tárolása utáni hígításával kapott pufferrel viszont sikerült megvalósítani az elválasztásokat. A törzsoldat tárolása során a pH változását is tapasztaltuk. A frissen elkészített 400 mM koncentrációjú törzsoldat pH-ja 2,8 volt, amely a napok elteltével

folyamatosan csökkent, 10 nap eltelte után stabilizálódott, és 1,52 pH értékre állt be (**1. táblázat**). Eltérést tapasztaltunk a csökkenés tendenciájában a törzsoldat szobahőmérsékleten, illetve hűtőben történő tárolása során. Hűtőben való tárolással jelentősen lassabb volt a pH csökkenése, azaz az oldat megfelelő állapotának elérése, amikor alkalmas lett a fehérjék elválasztására.

1. táblázat A 400 mM koncentrációjú [bmim][BF₄] ionfolyadék vizes oldatának pH változása a szobahőmérsékleten történő tárolás időtartamának függvényében

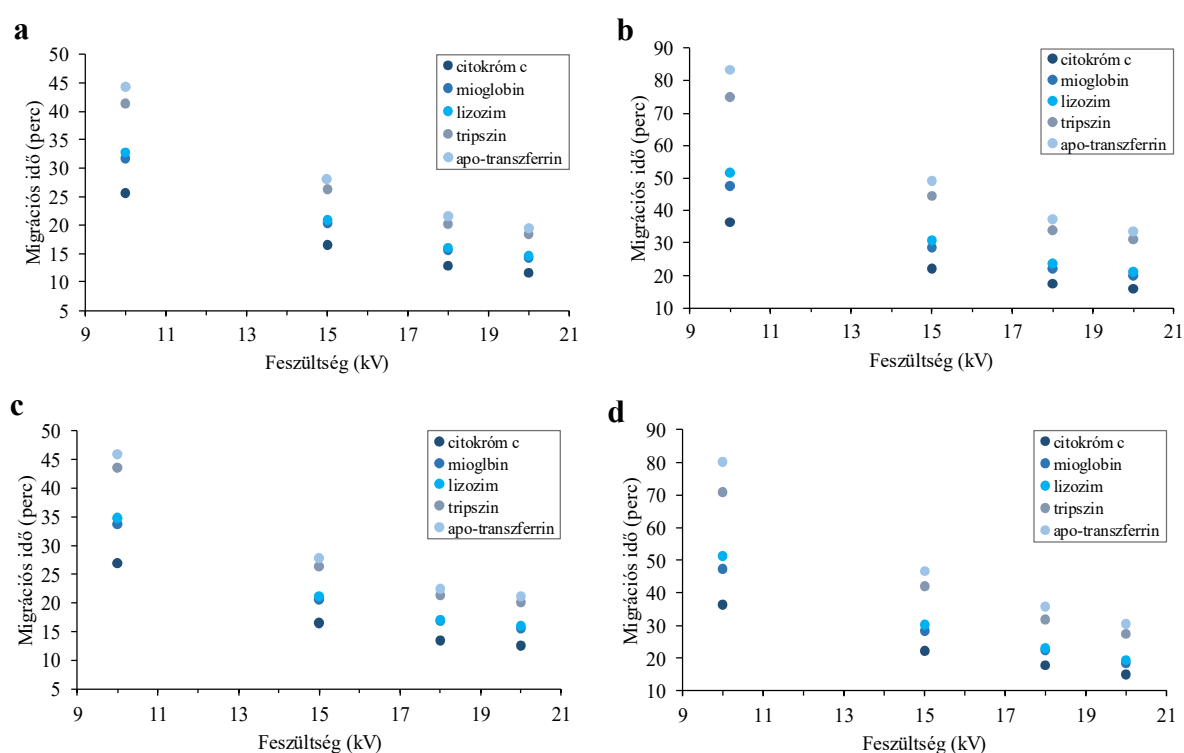
Napok száma	pH
Friss oldat	2,80
2 nap	2,10
5 nap	2,04
7 nap	1,95
10 nap	1,52

A törzsoldat 10 napos szobahőmérsékleten történő tárolása után a különböző koncentrációra felhígított oldatok pH értékei az ionfolyadék koncentráció függvényében a következők szerint változtak: pH = 2,7 ± 0,2 a 25 mM-os oldatban; pH = 2,5 ± 0,2 az 50 mM-os oldatban; pH = 2,3 ± 0,2 a 75 mM-os oldatban; pH = 2,2 ± 0,2 a 100 mM-os oldatban, pH = 2,1 ± 0,2 a 125 mM-os oldatban és pH = 1,5 ± 0,2 a 400 mM-os oldatban, mindkét ionfolyadék típusra vonatkozóan.

A kapillárisokat ezen elegyekkel átöblítve a kapillárisok felületén stabil bevonatot kaptunk. Az **5b ábra** a 100 mM koncentrációjú [bmim][BF₄] ionfolyadék vizes elegyével bevont kapillárisban való elválasztást mutatja, 40 mM foszfátpuffer (pH 2,2) alkalmazásával. Ebben az esetben a fehérjék elválasztása eltérő migrációs sorrendet és valamivel jobb felbontást mutatott. Az **5c** és **d ábrán** az ionfolyadék–víz elegyekkel (100 mM [bmim][BF₄] és 100 mM [emim][BF₄] pH 2,2) bevont kapillárisok használatával, és ugyanazon ionfolyadék–víz elegyek pufferként történő alkalmazásával kapott elektroferogramok láthatók. Ilyen kísérleti körülmények között lényegesen nagyobb felbontást és keskenyebb csúcsalakot kaptunk, valamint megfigyelhető volt a korábbiaktól eltérő migrációs sorrend kialakulása is. Az imidazólium-alapú ionfolyadékok puffer komponensként való alkalmazásával tehát a vizsgált fehérjék hatékony elválasztása valósult meg, ellentétben az elektroforetikus elválasztásokhoz általánosan használt foszfátpufferrel.

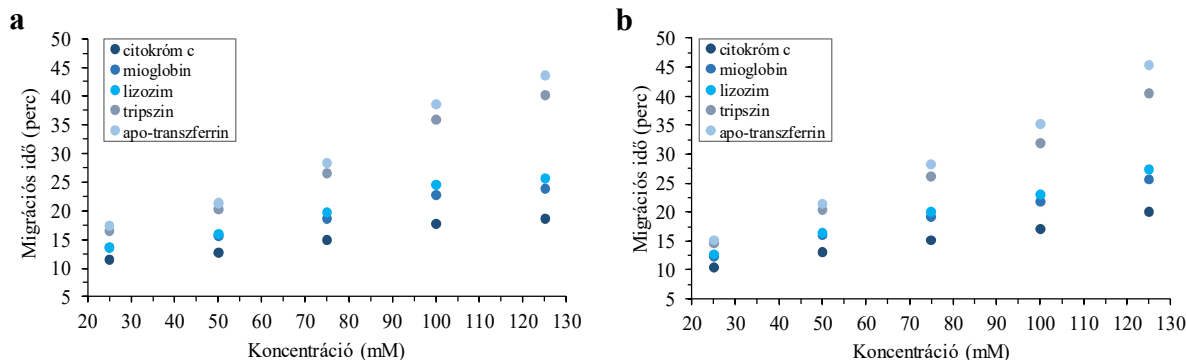
A legalább három párhuzamos mérés alapján a fehérjék migrációs idejének relatív hiba (RDS) értékei 2,5-7,5% (futtatásról futtatásra), 3,7-7,2% (napról napra) és 1,0-9,1% (hónapról hónapra) között alakultak az [emim][BF₄] esetében minden koncentrációt figyelembe véve. A [bmim][BF₄] megfelelő értékei a 2,6–8,9% (futtatásról futtatásra), 3,5–6,5% (napról napra) és 1,1–9,2% (hónapról hónapra).

A **6. ábra** a fehérjék migrációs idejének függését mutatja az alkalmazott feszültségtől a két ionfolyadék két koncentrációja esetén (50 és 100 mM). A feszültség növelésével a migrációs idő nem lineárisan, hanem exponenciálisan csökkent.



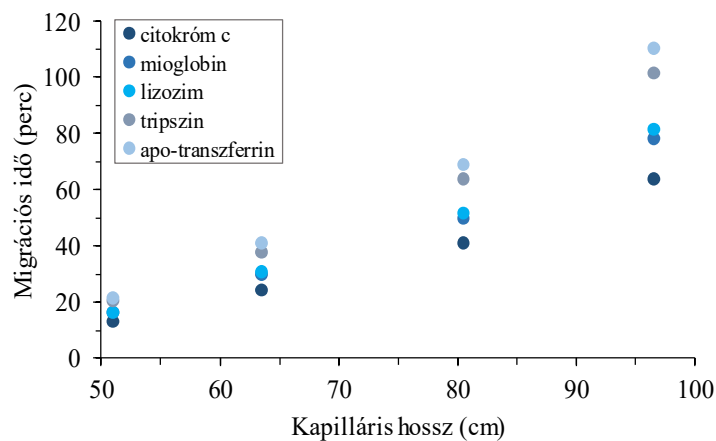
6. ábra A vizsgált fehérjék migrációs idejének függése az alkalmazott feszültségtől kapilláris zónaelektroforézis kísérletekben (a, b) [emim][BF₄], (c, d) [bmim][BF₄] ionfolyadék-víz elegyek alkalmazásával pufferoldatként, valamint a kapilláris bevonására. Az ionfolyadékok koncentrációja (a, c) 50 mM és (b, d) 100 mM volt. A további kísérleti körülményt az 5. ábra jelmagyarázata tartalmazza.

Ismert, hogy az ionfolyadék koncentráció befolyásolja az imidazólium kationok borítottságát a kapilláris belső falán (Jiang, Wang, & Lv, 2006.). Ennek megfelelően megvizsgáltuk a pufferkoncentráció hatását az elválasztásra. A **7. ábra** azt mutatja, hogy az ionfolyadék koncentráció növelésével, a fehérjék migrációs sebessége csökkent.



7. ábra A vizsgált fehérjék migrációs idejének függése az ionfolyadék koncentrációjától kapilláris zónaelektroforézis kísérletekben (a) [emim][BF₄], (b) [bmim][BF₄] ionfolyadék-víz elegyek alkalmazásával pufferoldatként, valamint a kapilláris bevonására. A további kísérleti körülményt az 5. ábra jelmagyarázata tartalmazza.

A kapilláris hossz elválasztásra gyakorolt hatásának tanulmányozása során azt találtuk, hogy azonos feszültség (18 kV) alkalmazása mellett, azaz a térerősség körülbelül 2-szeres csökkentésével (a kapilláris hosszát 51-ről 96 cm-re változtatva), a migrációs idők körülbelül 5-szörösére növekedtek (**8. ábra**).



8. ábra A vizsgált fehérjék migrációs idejének függése a kapilláris hosszától (51; 63,5; 80,5; és 96,5 cm) kapilláris zónaelektroforézis kísérletben 50 mM koncentrációjú [bmim][BF₄] ionfolyadék-víz elegyet alkalmazva pufferoldatként, valamint a kapilláris bevonására. A további kísérleti körülményt az 5. ábra jelmagyarázata tartalmazza.

5.1.2 EOF kísérletek

Az EOF vizsgálata során különböző pufferoldatok alkalmazása mellett mintaként acetont injektáltunk. A foszfátpuffer (pH 2,2) bevonat nélküli kapillárisban történő használata esetén, a vizsgált 1 órás időtartamon belül sem pozitív, sem negatív polaritás mellett nem jelent meg az aceton csúcsa. Ezzel ellentétben az ionfolyadék-víz elegyek pufferoldatként való alkalmazásával a megfelelő eleggyel bevont kapillárisokban, negatív polaritás mellett az acetonzóna jelentős mobilitást mutatott és anód irányú EOF alakult ki.

5.1.3 Statisztikai elemzés

A kísérletek során rögzített adatokat, valamint a kísérleti paramétereket tartalmazó adatbázis alapján különböző varianciaanalízis (ANOVA) eljárásokat végeztünk annak érdekében, hogy feltárjuk a változók közötti összefüggéseket. A független változók különféle kombinációjával három- és kétutas ANOVA elemzéseket hajtottunk végre. Többutas varianciaanalízis elemzést (MANOVA) végeztünk, hogy meghatározzuk a független változók, mint az ionfolyadék típus ([bmim][BF₄] és [emim][BF₄]), az alkalmazott feszültség (10, 15, 18 és 20 kV), valamint az ionfolyadék koncentráció (50 és 100 mM) esetleges szignifikáns hatását a függő változókra, úgymint a migrációs időre, az idővel korrigált csúcs alatti területre és a felbontásra. A **2. táblázat** a vizsgált öt fehérje adatainak MANOVA elemzését foglalja össze.

Az analízis alapján a következő megállapításokat tehetjük: a MANOVA elemzés kimutatta a statisztikailag szignifikáns különbségeket az alkalmazott két ionfolyadék típus között: $F(3, 8) = 387,198$, $p < 0,001$, Wilks' $\Lambda = 0,007$, parciális $\eta^2 = 0,993$. A háromutas ANOVA eredménye szerint az *ionfolyadék típus* \times *ionfolyadék koncentráció* \times *alkalmazott feszültség* változók együttese szignifikáns hatást gyakoroltak a *migrációs időre* ($F(3) = 5,712$; $p = 0,015$; parciális $\eta^2 = 0,631$) és a *csúcsterületre* ($F(3) = 1476,28$; $p < 0,001$; parciális $\eta^2 = 0,998$), a *felbontással* azonban nem lépett fel szignifikáns kölcsönhatás ($F(3) = 0,162$; $p = 0,919$; parciális $\eta^2 = 0,046$). A kétutas ANOVA azt mutatta, hogy az *ionfolyadék típus* \times *alkalmazott feszültség* változók együttesen statisztikailag szignifikáns kölcsönhatást gyakoroltak a *csúcsterületre* vonatkozóan, de nem mutattak szignifikáns kölcsönhatást a *migrációs idő* és a *felbontás* tekintetében. Hasonlóképpen, az *ionfolyadék típus* \times *ionfolyadék koncentráció* változók statisztikailag szignifikáns hatással voltak a *migrációs időre* és a *csúcsterületre*, de nem volt szignifikáns kölcsönhatás a *felbontásra* vonatkozóan.

2. táblázat A többutas varianciaanalízis elemzések (MANOVA) összefoglalása

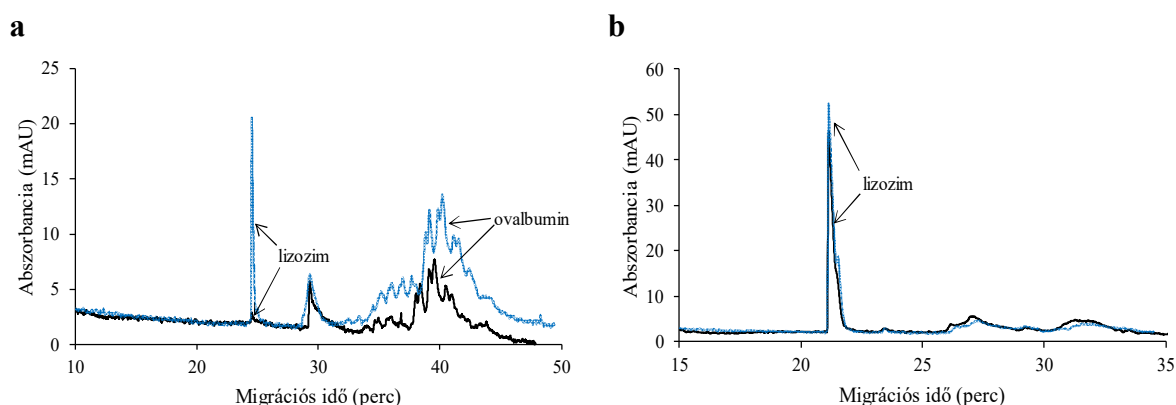
Független változók	Függő változók	F érték	df	P érték	parciális η^2
Ionfolyadék típus (A)	Migrációs idő (perc)	8,703	1	0,015	0,465
	Idővel korrigált terület	1075	1	< 0,001	0,991
	Felbontás	4,545	1	0,059	0,312
Alkalmazott feszültség (B)	Migrációs idő (perc)	9854	3	< 0,001	1,000
	Idővel korrigált terület	1154	3	< 0,001	0,997
	Felbontás	1,359	3	0,311	0,290
Ionfolyadék koncentráció (C)	Migrációs idő (perc)	10392	1	< 0,001	0,999
	Idővel korrigált terület	8308	1	< 0,001	0,304
	Felbontás	21,38	1	0,001	0,681
AB	Migrációs idő (perc)	1,550	3	0,262	0,317
	Idővel korrigált terület	1532	3	< 0,001	0,998
	Felbontás	0,242	3	0,865	0,068
AC	Migrációs idő (perc)	132,9	1	< 0,001	0,930
	Idővel korrigált terület	1232	1	< 0,001	0,992
	Felbontás	1,193	1	0,300	0,107
BC	Migrációs idő (perc)	700,9	3	< 0,001	0,995
	Idővel korrigált terület	1094	3	< 0,001	0,997
	Felbontás	0,579	3	0,642	0,148
ABC	Migrációs idő (perc)	5,712	3	0,015	0,631
	Idővel korrigált terület	1476	3	< 0,001	0,998
	Felbontás	0,162	3	0,919	0,046

A vastagon szedett p értékeknek megfelelő eredmények statisztikailag szignifikánsnak tekinthetők.

Az alkalmazott feszültség \times ionfolyadék koncentráció változók statisztikailag szignifikáns kölcsönhatást mutattak a migrációs idő és a csúcsterület tekintetében, de nem alakult ki szignifikáns hatás a felbontásra vonatkozóan. Ezenfelül az egyutas ANOVA kimutatta, hogy az ionfolyadék típus statisztikailag szignifikáns hatást gyakorolt a migrációs időre és a csúcsterületre, az alkalmazott feszültség szignifikáns hatással volt a migrációs időre és a csúcsterületre, valamint az ionfolyadék koncentráció statisztikailag szignifikáns hatást gyakorolt a migrációs időre, a csúcsterületre és a felbontásra is.

5.1.4 Valós minták elválasztása kapilláris zónaelektroforézis módszerrel

A kidolgozott módszer gyakorlati alkalmazhatóságát valós minták fehérjeösszetételének meghatározásával teszteltük. Vizsgálatainkhoz olyan valós mintákat választottunk, amelyek a korábban vizsgált fehérje standard-ek valamelyikét tartalmazzák. A 9. ábra a csirke tojásfehérje- és a humán könnyminták elektroferogramjait mutatja be [bmim][BF₄] ionfolyadék alkalmazásával puffer komponensként, illetve a kapillárisok bevonására.



9. ábra A tojásfehérje és a humán könnyminta kapilláris zónaelektroforézis elválasztása. A kapilláris bevonására, valamint pufferoldatként 100 mM koncentrációjú [bmim][BF₄]-víz elegyet használtunk. (a) A vízben oldott liofilizált tojásfehérje elektroferogramja (fekete), valamint a mintához hozzáadott csirke tojásfehérje eredetű lizozim és ovalbumin (kék) standard-del. A hozzáadott lizozim koncentrációja 0,5 mg/ml, a hozzáadott ovalbumin koncentrációja 5,5 mg/ml volt. (b) A humán eredetű könnyminta elektroferogramja (fekete), valamint a mintához hozzáadott humán lizozim standard-del (kék). A hozzáadott lizozim koncentrációja 0,67 mg/ml volt. A további kísérleti körülményt az 5. ábra jelmagyarázata tartalmazza.

A fehérjék azonosítása céljából az úgynevezett „spiking” módszert alkalmaztuk, amely során a vizsgálandó minta ismert mennyiségéhez az elemzés tárgyát képező komponens/eket standard vegyület formájában, ismert mennyiségben adtuk hozzá. A valódi biológiai minták elektroferogramjain a lizozim és ovalbumin komponensek jó felbontását tapasztaltuk.

A kalibrációs görbék adatainak felhasználásával (**3. táblázat**) a minták lizozim tartalma meghatározható volt, így megállapítottuk, hogy a tojásfehérjében 0,100 ($\pm 0,01$) mg/ml lizozim, a humán könnymintában 3,65 ($\pm 0,39$) mg/ml lizozim található. Az elektroforetikus futtatások 21,77 ($\pm 0,15$) $\mu\text{g/ml}$ és 37,27 ($\pm 0,25$) $\mu\text{g/ml}$ LOD értékeket mutattak a csirke tojásfehérje, illetve a humán lizozimra vonatkozóan.

3. táblázat Kalibrációs adatok a lizozim tartalom valós mintákban történtő meghatározásához

Vegyület	Linearitás		R^2	Tartomány ($\mu\text{g/ml}$)	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
	Meredekség	Tengely- metszet				
Lys-humán	205,06	-18,036	0,9974	250-2000	37,27	124,23
Lys-tojásfehérje	372,37	-13,825	0,9961	125-2000	21,77	72,57

Az adatpontok száma (n) a humán lizozim esetében 5, a tojásfehérje eredetű lizozim esetében 6 volt. A csúcsterületek standard hiba értéke a humán lizozimra vonatkozóan 22,01; a tojásfehérje eredetű lizozim esetén 24,35.

5.2 Az ionfolyadék kölcsönhatás szerepe zsírsav-metil-észterek elválasztásában – többszörösen telítetlen geometriai izomerek elválasztása GC-MS módszerrel

5.2.1 A zsírsav-metil-észterek retenciós viselkedése különböző polaritású oszlopok alkalmazásával

Három különböző tulajdonságú gázkromatográfias oszlop, az apoláris HP-5MS (25 m), a közepes/nagy polaritású DB-225MS (30 m) és az extrém poláris, ionfolyadék-alapú SLB-IL111 (30 m) oszlop hatékonyságát vizsgáltuk meg zsírsav-metil-észterek elválasztásában GC-MS módszerrel (Mező, és mtsai., 2021.). A zsírsav-metil-észterek vizsgálatát az Anyagok és módszerek részben (4.2 fejezet) leírtak szerint végeztük. Két különböző standard keveréket (GLC-674 és CRM47791) használtunk, amelyek 52, illetve 4 zsírsav komponenset tartalmaztak. Az elválasztott komponenseket a keverékekben mutatott relatív koncentrációjuk és a tömegspektrumok alapján azonosítottuk. A csúcsokat az apoláris tulajdonságú HP-5MS oszlop használatával kapott elúciós sorrend szerint jelöltük. A két FAME keverék összetevőinek listáját a 4. és 5. táblázatok tartalmazzák.

4. táblázat A zsírsav-metil-észter komponensek retenciós ideje a GLC-674 keverékben a három GC-oszlop optimalizált elválasztási módszerével. Az optimalizált kísérleti körülményeket a 4.2.2 GC-MS elemzés fejezetben részletezzük.

Csúcs jel	Vegyület azonosító	Szisztematikus név (Triviális név)	HP-5MS (perc)	DB-225MS (perc)	SLB-IL111 (perc)
	C4:0	butánsav-metil-észter (methyl butyrate)	n.d.	n.d.	n.d.
1	C6:0	hexánsav-metil-észter (methyl caproate)	4,29	5,46	6,87
2	C8:0	oktánsav-metil-észter (methyl caprylate)	7,54	8,35	11,24
3	C10:0	dekánsav-metil-észter (methyl caprate)	10,47	10,94	15,28
4	C11:0	undekánsav-metil-észter (methyl undecanoate)	11,81	12,12	17,12
5	C12:0	dodekánsav-metil-észter (methyl laurate)	13,07	13,24	18,83
6	C13:0	tridekánsav-metil-észter (methyl tridecanoate)	14,28	14,31	20,47
7	C14:1n-5t	<i>transz</i> -9-tetradecénsav-metil-észter (methyl 9- <i>trans</i> -myristelaidate)	15,53	15,88	23,00
8	C14:1n-5	<i>cisz</i> -9-tetradecénsav-metil-észter (methyl 9- <i>cis</i> -myristoleat)	15,53	16,04	23,42

9	C14:0	tetradekánsav-metil-észter (methyl myristate)	15,75	15,58	22,02
10	C15:1n-5t	<i>transz</i> -10-pentadecénsav-metil-észter (methyl 10- <i>trans</i> -pentadecenoate)	17,39	17,56	24,46
11	C15:1n-5	<i>cisz</i> -10-pentadecénsav-metil-észter (methyl 10- <i>cis</i> -pentadecenoate)	17,39	17,75	24,85
12	C15:0	pentadekánsav-metil-észter (methyl pentadecanoate)	17,64	17,19	23,49
13	C16:1n-7	<i>cisz</i> -9-hexadecénsav-metil-észter (methyl palmitoleate)	19,21	19,51	25,99
14	C16:1n-7t	<i>transz</i> -9-hexadecénsav-metil-észter (methyl palmitelaidate)	19,32	19,39	25,69
15	C16:0	hexadekánsav-metil-észter (methyl palmitate)	19,69	19,09	24,93
16	C17:1n-7	<i>cisz</i> -10-heptadecénsav-metil-észter methyl 10-heptadecenoate)	21,32	21,71	27,31
17	C17:1n-7t	<i>transz</i> -10-heptadecénsav-metil-észter (methyl 10- <i>trans</i> -heptadecenoate)	21,46	21,59	27,05
18	C17:0	heptadekánsav-metil-észter (methyl heptadecenoate)	21,86	21,24	26,27
19	C18:3n-6	<i>cisz, cisz, cisz</i> -6,9,12-oktadekatriénsav- metil-észter (methyl γ -linolenate)	23,05	25,34	30,76
20	C18:2n-6cc	<i>cisz, cisz</i> -9,12-oktadekadiénsav-metil- észter (methyl linoleate)	23,57	24,87	29,86
21	C18:3n-3	<i>cisz, cisz, cisz</i> -9,12,15-oktadekatriénsav- metil-észter (methyl α -linolenate)	23,74	26,21	31,38
22	C18:1n-9	<i>cisz</i> -9-oktadecénsav-metil-észter (methyl oleate)	23,87	23,91	28,41
23	C18:2n-6tt	<i>transz, transz</i> -9,12-oktadekadiénsav- metil-észter (methyl linoelaidate)	23,87	24,66	29,32
24	C18:1n-7	<i>cisz</i> -11-oktadecénsav-metil-észter (methyl <i>cis</i> -vaccenate)	23,87	24,13	28,25
25	C18:1n-9t	<i>transz</i> -9-oktadecénsav-metil-észter (methyl elaidate)	24,08	23,91	28,33
26	C18:1n-12t	<i>transz</i> -6-oktadecénsav-metil-észter (methyl petroselaidate)	24,08	23,91	28,50
27	C18:1n-12	<i>cisz</i> -6-oktadecénsav-metil-észter (methyl petroselinoate)	24,08	23,98	28,64
28	C18:1n-7t	<i>transz</i> -11-oktadecénsav-metil-észter (methyl <i>trans</i> -vaccenate)	24,15	23,91	28,25
29	C18:0	oktadekánsav-metil-észter (methyl stearate)	24,72	23,60	27,68
30	C19:1n-12t	<i>transz</i> -7-nonadecénsav-metil-észter (methyl 7- <i>trans</i> -nonadecenoate)	27,23	26,54	29,50
31	C19:1n-9t	<i>transz</i> -10-nonadecénsav-metil-észter (methyl 10- <i>trans</i> -nonadecenoate)	27,51	26,64	29,37
32	C20:4n-6	<i>cisz, cisz, cisz, cisz</i> -5,8,11,14- eikozatetraénsav-metil-észter (methyl arachidonate)	28,81	32,15	33,57
33	C20:5n-3	<i>cisz, cisz, cisz, cisz, cisz</i> -5,8,11,14,17- eikozapentaénsav-metil-észter (methyl eicosapentaenoate, EPA)	28,95	33,39	35,02

34	C20:3n-6	<i>cisz, cisz, cisz</i> -8,11,14-eikozatriénsav-metil-észter (methyl dihomogamma linolenate)	29,39	31,93	33,03
35	C20:2n-6	<i>cisz, cisz</i> -11,14-eikozadiénsav-metil-észter (methyl 11,14-eicosadienoate)	30,00	31,47	32,16
36	C20:1n-9	<i>cisz</i> -11-eikozénsav-metil-észter (methyl gondoate)	30,17	30,30	30,87
37	C20:3n-3	<i>cisz, cisz, cisz</i> -11,14,17-eikozatriénsav-metil-észter (methyl 11,14,17-eicosatrienoate)	30,17	32,77	33,57
38	C20:1n-9t	<i>transz</i> -11-eikozénsav-metil-észter (methyl 11- <i>trans</i> -eicosenoate)	30,38	30,22	30,76
39	C20:0	eikozénsav-metil-észter (methyl arachidate)	30,92	29,79	30,11
40	C21:0	heneikozánsav-metil-észter (methyl heneicosanoate)	33,21	32,77	31,23
41	C22:5n-6	<i>cisz, cisz, cisz, cisz, cisz</i> -4,7,10,13,16-dokozapentaénsav-metil-észter (osbond acid methyl ester)	33,21	37,31	36,22
42	C22:6n-3	<i>cisz, cisz, cisz, cisz, cisz, cisz</i> -4,7,10,13,16,19-dokozahexaénsav-metil-észter (methyl docosahexaenoate, DHA)	33,37	38,36	37,60
43	C22:4n-6	<i>cisz, cisz, cisz, cisz</i> -7,10,13,16-dokozatetraénsav-metil-észter (methyl adrenate)	33,58	37,13	35,82
44	C22:5n-3	<i>cisz, cisz, cisz, cisz, cisz</i> -7,10,13,16,19-dokozapentaénsav-metil-észter (methyl clupanodonat)	33,70	38,19	37,18
45	C22:2n-6	<i>cisz, cisz</i> -13,16-dokozadiénsav-metil-észter (methyl 13,16-docosadienoate)	34,49	36,34	34,28
46	C22:1n-9	<i>cisz</i> -13-dokozénsav-metil-észter (methyl erucate)	34,61	35,44	33,11
47	C22:1n-9t	<i>transz</i> -13-dokozénsav-metil-észter (methyl brassidate)	34,76	35,37	32,96
48	C22:0	dokozénsav-metil-észter (methyl behenate)	35,15	35,06	32,38
49	C23:0	trikozénsav-metil-észter (methyl tricosanoate)	36,94	37,41	33,46
50	C24:1n-9	<i>cisz</i> -15-tetrakozénsav-metil-észter (methyl nervonate)	38,13	39,89	35,12
51	C24:0	tetrakozénsav-metil-észter (methyl lignocerate)	38,57	39,45	34,43

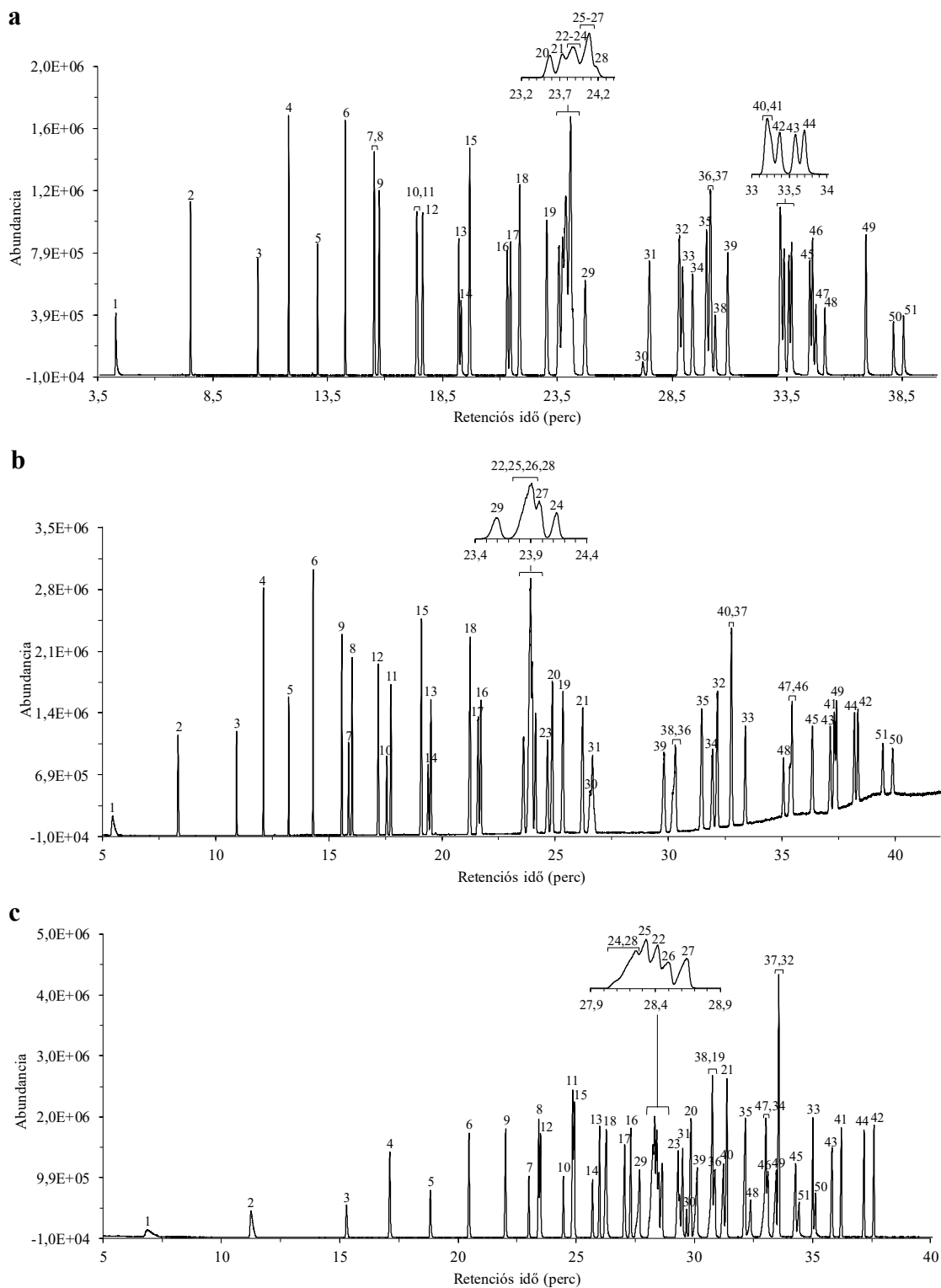
Az átfedő csúcsok retenciós idejének értékei félkövérén vannak szedve. A zsírsav-metil-észterek *cisz/transz* izomerizációját a vegyület azonosítóiban is jeleztük. n.d.: nem detektálható.

5. táblázat A zsírsav-metil-észter komponensek retenciós ideje a CRM47791 keverékben a három GC-oszlop optimalizált elválasztási módszerével. Az optimalizált kísérleti körülményeket a 4.2.2 *GC-MS elemzés* fejezetben részletezzük.

Csúcs jel	Vegyület azonosító	Szisztematikus név (Triviális név)	HP-5MS (perc)	DB-225MS (perc)	SLB-IL111 (perc)
1'	C18:2n-6cc	<i>cisz,cisz</i> -9,12-oktadekadiénsav-metil-észter (methyl linoleate)	23,56	24,81	29,77
2'	C18:2n-6tt	<i>transz,transz</i> -9,12-oktadekadiénsav-metil-észter (methyl linoelaidate)	23,89	24,64	29,24
3'	C18:2n-6tc	<i>transz,cisz</i> -9,12- oktadekadiénsav-metil-észter	23,89	24,81	29,48
4'	C18:2n-6ct	<i>cisz,transz</i> -9,12- oktadekadiénsav-metil-észter	24,02	24,98	29,61

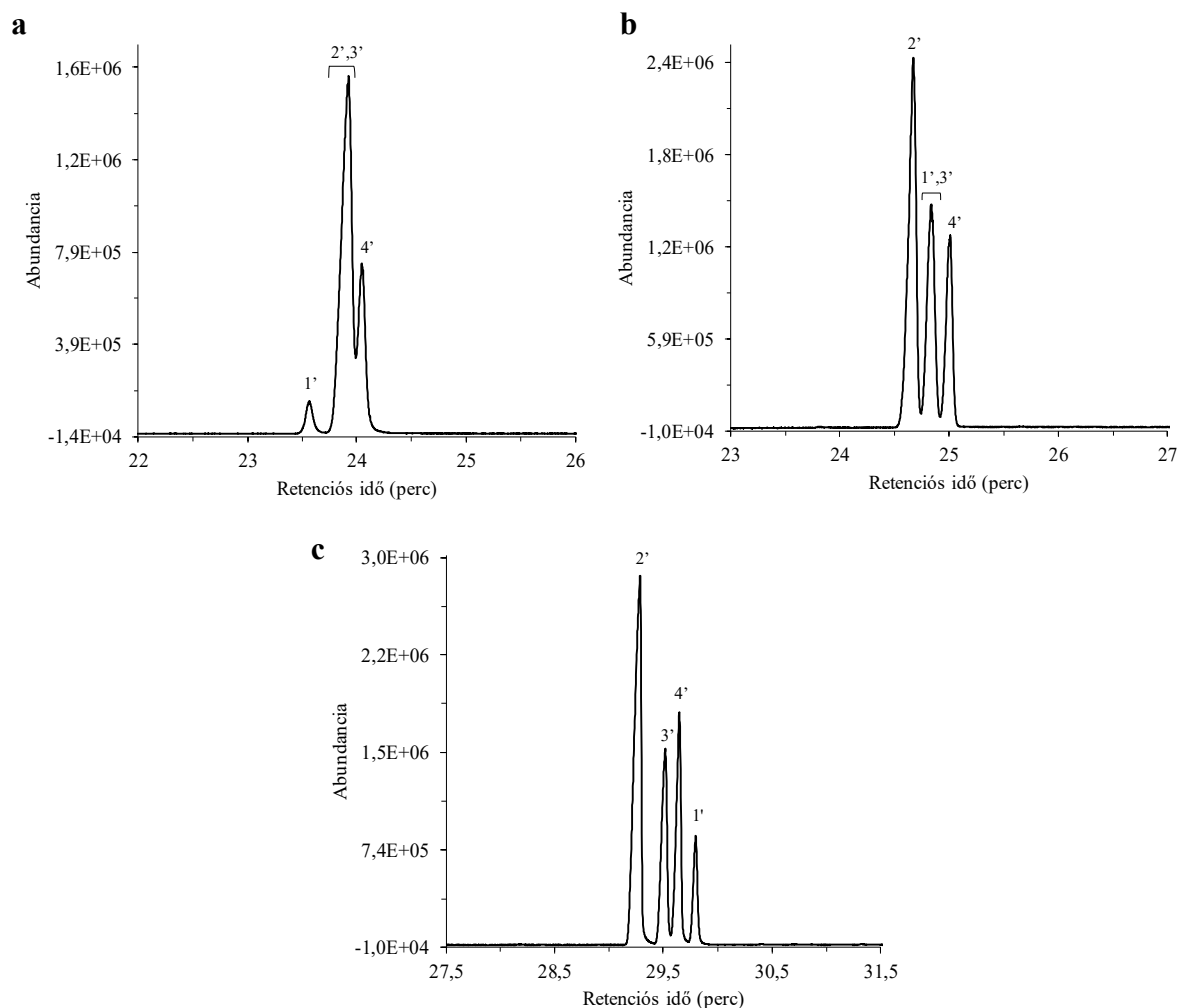
Az átfedő csúcsok retenciós idejének értékei félkövéren vannak szedve. A zsírsav-metil-észterek *cisz/transz* izomerizációját a vegyület azonosítóban is jeleztük.

A **10. ábra** a FAME komponensek teljes ionkromatogramjait mutatja a GLC-674 keverékben, a három GC-oszlopon analizálva. A csúcsjelölések megfelelnek a **4. táblázatban** szereplőkkel.



10. ábra A GLC-674 zsírsav-metil-észter keverék teljes ionkromatogramjai (a) HP-5MS, (b) DB-225MS és (c) SLB-IL111 gázkromatográfiás oszlop használatával. A csúcsok jelölései a 4. táblázatban feltüntetett komponenseket mutatják a HP-5MS oszlopon végzett elválasztás során kapott retenciós sorrend szerint. Az optimalizált kísérleti körülményeket az Anyagok és módszerek részben (4.2.2 GC-MS elemzés fejezet) részletezzük. Az elválasztás során a teljes FAME-koncentráció 0,5 mg/ml volt.

A **11. ábra** a CRM47791 keverék FAME komponenseinek teljes ionkromatogramjait mutatja be a három különböző oszlopon analizálva, ahol a csúcsok jelölései az **5. táblázatban** szereplőknek felelnek meg.



11. ábra A CRM47791 zsírsav-metil-észter keverék teljes ionkromatogramjai (a) apoláris HP-5MS oszlop, (b) közepes/nagy polaritású DB-225MS oszlop és (c) rendkívül poláris, ionfolyadék-alapú SLB-IL111 oszlop használatával. A csúcsok jelölései az 5. táblázatban felsorolt komponenseket mutatják a HP-5MS oszlopon végzett elválasztás során kapott retenciós sorrend szerint. Az optimalizált kísérleti körülményeket az Anyagok és módszerek részben részletezzük. Az elválasztás során a teljes FAME-koncentráció 80,6 µg/ml volt.

A három oszlop alkalmazásával jelentős különbségeket figyeltünk meg a C4–C24 lánc hosszúságú FAME komponensek retenciós tulajdonságaiban. A HP-5MS, azaz az apoláris tulajdonságú fenil-sziloxán oszlop használatával 43 csúcs jelent meg, lefedve a keverék 52 FAME komponensét. Kiemelendő, hogy a butánsav-metil-észter (C4:0) minden oszlopon az

oldószerrel együtt eluálódott (nem mutatva retenciót); így nem szerepel a kromatogramokon. Általánosságban megfigyelhető, hogy a HP-5MS oszlopon a telített FAME-k a telítetlenek után eluálódtak (**10a ábra**); emellett a *transz*-izomerek részleges elválasztását tapasztaltuk, mivel ezen komponensek csúcsai átfedést mutattak a *cisz*-FAME izomerek csúcsaival. A retenciós idők megnövekedtek azon FAME komponensek esetében, ahol a kettős kötés pozíciója a zsírsavlánc CH₃-csoportot tartalmazó végéhez közelebb helyezkedett el; így az (n-6)-FAME-ek mindhárom oszlopon az (n-3)-FAME-ek előtt jelentek meg. Ezenkívül a többszörösen telítetlen FAME-k jellemzően az egyszeresen telítetlen FAME-k előtt eluálódtak. Ezen az apoláris tulajdonságú állófázison a komponensek számos esetben átfedést mutattak. Példaként két csúcs három-három komponensre ölelt fel, amikor a C18:1n-9 (22. komponens), a C18:2n-6t (23. komponens) és a C18:1n-7 (24. komponens) metil-észterek átfedték egymást, valamint a C18:1n-9t (25. komponens), a C18:1n-12t (26. komponens) és a C18:1n-12 (27. komponens) metil-észterek átfedték egymást (azaz egy csúcsként eluálódtak). Négy esetben koelúciót figyeltünk meg, úgymint a C20:1n-9 (36. komponens) átfedésben volt a C20:3n-3 metil-észterrel (37. komponens), a C21:0 (40. komponens) pedig a C22:5n-6 metil-észterrel (41. komponens). Az átfedő komponensek retenciós idejét a **4. táblázat** félkövéren szedve tartalmazza.

A DB-225MS, azaz a közepes/nagy polaritású cianopropil-sziloxán oszlop alkalmazásával 47 csúcs jelent meg a vizsgálandó 52 komponensre. A megfigyelések alapján kijelenthető, hogy a telített FAME-k a telítetlenek előtt eluálódtak (**10b ábra**), valamint a *cisz* és *transz* geometriai izomerek túlnyomó többségében hatékony elválasztás érhető el. Mindazonáltal négy zsírsav-metil-észter, a C18:1n-9 (22. komponens), a C18:1n-9t (25. komponens), a C18:1n-12t (26. komponens) és a C18:1n-7t (28. komponens) átfedésben volt egymással, valamint a C20:3n-3 (37. komponens) átfedésben volt a C21:0 metil-észterrel (40. komponens).

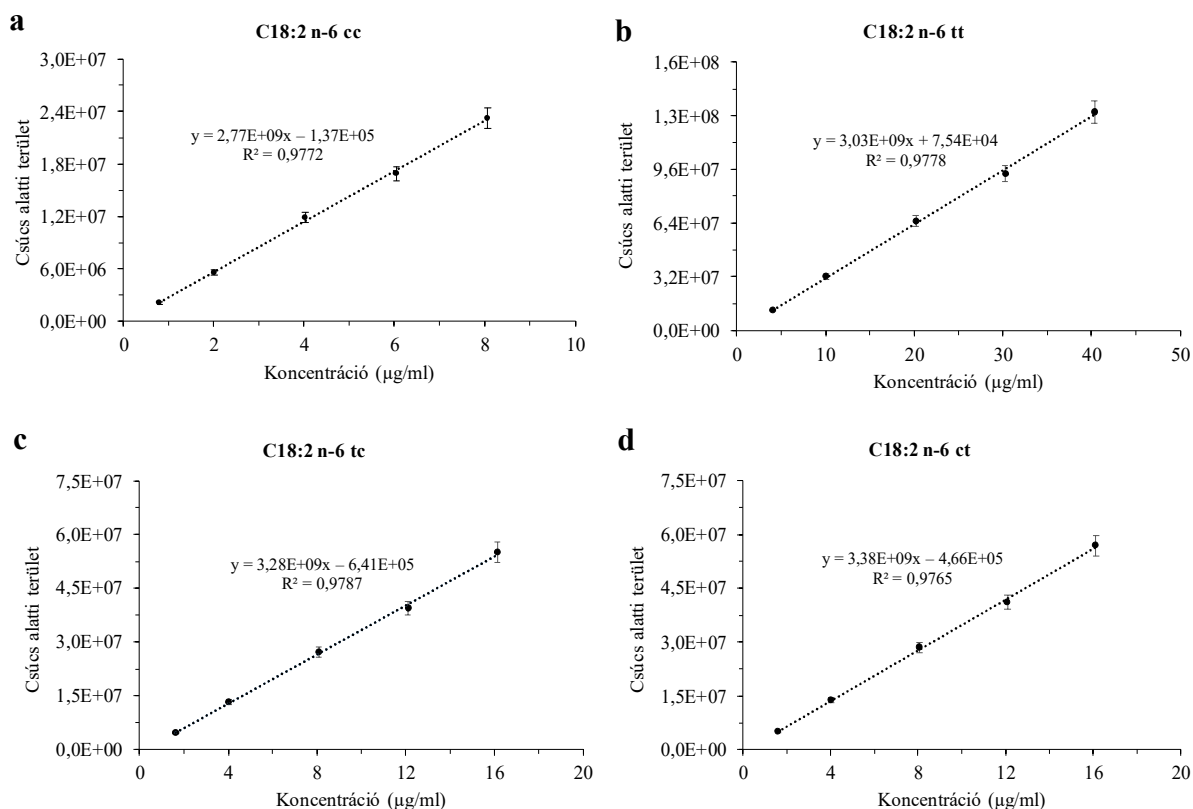
A rendkívül nagy polaritású ionfolyadék-alapú SLB-IL111 oszlop szintén mutatott átfedést a retenciós idők tekintetében, azonban ennek mértéke kisebb volt a korábbi eseteknél, itt ugyanis 48 csúcs jelent meg a kromatogramon (**10c ábra**). A tapasztalatok szerint a *cisz*-FAME izomerek minden esetben a *transz*-izomerek után eluálódtak. Három esetben figyeltünk meg koelúciót, azaz a C18:1n-7 (24. komponens) és a C18:1n-7t (28. komponens) zsírsav-metil-észterek együttesen jelentek meg; a C18:3n-6 (19. komponens) és a C20:1n-9t (38. komponens) metil-észterek azonos retenciós idővel rendelkeztek; és a C20:4n-6 (32. komponens) és a C20:3n-3 (37. komponens) metil-észterek is együtt eluálódtak.

A három oszloppal végzett kísérleteket összehasonlítva látható, hogy az SLB-IL111 és DB-225MS oszlopok elúciós tulajdonságai több hasonlóságot is mutattak. Emellett az SLB-IL111 oszlop használatával csaknem teljes elválasztást értünk el a C18 és C20 régiókban. (**10c ábra**).

A többszörösen telítetlen C18:2 (metil-linoleát) geometriai izomerjeit mindössze az SLB-IL111 oszlop alkalmazásával sikerült teljes mértékben elválasztani egymástól (**11c ábra**), a négy geometriai izomer alapvonal elválasztása nem volt lehetséges az általunk még felhasznált két oszloppal (**11a és b ábra**).

5.2.2 A kromatogramok értékelése

A **12. ábra** a CRM47791 keverék négy FAME komponensének kalibrációs görbéit mutatja az SLB-IL111 oszlopon végzett elválasztások alapján. A grafikonok tartalmazzák a görbék lineáris illesztéseit, azok egyenleteit és a hozzájuk tartozó determinációs együtthatókat (R^2). Mind a GLC-674, mind a CRM47791 keverék elválasztásának validálási adatait az alkalmazott oszlopokon az **M1. táblázat** foglalja össze (lásd Mellékletek). A kalibrációs görbék adatait az adott mérési módszer validációjához használtuk fel. Az R^2 értékek 0,91-nél, 0,98-nál és 0,96-nál magasabb volt a HP-5MS, a DB-225MS és az SLB-IL111 oszlopokkal végzett elválasztások esetén. A retenciós időt illetően a GLC-674 keverék rendszeralkalmassági RSD-értékei a HP-5MS oszlop esetében 0,00 és 0,08% között, a DB-225MS esetében 0,00 és 0,04% között, míg az SLB-IL111 oszlop esetében 0,01 és 0,05% között változtak. A CRM47791 keverék esetében ezek a tartományok a következők voltak: 0,01 és 0,02% (HP-5MS), 0,01 és 0,02% (DB-225MS), és 0,00 és 0,01% (SLB-IL111). A koncentrációt illetően a GLC-674 keverék rendszeralkalmassági RSD-értékei a HP-5MS oszlop esetében 2,08 és 3,71% között, a DB-225MS esetében 2,99 és 7,88% között, míg az SLB-IL111 oszlop esetében 2,04 és 6,81% között változtak. A CRM47791 keverék esetében ezek a tartományok a következők voltak: 2,26 és 3,06% (HP-5MS), 3,30 és 4,53% (DB-225MS), és 2,45 és 3,22% (SLB-IL111) (lásd **M1. táblázat**). A rendszeralkalmassági értékek megfeleltek az általános kritériumoknak, azaz a retenciós idők RSD-értékei 2%-nál, a koncentrációra vonatkozó RSD-értékek pedig 10%-nál alacsonyabbnak bizonyultak.



12. ábra A zsírsav-metil-észterek kalibrációs görbéi a CRM47791 keverékben. (a) C18:2n-6tt, (b) C18:2n-6tc, (c) C18:2n-6ct és (d) C18:2n-6cc zsírsav-metil-észter komponens az SLB-IL111 GC oszlopon analizálva. Az elemzés kumulatív grafikonja 0,008-0,08 mg/ml tartományban, 5 kalibrációs ponttal, három (n=3) külön kalibrációban, ahol a kalibrációs koncentrációk átlagértékeit pontok és a hozzájuk tartozó hibák (\pm SD) jelölik.

A FAME komponensekre vonatkozó relatív hibával (RSD) kifejezett ismételhetőség átlagértékeket, valamint az átlagos pontosság (%) értékeket az **M1. táblázat** foglalja össze. Amint a táblázatból látható, a GLC-674 keverék napon belüli ismételhetőség RSD-értékei a HP-5MS oszlop esetében 4,99 és 9,98% között; a DB-225MS oszlop esetében 2,89 és 8,97%; az SLB-IL111 oszlop esetében 2,69 és 8,04% között változtak. A CRM47791 keverék esetében ezek a tartományok a következők voltak: 1,61 és 4,63% (HP-5MS); 1,27 és 1,67% (DB-225MS,); 0,64 és 1,14% (SLB-IL111).

A GLC-674 keverék napok közötti ismételhetőség RSD-értékei a HP-5MS oszlop esetében 4,27 és 9,11% között; a DB-225MS oszlop esetében 1,45 és 8,51% között; az SLB-IL111 oszlop esetében 1,22 és 4,15% között változtak. A CRM47791 keverék esetében ezek a tartományok a következők voltak: 2,54 és 3,96% (HP-5MS); 1,01 és 1,73% (DB-225MS); 1,32 és 1,89% (SLB-IL111). A napon belüli és a napok közötti ismételhetőség értékek megfeleltek az általános

kritériumoknak, azaz a koncentrációra vonatkozó RSD-értékek 10%-nál alacsonyabbnak bizonyultak.

A GLC-674 keverék átlagos pontosság értékei a HP-5MS oszlop esetében 101,8 és 108,8% között; a DB-225MS oszlop esetében 95,1 és 105,3% között; az SLB-IL111 oszlop esetében 96,1 és 109,5% között változtak. A CRM47791 keverék esetében ezek a tartományok a következők voltak: 92,9 és 112,7% (HP-5MS); 110,6 és 117,1% (DB-225MS); 98,1 és 100,8% (SLB-IL111). Az átlagos pontosság értékek megfeleltek az általános kritériumoknak, azaz 80 és 120% közötti értékeket vettek fel.

A GLC-674 keverék LOD-értékei a HP-5MS oszlop esetében 0,18 és 0,91 µg/ml között; a DB-225MS oszlop esetében 0,45 és 0,60 µg/ml között; az SLB-IL111 oszlop esetében 0,02 és 0,18 µg/ml között változtak. A LOQ-értékek esetében ezek a tartományok a következők voltak: 1,23 és 2,90 µg/ml (HP-5MS); 1,36 és 1,91 µg/ml (DB-225MS); 0,26 és 0,77 µg/ml (SLB-IL111). A CRM47791 FAME keverék LOD és LOQ értékeit a **6. táblázat** tartalmazza.

6. táblázat A CRM47791 zsírsav-metil-észter keverék komponenseinek kimutatási (LOD) és meghatározási (LOQ) határ értékei a három oszlopra optimalizált GC-MS módszerrel meghatározva. Az optimalizált kísérleti körülményeket az Anyagok és módszerek részben részletezzük.

Vegyület azonosító	HP-5MS		DB-225MS		SLB-IL111	
	LOD ^a (g/ml)	LOQ ^b (g/ml)	LOD ^a (g/ml)	LOQ ^b (g/ml)	LOD ^a (g/ml)	LOQ ^b (g/ml)
C18:2n-6cc	0,33	0,98	0,51	1,20	0,26	0,74
C18:2n-6tt	1,19	3,91	3,01	6,33	0,35	1,38
C18:2n-6tc	0,46	1,67	0,97	2,96	0,09	0,47
C18:2n-6ct	0,43	2,15	1,02	2,41	0,15	0,93

^a A LOD értékek a jel/zaj arány > 3 esetén lettek meghatározva.

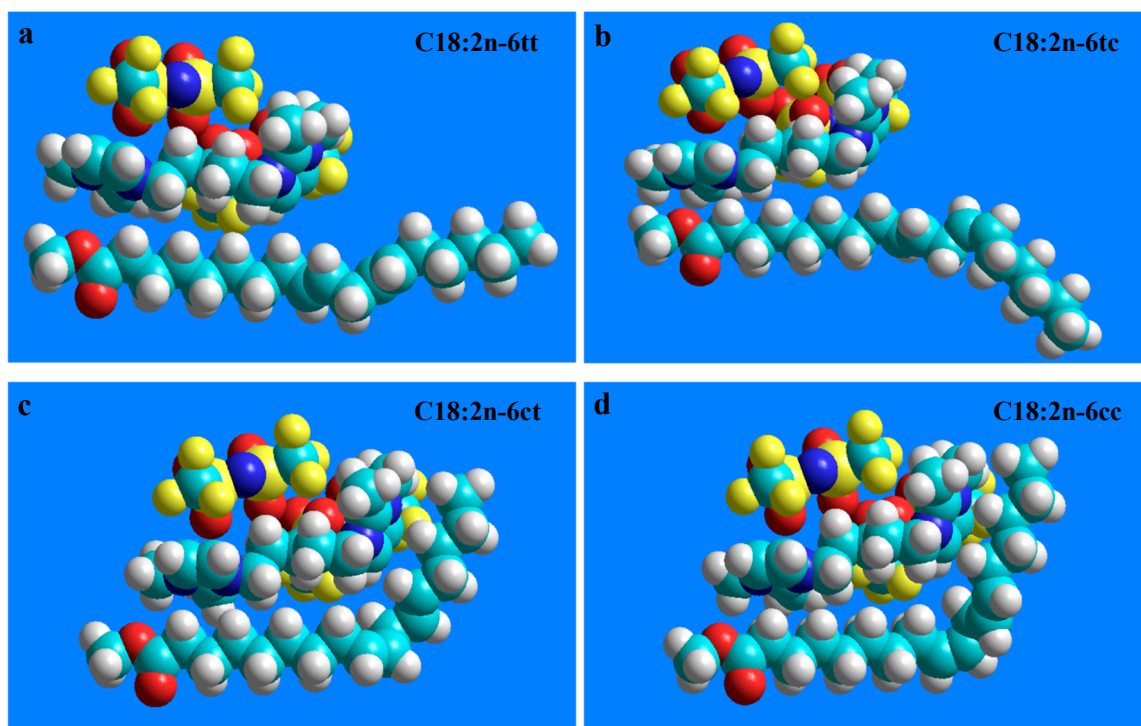
^b A LOQ értékek a jel/zaj arány > 10 esetén lettek meghatározva.

A különböző oszlopok elválasztási hatékonyságát az elméleti tányérszám (N) és aszimmetria faktor (As) paraméterek meghatározásával is értékeltük. Az elméleti tányérszám, amely a kromatográfiás oszlopok elválasztóképességét számszerűsíti, 150000 és 350000 közötti tartományba esett, amely elfogadhatónak tekinthető a GC-MS kísérletek esetében. Ezek az adatok azonban önmagukban nem elegendőek egy adott oszlop kiválasztásához, tekintettel az optimalizált kísérleti paraméterek különbségeire. Az aszimmetria faktor értéke optimális esetben 1-hez közelít. Az SLB-IL111 oszlop esetében az aszimmetria faktor csökkenését figyeltük meg a kromatogramokban, amikor a kiválasztott komponensek retenciós viselkedését

hasonlítottuk össze a különböző kísérletekben. Ugyanakkor minden alapvonal elválasztású komponens esetében a csúcsok aszimmetria faktor értékei 0,7 felett adódtak.

5.2.3 Az ionfolyadék-FAME kölcsönhatások

A CRM47791 zsírsav-metil-észter keverék ionfolyadék-alapú oszlopon mutatott kiváló elválasztásából adódóan megalkottuk az 1,5-di-(2,3-dimetil-imidazólium)pentán bisz-((trifluorometil)sulfonil)imid ionfolyadék és a C18:2 FAME izomerek (C18:2n-6cc, C18:2n-6tt, C18:2n-6tc és C18:2n-6ct) háromdimenziós modelljeit, valamint a molekulák lehetséges egymáshoz viszonyított helyzeteit. Ez a modellezés segít, hogy jobban megértsük a molekulák térbeli elrendeződését és az egymás között kialakuló kölcsönhatásokat a kromatográfias elválasztás során. A **13. ábra** a legalacsonyabb energiájú, azaz legstabilabb struktúrákat mutatja be, hangsúlyozva azokat a molekularészeket, amelyek feltehetően részt vesznek az állófázis-FAME kölcsönhatásokban.



13. ábra Az 1,5-di-(2,3-dimetil-imidazólium)pentán bisz-((trifluorometil)sulfonil)imid ionfolyadék és (a) C18:2n-6tt, (b) C18:2n-6tc, (c) C18:2n-6ct, (d) C18:2n-6cc linolsav-metil-észter geometriai izomerek egymáshoz viszonyított lehetséges elhelyezkedési modelljei. A molekulák egymáshoz viszonyított helyzetét MM+ molekula mechanikai erőter módszerrel optimalizáltuk.

A legalacsonyabb energiájú szerkezetek azt mutatják, hogy az anionok energetikailag legkedvezőbb helyzetben az imidazólium gyűrű síkja felett helyezkednek el, így a komponensekkel kialakuló kölcsönhatások, amelyek az elválasztást befolyásolják, feltehetően az ionfolyadék kationon keresztül az imidazólium gyűrűvel és a pentán szénlánccal jöhetnek létre.

5.3 A tenyésztési körülmények hatásának vizsgálata baktériumok és bakteriális endotoxinok zsírsavösszetételére gázkromatográfiás-tömegspektrometriás módszerrel

5.3.1 Az ionfolyadék-alapú oszlopon történő elválasztás bemutatása

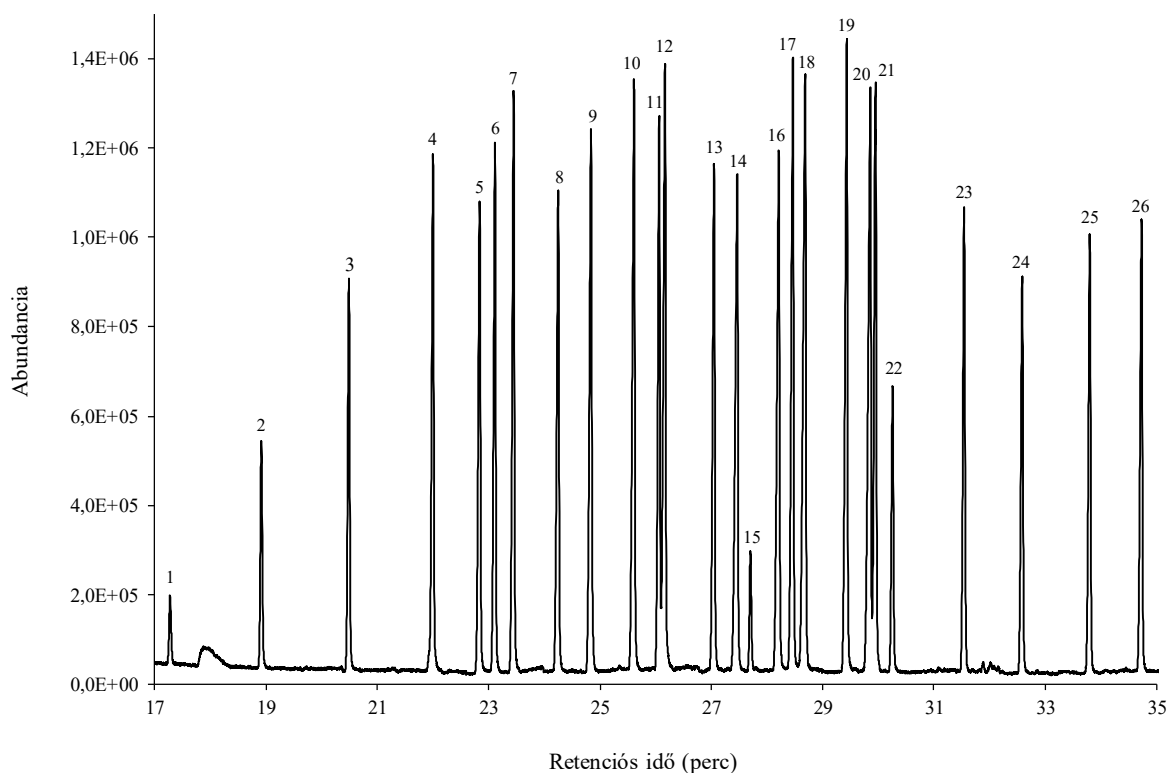
Kutatásunk során a tenyésztési körülmények zsírsavösszetételre gyakorolt hatását vizsgáltuk meg a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 baktérium, a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 lipopoliszacharid, a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, a *Pseudomonas aeruginosa* polirezisztens és a *Pseudomonas putida* baktériumok esetében, GC-MS módszerrel (Mező, és mtsai., 2022.). A tenyésztési körülmények hatását agar és véres agar táptalajon, eltérő hőmérsékletek (25 °C, 37 °C, 42 °C) mellett, valamint a beoltást követő 1., 3. és 5. napon követtük nyomon. A zsírsavakat metil-észter formában elemeztük, és az elválasztásokhoz egy 60 m hosszúságú, rendkívül nagy polaritással rendelkező ionfolyadék-alapú (SLB-IL111) oszlopot használtunk. A kidolgozott analitikai módszert egy 26 komponensű bakteriális zsírsav-metil-észter keverék (Bacterial Acid Methyl Esters CP Mixture – BAME CP Mix) segítségével validáltuk az Anyagok és Módszerek részben leírtak szerint. Az elválasztott komponenseket a keverékben mutatott relatív koncentrációjuk, valamint a tömegspektrumuk alapján azonosítottuk. A **7. táblázat** a komponensek listáját tartalmazza a retenciós idők sorrendjében, míg a **14. ábra** a keverék teljes ionkromatogramját szemlélteti.

7. táblázat A BAME CP Mix zsírsav-metil-észter keverék komponenseinek listája és a hozzájuk tartozó retenciós idő értékek a 60 m hosszúságú, ionfolyadék-alapú SLB-IL111 oszlopot alkalmazva GC-MS módszerrel. Az optimalizált módszer kísérleti körülményeit a 4.3.6 GC-MS elemzés fejezetben részletezzük.

Csúcs jel	Vegyületazonosító	Név	Retenciós idő (perc) *
1	C11:0	metil-undekanoát	17,28
2	C12:0	metil-dodekanoát	18,92
3	C13:0	metil-tridekanoát	20,49
4	C14:0	metil-tetradekanoát	22,01
5	<i>i</i> C15:0	metil-13-metil-tetradekanoát	22,84
6	<i>ai</i> C15:0	metil-12-metil-tetradekanoát	23,12
7	C15:0	metil-pentadekanoát	23,45
8	<i>i</i> C16:0	metil-14-metil-pentadekanoát	24,26
9	C16:0	metil-hexadekanoát	24,85
10	<i>i</i> C17:0	metil-15-metil-hexadekanoát	25,62
11	C16:1n-7	metil-hexadecenoát (<i>cisz</i> -9)	26,07

12	C17:0	metil-heptadekanoát	26,18
13	C17:0 Δ	metil- <i>cisz</i> -9,10-metilén-hexadekanoát	27,05
14	C18:0	metil-oktadekanoát	27,48
15	2-OH C10:0	2-hidroxi-metil-dekanoát	27,70
16	C18:1n-9t	metil-oktadecenoát (<i>transz</i> -9)	28,22
17	C18:1n-9	metil-oktadecenoát (<i>cisz</i> -9)	28,47
18	C19:0	metil-nonadekanoát	28,70
19	C19:0 Δ	metil- <i>cisz</i> -9,10-metilén-oktadekanoát	29,44
20	C20:0	metil-eikozanoát	29,86
21	C18:2n-6cc	metil-oktadekadienoát (<i>cisz</i> , <i>cisz</i> -9,12)	29,96
22	2-OH C12:0	2-hidroxi- metil-dodekanoát	30,26
23	3-OH C12:0	3-hidroxi- metil-dodekanoát	31,55
24	2-OH C14:0	2-hidroxi- metil-tetradekanoát	32,59
25	3-OH C14:0	3-hidroxi- metil-tetradekanoát	33,80
26	2-OH C16:0	2-hidroxi- metil-hexadekanoát	34,73

* A retenciós idők relatív hibája (RSD) kevesebb, mint 0,2% volt.



14. ábra A BAME CP Mix standard keverék teljes ionkromatogramja GC-MS módszerrel, ionfolyadék-alapú SLB-IL111 oszlop használatával. A csúcsok jelölései a 7. táblázatban feltüntetett komponenseket mutatják a kapott retenciós sorrend szerint. Az optimalizált kísérleti körülményeket az Anyagok és módszerek részben (4.3.6 GC-MS elemzés fejezet) részletezzük. Az elválasztás során a teljes FAME-koncentráció 0,5 mg/ml volt.

Az SLB-IL111 oszlop a telített, egyszeresen telítetlen (*cisz*, *transz*), többszörösen telítetlen, elágazó (*izo*, *anteizo*), hidroxil- és ciklopropán-zsírsavakat is tartalmazó 26 zsírsav-metil-észter komponens elválasztásában mindössze két eset kivételével (11–12. és 20–21. komponens) alapvonal elválasztást biztosított. Ez utóbbi esetekben a csúcsok enyhe átfedését tapasztaltuk ($R_{11,12} = 1,21$; $R_{20,21} = 1,05$). Az optimalizált és validált elválasztási módszer alapján a telített zsírsav-metil-észter komponensek a telítetlen megfelelőjük előtt, a hidroxil-csoportot tartalmazó komponensek pedig jóval a megfelelő telített zsírsav-metil-észter komponensek után eluálódtak. Az oktadekanoát (C18) komponens példáját tekintve, az egyszeresen telítetlen *cisz* izomer a telített és az egyszeresen telítetlen *transz* izomer után vált le az oszlopról, míg az oktadekadienoát (C18:2cc) komponens a standard keverékben található valamennyi C18 izomer után eluálódott.

5.3.2 A kromatográfias módszer értékelése

A kidolgozott kromatográfias módszer validálását a BAME CP Mix standard keverék felhasználásával végeztük, a kalibrációs görbék egyenleteinek és determinációs együtthatóinak (R^2), valamint további validációs paraméterek (napon belüli és napok közötti ismételhetőség, rendszeralkalmasság és átlagos pontosság) meghatározásával. A validálási adatokat az **M2. táblázat** foglalja össze részletesen (lásd Mellékletek).

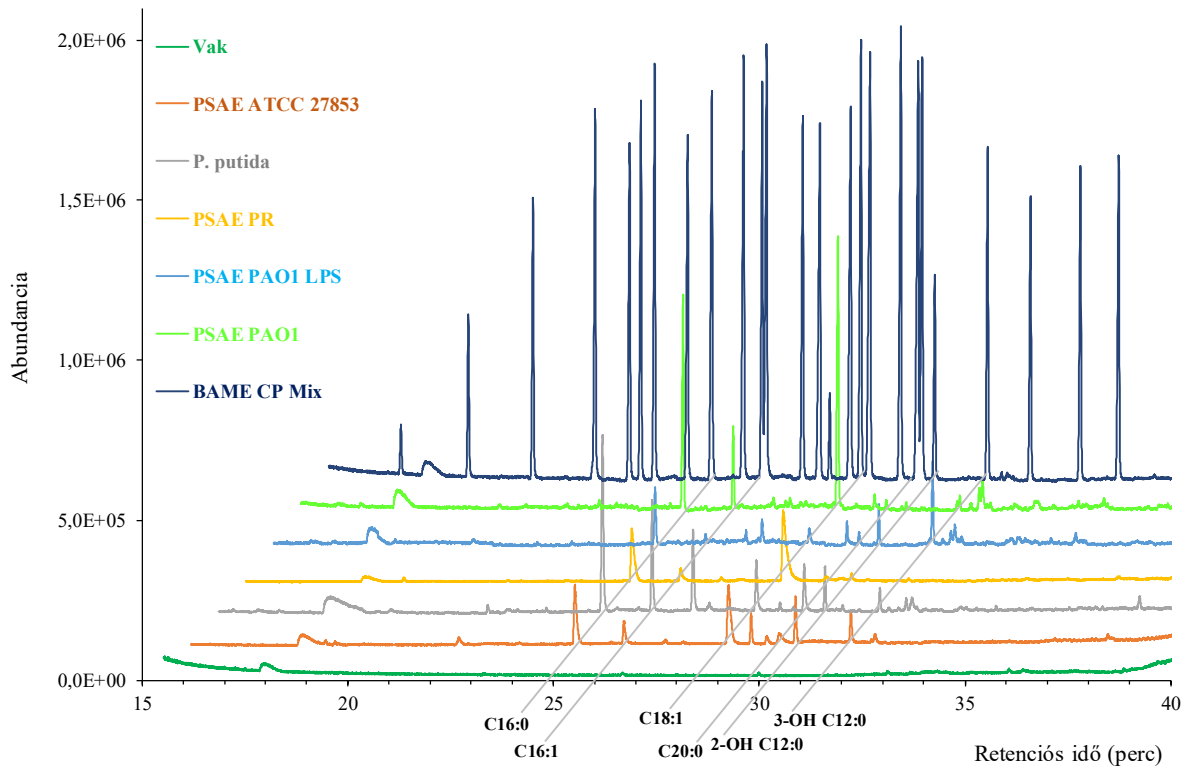
A zsírsav-metil-észter meghatározás lineáris válaszát kalibrációs görbékkel jellemeztük, ahol a válaszjel a koncentráció változásával minden esetben egyenesen arányosan nőtt, és az R^2 értékek rendre 0,95-nél magasabbnak adódtak. A rendszeralkalmasságot a retenció idő (0,01 és 0,03% között) és a koncentráció (4,08 és 9,7% között) relatív hiba százalékban kifejezett értékeivel (RSD) jellemeztük, amelyek megfeleltek az általánosan elfogadott kritériumoknak ($RSD < 2\%$ a retenció időre és $RSD < 10\%$ a koncentrációra vonatkozóan). A napon belüli és a napok közötti ismételhetőségi kísérletek során a koncentrációkra vonatkozó RSD-értékek 2,15 és 7,15% között változtak, ahol általános kritériumként a $RSD < 10\%$ feltételt vettük alapul. Az átlagos pontosság RSD-értékei 91,9 és 104,7% között változtak, ahol a 80 és 120% közötti értékek az elfogadhatóak. A komponensek LOD értékei 0,03 és 0,27 $\mu\text{g/ml}$ között, míg az LOQ értékek 0,11 és 0,80 $\mu\text{g/ml}$ között változtak. A BAME CP Mix standard keverék LOD és LOQ értékeit az **M3. táblázat** tartalmazza.

5.3.3 *A baktériumok zsírsavprofilja*

Az optimalizált és validált módszer felhasználásával 25, 37 és 42 °C hőmérsékleten, agar és véres agar táptalajon, valamint 1, 3 és 5 napos inkubációs idővel tenyésztett *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (PSAE PAO1) baktérium és lipopoliszacharidjai (PSAE PAO1 LPS), *Pseudomonas* ATCC 27853 (PSAE ATCC 27853), *Pseudomonas putida* (*P. putida*) és *Pseudomonas aeruginosa* polirezisztens (PSAE PR) baktériumok zsírsavprofilját határoztuk meg. A zsírsavakat a baktériumokból extraháltuk, majd a metil-észter származékképzést követően GC-MS módszerrel analizáltuk. Az extrakciós és derivatizálási eljárások részleteit az Anyagok és Módszerek fejezetben ismertettem. A komponenseket a tömegspektrumok, illetve a retenciós idők segítségével azonosítottuk, amelyhez a BAME CP Mix és GLC-463 referencia standard keverékkel kapott eredményeket használtuk fel. Ez utóbbi keverék olyan zsírsavmetil-észtereket tartalmaz, amelyek nem szerepelnek a BAME CP Mix keverékben, azonban előfordulhatnak a baktérium mintákban.

5.3.3.1 *Az optimális körülmények bemutatása*

A *P. aeruginosa* in vitro tenyésztésére vonatkozó ajánlásoknak megfelelően (LaBauve & Wargo, 2012.) a tenyésztés optimális körülményeinek a 37 °C-os tenyésztési hőmérsékletet, az agar táptalajt és az egynapos inkubációs időt tekintettük. Az ilyen kísérleti körülmények között regisztrált teljes ionkromatogramokat a **15. ábra** foglalja össze.



15. ábra A vizsgált *Pseudomonas* baktériumtörzsek és a PSAE PAO1 LPS (37 °C-on, agar táptalajon, és az inkubáció első napján mintavételezve), valamint a BAME CP Mix standard keverék és a vakminta (a táptalaj felülete baktérium nélkül) teljes ionkromatogramja GC-MS módszerrel, ionfolyadék-alapú SLB-IL111 oszlop használatával. A főbb zsírsavkomponenseket a különböző mintákban feltüntettük. Az optimalizált kísérleti körülményeket az Anyagok és módszerek részben (4.3.6 GC-MS elemzés fejezet) részletezzük.

A zsírsavak közül legnagyobb arányban a telített (SAFA - 60,6%), az egyszeresen telítetlen (MUFA - 24,4%) és a hidroxizsírsavak (9,0%) fordultak elő az izolátumokban (lásd **8. táblázat**). Kimutathatók voltak továbbá a ciklopropán-zsírsavak (8,0%) is, kivéve a *P. aeruginosa* polirezisztens esetét. Az ideális körülmények között legnagyobb arányban a hosszú szénláncú zsírsavak (LCFA), míg kis mértékben a közepes szénláncú zsírsavak (MCFA) voltak jelen az izolátumokban. A nagyon hosszú szénláncú zsírsavak (VLCFA) csak a *P. aeruginosa* ATCC 27853 baktériumban voltak kimutathatók, valamint rövid szénláncú zsírsavakat (SCFA) egyáltalán nem azonosítottunk az elemzések során.

8. táblázat A zsírsav-metil-észterek százalékos előfordulása a *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. putida* és *P. aeruginosa* polirezisztens baktériumokból származó mintákban a csúcs alatti terület alapján. A baktériumokat 37 °C-on, agar táptalajon tenyésztettük, a zsírsavakat a beoltást követő első napon extraháltuk. Az eredmények három párhuzamos mérésből származnak, ahol a relatív szórás kisebb, mint 2% volt.

Zsírsavak	PSAE PAO1	PSAE ATCC 27853	<i>P. putida</i>	PSAE PR	Átlag
a teljes zsírsavtartalom %-a					
Σ Telített zsírsavak (SAFAs)	36,1	68,6	46,1	91,5	60,6
Σ Egyszeresen telítetlen zsírsavak (MUFAs)					
- <i>cisz</i>	55,9	7,2	28,2	6,4	24,4
Σ Hidroxi-zsírsavak	4,3	19,8	10,6	2,1	9,0
Σ Ciklopropán-zsírsavak	3,8	4,7	15,6	-	8,0
Σ Többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFAs)	-	0,8	-	-	0,8
Σ Kis szénláncú zsírsavak (SCFAs)	-	-	-	-	-
Σ Közepes szénláncú zsírsavak (MCFAs)	4,3	20,9	10,1	2,1	9,3
Σ Hosszú szénláncú zsírsavak (LCFAs)	95,8	77,2	90,0	97,9	90,2
Σ Nagyon hosszú szénláncú zsírsavak (VLCFAs)	-	3,0	-	-	0,7

A tenyésztési hőmérséklet 25 °C-ról 42 °C-ra emelésével egyértelműen megfigyelhető volt az egyenes láncú SAFA zsírsavak koncentrációjának növekedése a vizsgált *Pseudomonas* fajok esetében, míg a MUFA zsírsavak koncentrációja csökkent. Elágazó láncú telített zsírsavak (*izo* formában) mindössze a *P. putida* esetében, 42 °C-on voltak azonosíthatók, míg a PUFA zsírsavak csupán a *P. aeruginosa* ATCC 27853 baktériumban, 37 °C-on voltak kimutathatók. A hidroxi-zsírsavak koncentrációja a hőmérséklet változásával változatlan maradt. A ciklopropán-zsírsavak tekintetében a koncentráció kezdeti növekedését, majd csökkenését figyeltük meg a hőmérséklet emelkedésével. A LCFA zsírsavak aránya minden hőmérsékleten és minden vizsgált baktérium esetében kiemelkedően magas volt.

A telített zsírsavak aránya a hőmérséklet emelkedésével a *P. aeruginosa* PAO1 és *P. putida* esetében növekedett, míg a *P. aeruginosa* polirezisztens esetében csökkent. A C16:0 karakterisztikus zsírsav előfordulása a *P. aeruginosa* ATCC 27853, a *P. aeruginosa* PAO1 és a *P. aeruginosa* polirezisztens baktériumokban nőtt, míg a *P. putida* esetében 25 és 37 °C között növekedés, majd 42 °C-on csökkenés volt megfigyelhető. A C16:1c zsírsav aránya általánosan

csökkent a hőmérséklet emelkedésével. A 2-OH C12:0 aránya vagy növekedést mutatott a hőmérséklettel (*P. aeruginosa* PAO1), vagy a kezdeti növekedést követő csökkenés jellemezte (*P. aeruginosa* ATCC 27853). A 3-OH C12:0 koncentrációja közel változatlan maradt a *P. aeruginosa* PAO1 és *P. putida* baktériumok esetében, míg a *P. aeruginosa* ATCC 27853 esetében 37 °C-on jelentkezett a zsírsav maximális előfordulása.

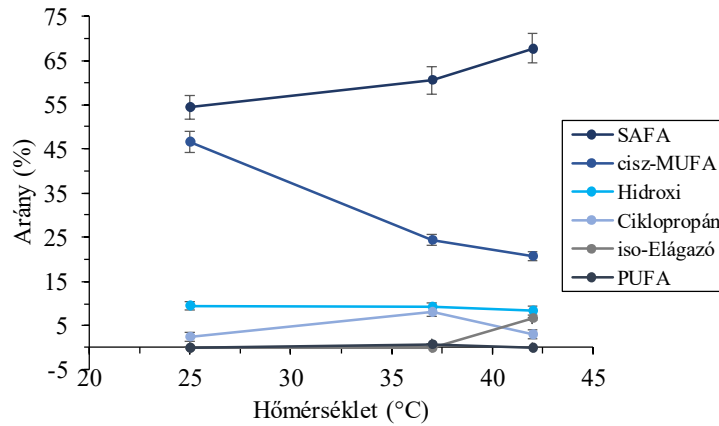
5.3.3.2 *A tenyésztési hőmérséklet hatása a baktériumok zsírsavösszetételére*

A baktériumkultúrákat három hőmérsékleten, 25 °C, 37 °C és 42 °C-on inkubáltuk, agar táptalajon. Az eltérő tenyésztési hőmérséklet alkalmazása által bekövetkezett változásokat a vizsgált baktérium izolátumok teljes zsírsav-összetételében a **9. táblázat** foglalja össze. Az egyes zsírsavcsoportok arányának átlagos változásait a hőmérséklet függvényében a **16. ábra** mutatja be.

9. táblázat A zsírsav-metil-észterek csúcs alatti terület százaléka a *P. aeruginosa* PAO1 (PSAE PAO1), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PSAE ATCC 27853), *P. putida* és *P. aeruginosa* polirezisztens (PSAE PR) baktériumokból, valamint a *P. aeruginosa* PAO1 endotoxinból (PSAE PAO1 LPS) származó mintákban. A baktériumokat 25, 37 és 42 °C-on, agar táptalajon tenyésztettük, a zsírsavakat a beoltást követő első napon extraháltuk. Az eredmények három párhuzamos mérésből származnak, ahol a relatív szórás kisebb, mint 2% volt.

Zsírsavak	PSAE PAO1			PSAE PAO1 LPS			PSAE ATCC 27853			<i>P. putida</i>			PSAE PR			Retenciósi idő (perc)
	25 °C	37 °C	42 °C	25 °C	37 °C	42 °C	25 °C	37 °C	42 °C	25 °C	37 °C	42 °C	25 °C	37 °C	42 °C	
a teljes zsírsavtartalom %-a																
Telített zsírsavak (SAFAs)																
C11:0	-	-	-	33,6	-	46,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17,28
C12:0	-	-	-	-	-	-	-	1,1	-	-	-	-	-	-	-	18,92
C14:0	-	-	-	-	-	-	-	3,6	-	-	1,3	-	-	-	-	22,01
C15:0	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	0,7	-	-	-	-	23,45
C16:0	18,8	32,6	39,5	10,1	20,6	5,3	14,1	23,2	27	17,9	33,1	11,6	12,6	30,9	37,3	24,85
C17:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,8	10,1	-	-	26,18
C18:0	-	1,9	1,7	7,6	8,3	7,3	-	1,2	-	1,1	1,9	16,1	42,1	-	-	27,48
C19:0	-	-	-	-	-	-	39,7	28,3	36,7	-	-	-	19,0	57,0	46,0	28,70
C20:0	-	1,6	-	-	5,5	3,8	14,1	7,4	19,9	18,3	9,1	31,5	8,4	3,5	-	29,86
Egyszeresen telítetlen zsírsavak (MUFAs)																
<i>-cisz</i>																
C16:1c	26,7	11,1	8,3	4,9	2,8	3,7	22,3	7,2	7,3	35,1	18,0	-	-	6,4	10,6	26,07
C18:1c	47,4	44,7	39,9	7,4	6,3	7,5	-	-	-	8,3	10,2	16,6	-	-	-	28,47
Elágazó zsírsavak																
<i>-iso</i>																
i C15:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2	-	-	-	22,84
i C16:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,6	-	-	-	24,26
i C17:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-	25,62
Hidroxi-zsírsavak																
2-OH C10:0	-	1,2	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27,70
2-OH C12:0	1,0	1,0	2,9	16,3	13,5	2,5	6,3	11,6	4,4	11,4	6,4	-	-	2,1	4,3	30,26
3-OH C12:0	3,2	2,0	3,9	20,0	29,6	4,1	2,2	8,2	1,7	5,7	3,7	4,6	-	-	1,8	31,55
2-OH C14:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,7	7,8	-	-	32,59
3-OH C14:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,3	-	-	-	33,80
Ciklopropán-zsírsavak																
C17:0Δ	-	1,3	1,3	-	4,7	-	-	1,6	1,2	2,3	14,9	-	-	-	-	27,05
C19:0Δ	2,8	2,5	1,7	-	8,7	-	-	3,1	1,8	-	0,6	-	-	-	-	29,44
Többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFAs)																
C20:2cc	-	-	-	-	-	19,8	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	32,06

Σ SAFA	18,8	36,1	41,1	51,3	34,3	62,4	69,2	68,6	83,6	37,3	46,1	63,1	92,2	91,5	83,3
Σ <i>cisz</i> -MUFA	74,1	55,9	48,3	12,3	9,1	11,2	22,3	7,2	7,3	43,3	28,2	16,6	-	6,4	10,6
Σ Hidroxi	4,2	4,2	7,5	36,4	43,1	6,6	8,5	19,8	6,1	17,1	10,1	13,7	7,8	2,1	6,0
Σ Ciklopropán	2,8	3,8	3,0	-	13,4	-	-	4,7	3	2,3	15,6	-	-	-	-
Σ PUFA	-	-	-	-	-	19,8	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-
Σ MCFA	4,2	4,2	7,5	70,0	43,1	52,6	8,5	20,9	6,1	17,1	10,1	4,6	-	2,1	6,0
Σ LCFA	95,8	95,8	92,5	30,0	56,9	47,4	90,2	77,2	93,9	82,9	89,9	95,4	100,0	97,9	94,0
Σ VLCFA	-	-	-	-	-	-	1,3	3	-	-	-	-	-	-	-



16. ábra A tenyésztési hőmérséklet hatása a 25, 37 és 42 °C-on tenyésztett baktériumokban (*P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. putida* és *P. aeruginosa* polirezisztens) található zsírsavak átlagos százalékos arányára (a teljes zsírsavtartalom %-a), agar táptalajon és az inkubáció első napján mintavételezve. Az eredmények három párhuzamos mérésből (n = 3) származnak, ahol a százalékos arányok átlagértékeit pontok és a hozzájuk tartozó hibák (\pm SD) jelölik. Az optimalizált kísérleti körülményeket az Anyagok és módszerek részben (4.3.6 GC-MS elemzés fejezet) részletezzük.

A fent említett körülmények mellett 23 különböző, 11-22 szénatomot tartalmazó zsírsavat detektáltunk a *Pseudomonas* nemzetség öt baktérium izolátumában. Minden izolátumban kimutatható volt a 2-OH C12:0, C16:1c, C16:0 és C20:0 zsírsav (**9. táblázat**). A domináns zsírsav a PSAE ATCC 27853 és PSAE PR baktériumok esetében a C19:0, a PSAE PAO1 baktériumban a C18:1(n-7), a *P. putida* esetén a C16:0, valamint a PSAE PAO1 lipopoliszacharidjában a 3-OH C12:0 zsírsav volt.

Az egyenes láncú SAFA-k közül a C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C18:0, C19:0, C20:0, és C22:0 zsírsavakat azonosítottuk az izolátumokban. A C12:0 és C22:0 telített zsírsavakat csak a PSAE ATCC 27853 baktérium termelte, azonban előbbi mindössze ~1%-ban volt kimutatható. A C14:0 és C15:0 zsírsavak kizárólag a PSAE ATCC 27853 és a *P. putida* baktériumokban voltak jelen. A C19:0 zsírsavat csupán a PSAE ATCC 27853 és a PSAE PR baktériumok tartalmazták. A C16:0 és C20:0 zsírsavakat minden vizsgált baktérium esetében megjelentek. A C18:0 zsírsav minden baktériumban megtalálható volt, kivéve a PSAE PR esetét. Elágazó láncú SAFA zsírsavakat, beleértve az *izo*- és *anteizo*-izomereket a vizsgált baktériumok egyikében sem mutattunk ki.

A C16:1c egyszeresen telítetlen *cisz* zsírsavkomponens, a minden izolátum esetében kimutatható, jellegzetes zsírsavak közé tartozik. A C18:1c megtalálható volt a *P. putida*

baktériumban, valamint a PSAE PAO1 baktériumban és LPS-eiben, ezen belül is a PSAE PAO1 fő zsírsavkomponense 47,75% arányban. *Transz*-MUFA zsírsavat egyetlen baktérium izolátum esetében sem mutattunk ki.

Míg a hidroxizsírsavak közül a 2-OH C12:0 zsírsavat minden baktérium izolátumban azonosítottuk, addig a 3-OH C12:0 zsírsavat a PSAE PR nem termelte. Továbbá a 2-OH C10:0 hidroxizsírsav csak a PSAE PAO1 baktériumban volt megtalálható.

Hasonlóképpen, a C17:0 Δ és C19:0 Δ ciklopropán-zsírsavak hiányoztak a PSAE PR baktérium esetében, míg minden egyéb izolátumban kimutathatóak voltak.

A C20:2(n-6) többszörösen telítetlen zsírsav mindössze a PSAE ATCC 27853 baktériumban volt jelen, szinte elhanyagolható, 0,8%-os előfordulási aránnyal.

A PSAE PAO1 baktérium és LPS-ei összehasonlítása esetén megfigyeltük, hogy míg a baktériumok fő zsírsavkomponense a C18:1c, addig az LPS legnagyobb mennyiségben előforduló zsírsava a 3-OH C12:0 volt. Ezenkívül a baktériumok esetében az LCFA zsírsavak, az LPS esetében pedig az MCFA zsírsavak domináltak.

A tenyésztési hőmérséklet 25 °C-ról 42 °C-ra emelése változást eredményezett a telített, telítetlen, elágazó, hidroxizsír- és ciklopropán-zsírsavak eloszlásában egyaránt (**16. ábra**).

A PSAE PAO1 baktérium esetében a 2-OH C10:0, a C17:0 Δ és a C18:0 zsírsavak akkor szintetizálódtak, amikor a tenyésztési hőmérséklet 37 °C-ról 42 °C-ra emelkedett, valamint a C20:0 zsírsav mindössze 37 °C-on jelent meg. Összehasonlításképpen, a PAO1 LPS-ek csupán 37 °C-on képeztek C17:0 Δ és C19:0 Δ zsírsavakat, a C20:2(n-6) pedig csak 42 °C-on volt jelen. Ezenfelül, a C20:0 zsírsav mindössze akkor szintetizálódott, amikor a hőmérséklet 37 °C-ról 42 °C-ra emelkedett. A PSAE ATCC 27853 az alábbi új zsírsavakat termelte a 37 °C-os tenyésztési hőmérséklet esetén: C12:0, C14:0, C15:0, C18:0 és C20:2(n-6). Mindamellett, a C17:0 Δ és C19:0 Δ zsírsavak abban az esetben képződtek, amikor a hőmérséklet 37 °C-ról 42 °C-ra emelkedett. A *P. putida* baktériumban a C14:0, C15:0 és C19:0 Δ zsírsavak egyedül 37 °C-on voltak jelen, míg az *i*C15:0, *i*C16:0, 2-OH C14:0, 3-OH C14:0 és C17:0 zsírsavak csak 42 °C-on képződtek. A PSAE PR baktérium esetében a 2-OH C12:0 és C16:1c jellegzetes zsírsavak a hőmérséklet 37 °C-ról 42 °C-ra emelkedésekor képződtek, míg a 3-OH C12:0 mindössze 42 °C-on volt megtalálható az izolátumban.

A C11:0 zsírsav nagy mennyiségben volt jelen a PSAE PAO1 LPS-ekben 25 és 42 °C-on (33,6 és 46%), azonban érdekes módon 37 °C-on nem volt kimutatható. A *P. putida* baktérium esetén a 2-OH C12:0, C16:1c és C17:0 Δ zsírsavak eltűntek, amikor a hőmérséklet elérte a 42 °C-ot. A PSAE PR esetében a 2-OH C14:0, C17:0 és C18:0 csupán 25 °C-on szintetizálódott,

továbbá a C20:0 képződés 42 °C-on megszűnt. Hasonlóképpen, a C22:0 zsírsav nem volt kimutatható 42 °C-on a PSAE ATCC 27853 baktériumban.

Az LCFA-k magas előfordulási aránya az összes baktérium izolátum esetében változatlan maradt a hőmérséklet változtatásával. Jelentős változás volt megfigyelhető azonban a PAO1 LPS esetében, amelyben az MCFA zsírsavak 25 és 42 °C-on domináltak.

5.3.3.3 *A táptalaj minőségének hatása a baktériumok zsírsavösszetételére*

Az agar táptalajon tenyésztett baktériumok zsírsav-összetételét, a szintén általánosan alkalmazott véres agar táptalaj használatával kapott eredményekkel hasonlítottuk össze. A különböző táptalajok hatását a *P. aeruginosa* ATCC 27853 baktérium példáján mutatjuk be (**10. táblázat**).

A telített zsírsavak általánosan magasabb arányt mutattak véres agar közegben minden hőmérsékleten, míg a hidroxil- és ciklopropán-zsírsavak nagyobb mennyiségben fordultak elő agar táptalaj esetén. Ezenkívül a hosszú szénláncú zsírsavak nagyobb arányát figyeltük meg véres agar táptalaj alkalmazásával, ami közel 100%-os arányt eredményezett minden hőmérsékleten.

25 °C-on, agar táptalajon nagyobb arányban fordult elő a C16:1c és C20:0 zsírsav, míg véres agar táptalaj esetén kétszeres mennyiségű C19:0 zsírsav képződött. Ezzel szemben 37 °C-on a véres agar táptalaj mutatta mindhárom zsírsavkomponens nagyobb arányát. Továbbá 37 °C-on, a mindkét táptalajon együttesen előforduló zsírsavak közül a 2-OH C12:0, 3-OH C12:0 és C19:0 Δ agar táptalajon fordult elő nagyobb mennyiségben, míg a C16:1c, C16:0, C19:0 és C20:0 zsírsavak magasabb arányt mutattak véres agar táptalaj használata esetén.

Érdekes módon a 2-OH C12:0 és 3-OH C12:0 hidroxil-zsírsavak 25 °C-on, a további hőmérsékletekhez képest nem voltak kimutathatók véres agar táptalaj esetén. Továbbá a C22:0 zsírsav 25 és 37 °C-on, véres agar táptalajon nem termelődött, valamint a C12:0, C14:0, C15:0, C18:0, C22:0, C17:0 Δ telített zsírsavak és a C20:2(n-6) zsírsav 37 °C-on, véres agar táptalaj esetén nem volt kimutatható.

Az agar és véres agar táptalajok összehasonlítása folyamán mindössze egy esetben észleltünk új zsírsav képződését, mégpedig 25 °C-on, véres agar táptalajon a C18:1c esetében.

10. táblázat A zsírsav-metil-észterek csúcs alatti terület százalécai a *P. aeruginosa* ATCC 27853 baktériumból származó mintákban. A baktériumokat 25, 37 és 42 °C-on, véres agar táptalajon tenyésztettük, a zsírsavakat a beoltást követő 1., 3. és 5. napon extraháltuk. Az eredmények három párhuzamos mérésből származnak, ahol a relatív szórás kisebb, mint 2%.

Zsírsavak	PSAE ATCC 27853		
	véres agar		
	25 °C	37 °C	42 °C
	a teljes zsírsavtartalom %-a		
Telített zsírsavak (SAFAs)			
C16:0	12,7	27,7	26,8
C19:0	74,0	36,3	36,1
C20:0	4,6	20,2	21,8
Egyszeresen telítetlen zsírsavak (MUFAs)			
<i>-cisz</i>			
C16:1c	6,0	11,6	7,7
C18:1c	2,8	-	-
Hidroxi-zsírsavak			
2-OH C10:0	-	-	-
2-OH C12:0	-	1,9	3,2
3-OH C12:0	-	1,0	1,9
2-OH C14:0	-	-	-
3-OH C14:0	-	-	-
3-OH C16:0	-	-	-
Ciklopropán-zsírsavak			
C17:0 Δ	-	-	1,0
C19:0 Δ	-	1,2	1,5
Σ SAFA	91,3	84,3	84,7
Σ MUFA			
Σ <i>cisz</i>	8,7	11,6	7,7
Σ Hidroxi	-	2,9	5,1
Σ Ciklopropán	-	1,2	2,4
Σ MCFA	-	2,9	5,1
Σ LCFA	100,0	97,1	94,9

5.3.3.4 A táptalaj és a tenyésztési idő hatása a baktériumok zsírsavösszetételére

A kísérleti körülményekben alkalmazott változások hatásait további elemzéseknek vetettük alá, melyek során az egy, három és öt napon keresztül, agar és véres agar táptalajon tenyésztett baktériumok zsírsavprofiljait hasonlítottuk össze. A *P. aeruginosa* ATCC 27853 baktérium esetében kapott eredményeket a **11. táblázat** tartalmazza.

11. táblázat A zsírsav-metil-észterek csúcs alatti terület százaléka a *P. aeruginosa* ATCC 27853 baktériumból származó mintákban. A baktériumokat 25, 37 és 42 °C-on, agar és véres agar táptalajon tenyésztettük, a zsírsavakat a beoltást követő 1., 3. és 5. napon extraháltuk. Az eredmények három párhuzamos mérésből származnak, ahol a relatív szórás kisebb, mint 2%.

Zsírsavak	PSAE ATCC 27853																	
	1. nap						3. nap						5. nap					
	agar			véres agar			agar			véres agar			agar			véres agar		
	25 °C	37 °C	42 °C	25 °C	37 °C	42 °C	25 °C	37 °C	42 °C	25 °C	37 °C	42 °C	25 °C	37 °C	42 °C	25 °C	37 °C	42 °C
a teljes zsírsavtartalom %-a																		
Telített zsírsavak (SAFAs)																		
C12:0	-	1,1	-	-	-	-	2,8	-	-	4,7	-	-	-	-	-	-	-	-
C14:0	-	3,6	-	-	-	-	1,3	1,1	-	1,8	-	-	1,2	3,2	-	-	-	3,1
C15:0	-	0,8	-	-	-	-	0,4	1,1	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-
C16:0	14,1	23,2	27,0	12,7	27,7	26,8	14,6	23,2	27,0	20,3	27,5	27,6	21,4	26,2	25,2	18,3	19,0	24,8
C17:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7	-	-	-	-
C18:0	-	1,2	-	-	-	-	-	1,8	1,0	-	1,4	-	-	1,5	-	-	-	3,4
C19:0	39,7	28,3	36,7	74,0	36,3	36,1	25,8	30,9	26,0	24,8	28,1	29,8	42,2	26,6	24,1	54,6	27,5	22,5
C20:0	14,1	7,4	19,9	4,6	20,2	21,8	5,5	18,7	13,0	3,3	10,7	16,7	-	17,8	12,3	2,7	34,6	13,4
C22:0	1,3	3,0	-	-	-	-	1,5	-	-	1,3	-	-	-	-	2,7	-	-	-
Egyszeresen telítetlen zsírsavak (MUFAs)																		
<i>-cisz</i>																		
C16:1c	22,3	7,2	7,3	6,0	11,6	7,7	16,2	6,2	8,1	21,6	5,3	6,7	21,2	2,9	4,7	14,6	5,7	6,4
C18:1c	-	-	-	2,8	-	-	-	-	-	1,1	0,8	1,0	-	-	-	-	-	-
<i>-transz</i>																		
C16:1t	-	-	-	-	-	-	5,1	-	-	0,4	2,4	-	-	-	-	1,7	-	-
Elágazó zsírsavak																		
<i>-iso</i>																		
<i>i</i> C17:0	-	-	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	-	2,6	-	-	-	-	-
Hidroxi-zsírsavak																		
2-OH C10:0	-	-	-	-	-	-	9,7	-	-	-	3,7	-	1,3	2,3	6,3	-	-	-
2-OH C12:0	6,3	11,6	4,4	-	1,9	3,2	9,3	6,3	12,1	13,8	8,8	9,1	6,3	7,9	3,4	5,2	13,7	-
3-OH C12:0	2,2	8,2	1,7	-	1,0	1,9	3,6	6,8	8,5	4,1	4,4	2,7	11,4	6,2	10,8	3,6	4,7	7,4
Ciklopropán-zsírsavak																		
C17:0Δ	-	1,6	1,2	-	-	1,0	0,9	0,8	1,4	1,1	2,4	3,3	-	2,0	1,4	-	-	2,1
C19:0Δ	-	3,1	1,8	-	1,2	1,5	0,9	2,2	1,4	0,8	4,5	3,2	-	3,4	3,0	1,2	3,2	3,1
Többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFAs)																		
C20:2cc	-	0,8	-	-	-	-	-	0,8	1,4	-	-	-	-	-	1,7	-	-	-

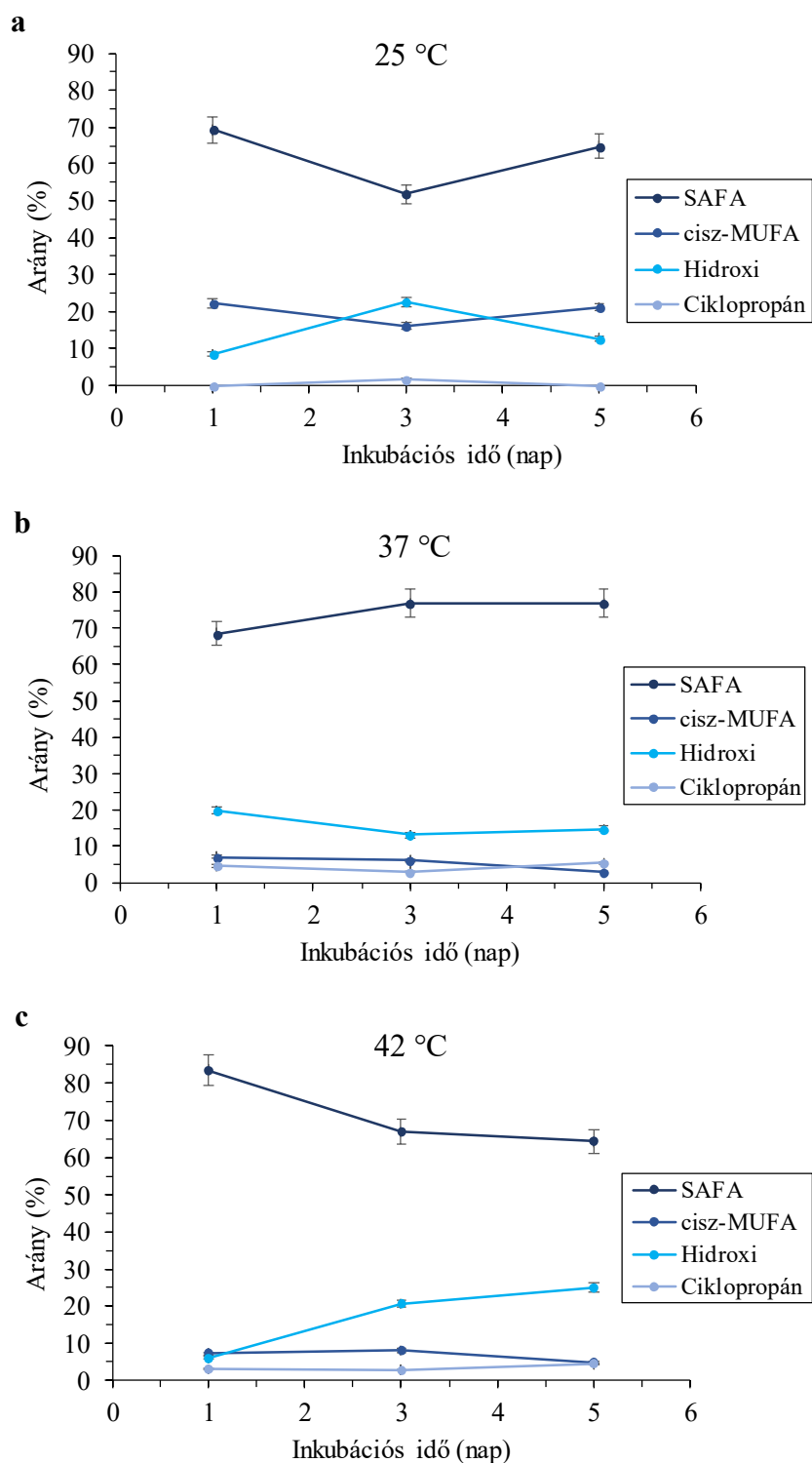
Σ SAFA	69,2	68,6	83,6	91,3	84,3	84,7	51,8	76,9	67,0	57,2	67,7	74,1	64,7	76,9	64,3	75,7	81,1	67,2
Σ MUFA																		
Σ <i>cisz</i>	22,3	7,2	7,3	8,8	11,6	7,7	16,2	6,2	8,1	22,7	6,1	7,6	21,2	2,9	4,7	14,6	5,7	6,4
Σ <i>transz</i>	-	-	-	-	-	-	5,1	-	-	0,4	2,4	-	-	-	-	1,7	-	-
Σ Elágazó																		
Σ iso	-	-	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	-	2,6	-	-	-	-	-
Σ Hidroxi	8,5	19,8	6,1	-	2,9	5,1	22,6	13,1	20,6	17,9	17,0	11,8	12,6	14,8	24,9	6,9	9,9	21,2
Σ Ciklopropán	-	4,7	3,0	-	1,2	2,4	1,8	3,1	2,9	1,9	6,8	6,5	-	5,4	4,4	1,2	3,2	5,2
Σ PUFA	-	0,8	-	-	-	-	-	0,8	1,4	-	-	-	-	-	1,7	-	-	-
Σ MCFA	8,5	20,9	6,1	-	2,9	5,1	25,4	13,1	20,6	22,6	17,0	11,8	12,6	14,8	24,6	6,9	9,9	21,2
Σ LCFA	90,2	77,2	93,9	100,0	97,1	94,9	73,1	86,9	79,4	76,1	83,0	88,2	88,5	85,2	72,4	93,1	90,1	78,8
Σ VLCFA	1,3	3,0	-	-	-	-	1,5	-	-	1,3	-	-	-	-	2,7	-	-	-

Agar táptalajra vonatkozóan, 25 °C-on a SAFA és a *cisz*-MUFA zsírsavak aránya az 1. és 3. nap között csökkent, majd a 3. és 5. nap között nőtt, míg a hidroxil- és ciklopropán-zsírsavak aránya kezdetben a harmadik napra emelkedni látszott, majd az 5. napra csökkent (**17a ábra**). A 2-OH C10:0, C14:0 és *i*C17:0 zsírsavak 25 °C-on csak a 3. és 5. napon voltak kimutathatók.

37 °C-on a telített zsírsavak mennyisége fokozatosan nőtt az 1. és 3. nap között, majd stabil maradt a 3. és 5. nap között (**17b ábra**). A *cisz*-MUFA zsírsavak aránya a napok előrehaladtával fokozatosan csökkent, míg a hidroxil- és ciklopropán-zsírsavak mennyisége az 1. és 3. nap között csökkent, majd a 3. és 5. nap között nőtt.

42 °C-on a SAFA zsírsavak aránya fokozatosan csökkent, míg a hidroxil-zsírsavak mennyisége fokozatosan nőtt az idő elteltével. A *cisz*-MUFA zsírsavak mennyisége növekvő tendenciát mutatott az 1. és 3. nap között, majd csökkent a 3. és 5. nap között (**17c ábra**). Végül, a ciklopropán-zsírsavak mennyisége stabil maradt a napok előrehaladásával.

Általánosságban az LCFA zsírsavak domináltak az izolátumokban minden hőmérsékleten és napon, magas előfordulási aránnyal.



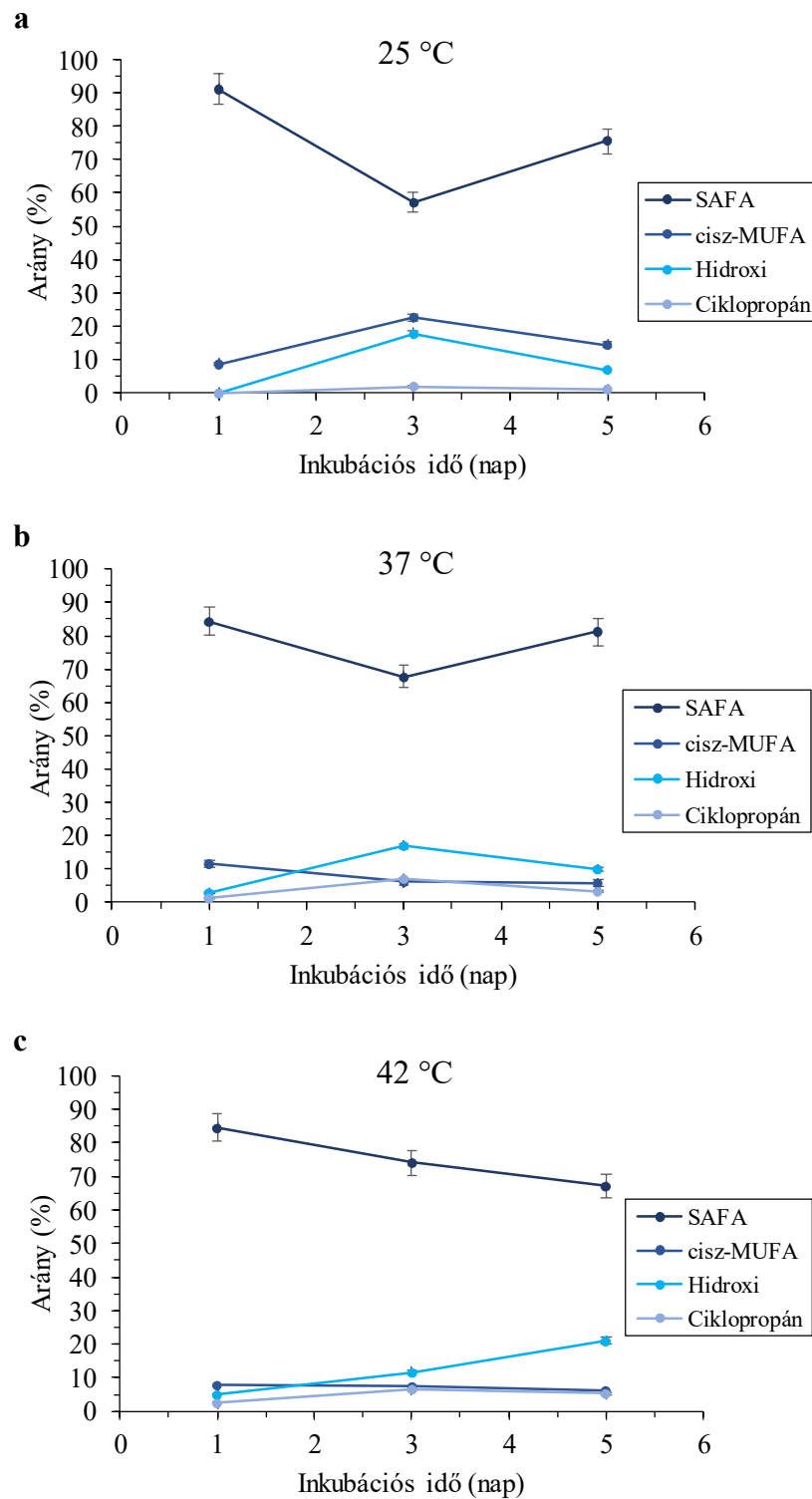
17. ábra Az inkubációs idő hatása a *P. aeruginosa* ATCC 27853 baktériumban található zsírsavak átlagos százalékos arányára (a teljes zsírsavtartalom %-a) (a) 25 °C, (b) 37 °C és (c) 42 °C hőmérsékleten, agar táptalaj használatával. Az eredmények három párhuzamos mérésből (n = 3) származnak, ahol a százalékos arányok átlagértékeit pontok és a hozzájuk tartozó hibák (\pm SD) jelölik. Az optimalizált kísérleti körülményeket az Anyagok és módszerek részben (4.3.6 GC-MS elemzés fejezet) részletezzük.

Véres agar táptalaj használatakor hasonló tendenciák voltak megfigyelhetők a zsírsav csoportok arányaiban 25 °C-on, mint agar táptalaj alkalmazása esetén (**18a ábra**). A telített zsírsavak mennyisége az 1. és 3. nap között csökkent, majd a 3. és 5. nap között növekedett, míg a *cisz*-MUFA, a hidroxil- és ciklopropán-zsírsavak aránya növekedni látszott az 1. és a 3. nap között, majd a 3. és 5. nap között csökkenést mutatott.

37 °C-on a telített és a *cisz*-MUFA zsírsavak arányai hasonló tendenciát mutattak, azaz szintjük kezdetben a 3. napig csökkent, majd a 3. és 5. nap között emelkedett (**18b ábra**), míg a hidroxil- és ciklopropán-zsírsavak mennyisége nőtt az 1. és 3. nap között, majd a 3. és 5. nap között csökkent.

42 °C-on a SAFA és *cisz*-MUFA zsírsavak aránya fokozatosan csökkent a baktérium kultúra korával, míg a hidroxil-zsírsavak szintje a tenyésztési idő növekedésével specifikusan csökkent (**18c ábra**). Végül, a ciklopropán-zsírsavak aránya a korábbi hőmérsékleteken megfigyelt módon az 1. és 3. nap között nőtt, majd a 3. és 5. nap között csökkent.

Az LCFA és MCFA zsírsavak arányát tekintve általánosságban elmondható, hogy az LCFA zsírsavak nagyobb dominanciát mutattak véres agaron, azonban a napok előrehaladtával hasonló tendencia volt megfigyelhető mindkét táptalaj esetében.



18. ábra Az inkubációs idő hatása a *P. aeruginosa* ATCC 27853 baktériumban található zsírsavak átlagos százalékos arányára (a teljes zsírsavtartalom %-a) (a) 25 °C, (b) 37 °C és (c) 42 °C hőmérsékleten, véres agar táptalaj használatával. Az eredmények három párhuzamos mérésből (n = 3) származnak, ahol a százalékos arányok átlagértékeit pontok és a hozzájuk tartozó hibák (\pm SD) jelölik. Az optimalizált kísérleti körülményeket az Anyagok és módszerek részben (4.3.6 GC-MS elemzés fejezet) részletezzük.

5.3.3.5 Statisztikai elemzés

A kísérleti paraméterek és a kísérletek során kapott értékek közötti kapcsolat feltárására különböző varianciaanalízis (ANOVA) eljárásokat végeztünk. Többutas varianciaanalízis elemzést (MANOVA) hajtottunk végre a fix tényezők függő változókra gyakorolt lehetséges szignifikáns hatásának meghatározására. A MANOVA elemzés során, ahol a tenyésztési hőmérséklet (25; 37; 42 °C), a táptalaj típusa (agar, véres agar) és a tenyésztés időtartama (1, 3 és 5 nap), mint fix hatások, statisztikailag szignifikáns különbségeket mutattak a zsírsav-komponensek között a *P. aeruginosa* ATCC 27853 baktérium esetén: $F(12) = 2,686$; $p = 0,002$; Wilks' $\Lambda = 0,818$ és parciális $\eta^2 = 0,065$. A független változók (csúcs alatti terület, retenciós idő, terület százalék) nagyszámú kombinációjával három- és kétutas ANOVA elemzéseket végeztünk. A tenyésztési hőmérséklet \times táptalaj típus \times tenyésztési idő változók együttese esetén statisztikailag szignifikáns kölcsönhatást kaptunk a csúcs alatti területre ($F(4) = 4,198$; $p = 0,003$ és parciális $\eta^2 = 0,097$), azonban nem mutatkozott szignifikáns kölcsönhatás a retenciós idő ($F(4) = 0,772$; $p = 0,545$; parciális $\eta^2 = 0,019$) és a terület százalék vonatkozásában ($F(4) = 0,403$; $p = 0,806$; parciális $\eta^2 = 0,010$). A kétutas ANOVA eljárások azt mutatták, hogy a tenyésztési hőmérséklet \times tenyésztési idő együttesen statisztikailag szignifikáns kölcsönhatást mutattak a csúcs alatti területre, de nem alakult ki szignifikáns kölcsönhatás a retenciós idő és a terület százalék esetén. A tenyésztési hőmérséklet \times táptalaj típus változók nem mutattak statisztikailag szignifikáns kölcsönhatást a retenciós idő, a csúcsterület és a terület százalék tekintetében. Hasonlóképpen, a táptalaj típus \times tenyésztési idő változók nem mutattak statisztikailag szignifikáns kölcsönhatást a retenciós idő, a csúcs alatti terület és a terület százalék tekintetében. Az egyutas ANOVA kimutatta, hogy a táptalaj típus, valamint a tenyésztési idő statisztikailag szignifikáns hatást gyakoroltak a csúcs alatti területre ($p = 0,001$ és $p = 0,044$).

6 Eredmények értékelése

6.1 Az ionfolyadék komponenseket tartalmazó bevonat hatása fehérjék elválasztására kapilláris zónaelektroforézisben

Bázikus fehérjék CE elválasztása során általános probléma, hogy az elválasztást akadályozhatja a fehérjék adszorpciója a szilícium-dioxid kapilláris felületén. Ennek minimalizálása érdekében a kapilláris falának különféle tartós módosításait (kovalens kötéssel, vagy fizikai adszorpcióval létrehozott bevonatok), vagy különböző adalékanyagok pufferoldathoz való hozzáadásával a kapilláris úgynevezett dinamikus bevonatát alkalmazzák (Hajba & Guttman, 2017.; Robb, 2007.). Bázikus fehérjék esetén a pozitív töltésű bevonatok eredményeznek hatékony elválasztást, mint például a kationos polimerek (polibrén) (Haselberg, de Jong, & Somsen, 2010.), kationos felületaktív anyagok (cetil-trimetil-ammónium-bromid) (Crihfield, Kristoff, Veltri, Penny, & Holland, 2019.), vagy ionfolyadékok ([bmim][BF₄]) (Hajba & Guttman, 2024.) használatával kialakított tartós, vagy dinamikus bevonatok.

Munkánk során az 1-alkil-3-metil-imidazólium-alapú ionfolyadékok alkalmazása a kapilláris zónaelektroforézis elválasztásokban két szempontból jelentett előnyt. Egyrészt az imidazólium kationok jelenléte a kapilláris dinamikus bevonatához vezetett, amely megakadályozta a bázikus fehérjék adszorpcióját a kapilláris felületén. Másrészt az elválasztandó komponensek a kapillárisfalat bevonó, és/vagy az elektrolit oldatban jelenlévő szabad imidazólium-ionokkal különféle kölcsönhatások (ionos, diszperziós, proton donor/akceptor) révén kapcsolódhattak, amely kölcsönhatások az elválasztás mechanizmusában módosulást okozhattak és a komponensek jobb felbontását eredményezték.

Az ionfolyadék-tartalmú pufferoldatok pH-ja az ionfolyadék koncentráció, valamint a törzsoldat elkészítése során a hőmérséklet és az elkészítéstől eltelt idő függvényében változott. Több közleményben is beszámolnak arról, hogy a tetrafluoro-borát aniont tartalmazó ionfolyadékok vizes közegben hidrolizálnak, és az egyensúlyi állapot eléréséhez a körülményektől függően (hőmérséklet, pH, koncentráció) eltérő időre van szükség (Cui, és mtsai., 2010.; Freire, Neves, Marrucho, Coutinho, & Fernandes, 2010.; Wamser, 1948.; Mesmer & Rutenberg, 1973.) Míg koncentrált oldatban a tetrafluoro-borát anion stabil, addig vizes oldatban hidrogén-fluorid képződése mellett lassan, főként hidroxifluoroborátokká hidrolizál. A hidrolízis folyamán kevésbé domináló termékek is képződhetnek, mint tetrafluorobórsav (HBF₄), szolvatált [bmim]⁺ és [BF₄]⁻ ionok, valamint ezek különböző

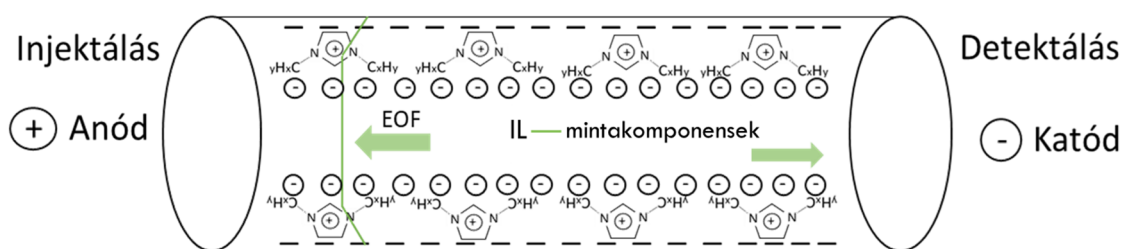
asszociátumai, amelyek az ionfolyadék-víz rendszerek puffer funkcióját biztosítják. Tudjuk továbbá azt is, hogy a BF_4^- tartalmú ionfolyadékok savassága az anion hidrolízisének köszönhető. Wamser kimutatta (Wamser, 1948.), hogy a HBF_4 vizes oldatai a hígítás mértékétől, a hőmérséklettől és az elkészítés utáni állási időtől függően hidrolizálnak. Freire és *mtsai*. (Freire, Neves, Marrucho, Coutinho, & Fernandes, 2010.) azt találták, hogy a tetrafluoroborát tartalmú ionfolyadékok minden általuk vizsgált körülmény (savasság és bázikus pH, 25 - 100 °C) között hidrolizálnak, azonban a hidrolízis mértéke jelentősen függ a hőmérséklettől és a pH-tól. Vizsgálataik során továbbá azt is tapasztalták, hogy a 4 ml térfogatú, 2,2 M koncentrációjú ionfolyadék-víz elegy egyensúlyi állapotának eléréséhez a hőmérséklettől függően 30 perctől 24 óráig tartó tárolásra volt szükség. Míg más szerzők a fluorid-tartalmú ionfolyadékok hidrolízisének vizsgálata során azt találták, hogy a $[\text{bmim}][\text{BF}_4]$ esetében a napok előrehaladtával növekvő mennyiségben fluorid-ion képződik (Cho, Pham, Jeon, & Yun, 2008.; Villagrán, Deetlefs, Pitner, & Hardacre, 2004.). Az utóbb említett ion vizes közegben hidrogén-fluoriddá alakulva szintén hozzájárulhat az ionfolyadékok vizes elegyeinek csökkenő pH-jához az idő előrehaladtával.

Az ionfolyadék-tartalmú pufferoldatok pH-ja a koncentrációtól függően 1,5 és 3 közé esett, amely értékek mellett a magas izoelektromos ponttal rendelkező fehérjék pozitív töltésűek voltak. Egy bevonat nélküli kvarc kapillárisban a fehérjék felületi töltésüktől (pH) függően adszorbeálódhatnak a kapilláris belső felületén, viszont megfelelő bevonattal, mint például az imidazólium kationok elektrosztatikus kölcsönhatása által létrehozott pozitív bevonattal a pozitív töltésű fehérjék adszorpciója megakadályozható.

Felmerülhet a kérdés, hogy amennyiben a pufferben ionfolyadék komponens is található, keletkezik-e EOF, avagy sem, és ha igen, milyen lesz az áramlás iránya. Korábbi vizsgálatokban mind a pozitív (Wu, Wei, Su, Xu, & Chen, 2008.), mind a negatív (Jiang, és *mtsai*., 2003.) polaritást (azaz a katód, vagy az anód felé történő migrációt) sikeresen alkalmazták fehérjék elválasztására ionfolyadékok jelenlétében. Corradini és *mtsai*. (Corradini, Nicoletti, & Bonn, 2009.) által alkalmazott katód irányú „ko-elektroozmotikus kapilláris elektroforézis”, azaz amikor az elektroozmotikus áramlás és a mintakomponensek vándorlási iránya megegyezik, a bázikus fehérjék rövid időn belüli, azonban kis felbontású elválasztását mutatta alacsony IL-koncentrációjú acetát puffer (pH 4) használata esetén.

Az általánosan használt EOF markerek, mint az aceton vagy a nitrometán, esetünkben nehezen tették lehetővé az EOF mobilitásának pontos meghatározását az ionfolyadék komponensekkel kialakuló erős kölcsönhatásaik következtében (Ruiz, Ferro, Palomar, Ortega, & Rodriguez, 2013.; Müllerová, Dubský, Svobodová, & Gaš, 2013.). Ennél fogva

következtetéseinket ezek figyelembevételével igyekeztünk levonni. A foszfátpuffer (pH 2,2) használatával, a bevonat nélküli kapillárisokban végzett kísérleteink azt mutatják, hogy ezen a pH értéken sem az anód, sem a katód irányába nem alakult ki elektroosmotikus áramlás. Ezzel szemben az [emim][BF₄] és [bmim][BF₄] ionfolyadék tartalmú pufferoldatok (pH 2,2) alkalmazása esetén, a megfelelő ionfolyadék eleggyel bevont kapillárisokban az acetone eltérő viselkedést mutatott, de mindkét esetben csupán negatív polaritásnál (-18 kV) tapasztaltunk csúcsot. Ez alapján azt feltételezzük, hogy a dinamikus bevont kapillárisokban az IL-víz elegyek alkalmazásával anód irányú EOF alakult ki. Ugyanakkor a bázikus fehérjék migrációja katód irányú volt, ami azt mutatja, hogy a fehérjék mobilitása meghaladta az anód irányú EOF hatását. A **19. ábra** a kapilláris zónaelektroforézis elválasztás mechanizmusát ábrázolja imidazólium kation-alapú ionfolyadékok használatával puffer komponensként és a kapilláris falát módosító anyagként fehérjék elválasztására.



19. ábra A kapilláris zónaelektroforézis elválasztás mechanizmusa imidazólium-alapú ionfolyadékok alkalmazásával. A bekarikázott negatív ionok az elektrolitban jelenlévő anionokat, azaz a tetrafluoroborát aniont és a hidrolízise során keletkező egyéb anionokat jelölik.

Az ionfolyadékok alkalmazásával nagy felbontást és keskeny csúcsalakat értünk el optimális futási időn belül. Ezen megfigyelések mellett azonban egy új hatás is megjelent az ionfolyadékok jelenléte következtében. Míg a hagyományos rendszerekben a pufferkoncentráció növelése a (katód irányú) EOF csökkenéséhez vezethet, esetleg hosszabb elválasztási folyamatot okozva, addig esetünkben az IL-koncentráció 25-ről 125 mM-ra emelésével – anód irányú EOF-t feltételezve – a fehérjék migrációs ideje megnőtt. Ez feltehetően az IL-komponensek kapilláris falán történő adszorpciójára vezethető vissza, amely befolyásolta az EOF-t, de ami még fontosabb, hogy ez a hatás a bázikus fehérjék megváltozott elektroforetikus viselkedéséből adódhat az ionfolyadék komponensekkel létrejövő eltérő mértékű kölcsönhatások következtében. Azt is fontos megjegyezni, hogy a pufferoldatok pH-

ja nőtt az IL-koncentráció csökkentésével. Az ilyen komplex hatások nyomkövetésére az eredmények statisztikai elemzésére volt szükség.

6.2 A kapilláris zónaelektroforézis elválasztási mechanizmusa ionfolyadékok jelenlétében

Elképzeléseink alapján a fehérjék hatékony elválasztásához a kapillárisfal dinamikus bevonása mellett az ionfolyadékok és a fehérjék között létrejövő kölcsönhatások is hozzájárultak. A két hatást jól szemléltetik az **5. ábra** elektroferogramjai, ahol egyfelől látható a bevonat (**5b ábra**), valamint az ionfolyadékokkal kialakuló interakciók (**5c és d ábra**) hatása az elválasztásra. Amint az azonos pH-jú, de eltérő pufferoldatok használatával kapott eredményekből kitűnik, a fehérje csúcsok felbontása nagymértékben megnövekedett az ionfolyadékok jelenlétében (**5c és d ábra**), összehasonlítva a foszfátpuffer alkalmazásával kapott alacsony felbontással (**5a és b ábra**). A fehérjék különböző oldatkörnyezetekben mutatott konformációinak és effektív töltésének meghatározására irányuló kísérleti és elméleti vizsgálatok kimutatták (Zhang, Wu, Zhang, Fang, & Xu, 2019.), hogy a 2,2 pH-jú foszfát-citrát puffer befolyásolja a fehérjék konformációját, amely főként a hidrodinamikai sugár tekintetében okoz változást. Az ionfolyadékokkal végzett kísérleteink során a migrációs sorrendben megfigyelt változások azt jelzik, hogy jelentős kölcsönhatásnak kell jelen lennie az ionfolyadék komponensek és a fehérjék között. Hasonló eredményeket figyeltek meg Jiang és *mtsai*. (Jiang, és *mtsai*., 2003.), akik különböző alkilancú ionfolyadékokat alkalmaztak bázikus fehérjék elválasztására, és az alkilcsoport hatásának vizsgálata során arra jutottak, hogy bár a fehérjék migrációs sorrendje nem változott az elválasztás során, jelentős különbségek figyelhetők meg az elválasztás idejére és a csúcsok formájára vonatkozóan. Rövid analízis időt és éles csúcsokat értek el az [emim][BF₄] használatával citokróm c, lizozim, tripszinogén és α kimotripszinogén elválasztása esetében. Érdemes megemlíteni, hogy a mioglobin mobilitása a különböző kísérleti elrendezésekben szokatlan módon változott. A jelenség a mioglobin szerkezeti tulajdonságaival magyarázható, amelyet a fehérjék ionfolyadékok jelenlétében történő kristályosodása során figyeltek meg. A tapasztalatok alapján a fehérjék ionfolyadékokban történő oldódása vagy kristályosodása során kialakuló kölcsönhatások sok esetben javítják a fehérjék termodinamikai stabilitását (Vrikkis, Fraser, Fujita, MacFarlane, & Elliott, 2009.; Verissimo, és *mtsai*., 2022.). Judge és *mtsai*. (Judge, és *mtsai*., 2009.) nagyszámú imidazolium-, ammónium- és foszfónium-alapú ionfolyadék fehérjekristályosodásra gyakorolt hatását vizsgálták, ahol érdekes módon, az ionfolyadék hozzáadása a mioglobinra nézve

minden esetben denaturációt okozott. Eredményeink azt mutatták, hogy a két IL esetében nem volt szignifikáns különbség az elválasztási időkben ($p = 0,874$), és nem változott a migrációs sorrend sem, bár a [bmim][BF₄] érzékenyebb detektálást és fokozott csúcsélességet mutatott az [emim][BF₄] ionfolyadékkal szemben. Továbbá a nem bevonatos és bevonatos kapilláris kapillárisban kapott jelek esetében tapasztalt intenzitáskülönbségek oka az lehet, hogy az imidazólium-alapú ionfolyadékok fényelnyeléssel rendelkeznek az alkalmazott 200 nm detektálási hullámhosszon, amely megemeli az alapvonal jelét és csökkenti a fehérjecsúcsok relatív intenzitását. Ennek következtében az ionfolyadékkal bevont kapillárisban mért jelek kisebbek, a nem bevonatos kapillárisban pedig ez a "háttérabszorbancia" hiányzik, így a fehérjecsúcsok relatív intenzitása nagyobb volt.

Bár a kutatások azt sugallják, hogy az ionfolyadékok anionjainak erősebb hatása lehet a fehérjék stabilitására a kationokhoz képest (Diddens, 2017.; Todinova, 2016.), a jelenlegi irodalomban hiányoznak a közvetlen adatok az ionfolyadékok anionjainak potenciális hatásairól fehérjék vizes közegben végrehajtott CZE elválasztásaira. Az elméleti kémiai szimulációk azonban rávilágítottak, hogy a kationok koncentrációja meghaladja az anionok koncentrációját a fehérjék felületén, függetlenül azok töltésétől (Haberler, Schröder, & Steinhauser, 2012.; Klahn, Lim, Seduraman, & Wu, 2011.). Emellett kimutatták, hogy a vízmolekulák és az ionfolyadék-ionok kölcsönhatásait tekintve túlnyomórészt az anionok esetében erősebbek ezek az interakciók, a kationokhoz viszonyítva (Cammarata, 2001.). Mindezek alapján feltételezhető, hogy az elválasztást túlnyomórészt az imidazólium kationok befolyásolhatják. Mindazonáltal, az anionok is kölcsönhatásba léphetnek a fehérjék megfelelő részeivel, amelyet főként Coulomb-kölcsönhatások és hidrogénkötések irányítanak.

6.3 A kapilláris zónaelektroforézis módszer alkalmazhatósága

Az ionfolyadék-tartalmú pufferoldatokat alkalmazó módszer gyakorlati alkalmazhatóságát csirke tojásfehérje és humán könny elemzésével igazoltuk. A lizozim kiváló elválasztása az egyéb jelenlévő fehérjéktől lehetővé tette a minták lizozimtartalmának meghatározását. A tojásfehérje másik fő fehérjekomponense, az ovalbumin mennyiségi értékelése azonban nem volt lehetséges, mivel ahogyan azt már korábban kimutatták, ez a fehérje több glikoforma összetett keveréke (Landers, Oda, Madden, & Spelsberg, 1992.). Bár az ovalbumin komponensek itt is elváltak egymástól, az azonosítás és a mennyiségi meghatározás nem volt lehetséges a tojásfehérje más fehérjéivel való átfedés miatt (**9a ábra**).

6.4 Zsír-sav-metil-észterek elválasztási tulajdonságainak jellemzése eltérő polaritású GC oszlopok alkalmazásával

Jelentős különbségeket figyeltünk meg a két polisziloxán-alapú oszlop, valamint a polisziloxán és az ionfolyadék-alapú oszlopok elválasztási tulajdonságainak összehasonlítása során. Az eredmények rámutattak arra, hogy az apoláris és a közepes/nagy polaritású polisziloxán-alapú oszlopok a telített és egyszeresen telítetlen zsírsavak elválasztásában hatékonyak, az extrém poláris IL-alapú oszlop pedig a változatos szerkezetű zsírsavakat tartalmazó, komplex minták elválasztásában előnyös, amelyet a másik két oszloppal nem sikerült teljes mértékben megvalósítani. Továbbá az SLB-IL111 oszlopon kevesebb koelúció volt észlelhető, mint a polisziloxán-alapú oszlopokon (**10. és 11. ábra**). Mindez az oszlopok eltérő szelektivitására és polaritására, valamint a komponensek állófázisban mutatott eltérő megoszlási tulajdonságaira vezethető vissza. Mint köztudott, az apoláris tulajdonságú komponensek az apoláris állófázisban oldódnak jobban, amely így nagyobb retencióhoz vezet. Ennek megfelelően a poláris komponensek elválasztására erősen poláris állófázisok alkalmasak, ahol az elválasztási mechanizmus a komponensek polaritásától és illékonyaságától függ (Harynuk, Wynne, & Marriott, 2006.). A polarizálható anyagok, mint például a kettős kötéssel rendelkező FAME komponensek esetében erősebb retenció alakul ki a nagy polaritású oszlopokon, mint a telített változatuk esetén, az állófázissal létrejövő erőteljesebb dipól-dipól kölcsönhatások következtében. Ennél fogva a nagyfokú telítetlenség erősebb retenciót von maga után az erősen poláris oszlopok esetében.

A polisziloxán-alapú állófázisok esetében a polimer vázlánc funkcionális csoportjai a lánchosszúság, a kettős kötések száma és helyzete, valamint a *cisz/transz* izoméria alapján választják el a komponenseket. Ezen túlmenően, a polimer terminálisan aktív hidroxilcsoportja és a FAME észtercsoportja között hidrogénkötés létrejöttének lehetősége is fennáll. Ugyancsak kialakulhat diszperziós kölcsönhatás a polimer alkil-oldallánca és a FAME szénlánca között. Amennyiben az állófázis cianocsoportokat tartalmaz (például a DB-225MS oszlop), ez elősegítheti a *cisz/transz* izomerek hatékonyabb elválasztását. Az ionfolyadék-alapú oszlop esetén az állófázis és a zsír-sav-metil-észterek részlegesen pozitív és negatív részei között dipólus-dipólus kölcsönhatások alakulhatnak ki, amely kölcsönhatást fokozhatja, ha az állófázis aromás gyűrűt tartalmaz (pl. SLB-IL111 oszlop). Az imidazólium-kationok hidrogénkötésképző képessége szintén szerepet játszik az elválasztás folyamatában. A kationok ezen tulajdonságát széles körben megvizsgálták (Takamuku, és mtsai., 2018.; Roy, Mandal, Banerjee, & Sarkar, 2018.; Zhang, Wang, & Yu, 2010.; Dong, Zhang, Wang, & Yao, 2006.).

Esetünkben az imidazólium-kation elektronhiányos hidrogénatomjai szolgálhatnak a hidrogénkötés hidrogéndonoraiként, míg a FAME észtercsoport karbonil-oxigénjén lévő magános elektronpár hidrogén akceptorként funkcionál. Ezek az intermolekuláris kölcsönhatások együttesen növelik a komponensek retencióját az ionfolyadék-alapú oszlopon, különösen a C18:2 régió *cisz/transz* izomereinek hatékonyabb elválasztását eredményezve. A vizsgált C18:2 geometriai izomerek (*cisz,cisz*-9,12; a *cisz,transz*-9,12; a *transz,cisz*-9,12 és a *transz,transz*-9,12) 30 m hosszú ionfolyadék-alapú oszlopon megvalósult elválasztása az első közvetlen GC-MS elválasztása ezen vegyületeknek. Megfigyeléseink lényeges információkkal szolgálnak a *transz*-zsírsavösszetétel meghatározása terén, mind az élelmiszeriparban (Corazzin, és mtsai., 2019.; Schlormann, és mtsai., 2016.; Zanferari, és mtsai., 2018.), mind a klinikai kutatásokban (Wan, és mtsai., 2016.; Devillard, és mtsai., 2009.).

Az ionfolyadékokban túlnyomórészt kation-anion párok lehetnek jelen, feltehetően a **13. ábrán** látható elrendezésekben. A modellezés során meghatározott legalacsonyabb energiájú szerkezetek alapján az anionok feltehetően nem vesznek részt azokban a kölcsönhatásokban, amelyek az elválasztást befolyásolnák. Összefüggés látható az izomerek ionfolyadék-alapú oszlopon mutatott retenciós sorrendje és polaritásuk között. A komponensek szerkezetéből eredő polaritása az alacsony polaritástól a magasabb polaritásig a következő sorrendet követi: C18:2n-6tt, C18:2n-6tc, C18:2n-6ct, C18:2n-6cc. Ez a sorrend megegyezik az ionfolyadék-alapú oszlopon mért retenciós sorrenddel.

6.5 A tenyésztési körülmények hatása baktériumok és bakteriális endotoxinok zsírsavösszetételére GC-MS módszerrel

Ismert módon a környezeti tényezők változásai befolyásolják a baktériumok bioszintézisét, ennek megfelelően a baktériumok különbözőképpen jelenhetnek meg eltérő gazdaszervezetekben. A 25 °C-on végzett tenyésztések jelentősek a nozokomiális fertőzésekben, segíthetnek megérteni a kórházi berendezések által közvetített fertőzéseket, és optimálisak a növényi patogén baktériumok számára is. Míg a 37 °C-on végzett tenyésztés képet adhat az emberi szervezetben inkubálódó baktériumok szerkezetéről. A 42 °C-os tenyésztési hőmérséklet jól reprezentálja a madarak kondícióit, ami az optimális hőmérséklet a madárkórokozók számára.

Egy fertőzés kialakulásában az első lépés a fertőző ágens megtelepedése a gazdasejten. Ebben a folyamatban a baktériumsejt felszínének összetevői alapvető szerepet játszanak, hiszen ezek a komponensek köthetik a baktériumsejteket a gazdasejtek citoplazmatikus membrán receptoraihoz. A *Pseudomonas* törzsek felszíne gazdag makromolekulákban, úgymint

kapszuláris poliszacharidokban, külső membránfehérjékben és lipopoliszacharidokban. Ezek a szerves makromolekulák töltéssel rendelkeznek, mivel különböző aminocukrokból, aminouronsavakból és aminosavakból állnak, beleértve a lipid-A részben található foszfátcsoportokat is. A bakteriális sejtek célsejthez való kötődésében meghatározó a baktériumfelszín hidrofób vagy hidrofil jellege és töltése. Ez a folyamat a környezeti feltételektől és a bakteriális sejtfal összetevőitől egyaránt függ. Ha a környezeti feltételek – hőmérséklet, pH vagy ionkoncentráció – megváltoznak, az befolyásolhatja a baktériumsejtben zajló bioszintetikus folyamatokat. A makromolekulák bioszintézisében bekövetkezett változás befolyásolhatja összetételüket, a baktériumok kolonizációs és fertőzőképességét. A membránban nagy arányban jelenlévő és az egyes baktériumokra jellemző teljes zsírsavtartalom elemzése lehetővé teszi a külső hatások által bekövetkező változások nyomon követését.

A validálási eljárás eredményei azt mutatják, hogy az SLB-IL111 oszlopra kidolgozott módszer pontos, hiteles és alkalmas a vizsgált zsírsav-metil-észterek analízisére. A rendszeralkalmasság, a napon belüli és napok közötti ismételhetség, valamint az átlagos pontosság mind megfeleltek az ajánlott elfogadási kritériumoknak (lásd az Anyagok és Módszerek fejezetben). A mérési eredmények szorosan illeszkedtek a kalibrációs görbékhez, megerősítve a meghatározás pontosságát és reprodukálhatóságát. Az ionfolyadék állófázis által biztosított intermolekuláris kölcsönhatások (hidrogénkötés, dipól-dipól kölcsönhatások) sokfélesége lehetővé tette a változatos szénatomszámú és telítettségű zsírsavak sikeres elválasztását, valamint minőségi és mennyiségi meghatározását biológiai mátrixokból, mint például baktérium izolátumokból.

Optimális körülmények mellett (37 °C-os tenyésztési hőmérséklet, agar táptalaj és egynapos inkubációs idő) a vizsgált *Pseudomonas* fajokban, általánosságban a SAFA, a *cisz*-MUFA, a hidroxil- és a ciklopropán-zsírsavak voltak azonosíthatók (**8. táblázat**), amely pontosan egyezik a Gram-negatív baktériumok jellegzetes zsírsavaira vonatkozó korábbi irodalmi eredményekkel (Lingfa, 2015.). A telített zsírsavak általános nagyarányú előfordulása a kultúrákban, merev és kevésbé permeabilis membránszerkezetre utal az optimális körülmények esetén (Zhang & Rock, 2008.). Ezt a hatást tovább erősíti a nagy mennyiségű (90%) LCFA zsírsavak jelenléte (Segura, Duque, Mosqueda, Ramos, & Junker, 1999.).

A *cisz*-MUFA zsírsavak nagy mennyiségét is megfigyeltük, amelyek kulcsfontosságú prekursorai a ciklopropán- és a *transz*-MUFA zsírsavaknak, valamint a membrán fluiditásának és permeabilitásának fenntartásában is fontos zsírsavak (Kim, és mtsai., 2005.).

A *P. aeruginosa* PAO1 baktérium és lipopoliszacharidjainak eredményeit összehasonlítva elsősorban a zsírsavkomponensek eloszlásában találtunk szignifikáns különbségeket (**9. táblázat**). Közismert, hogy a Gram-negatív baktériumok LPS szegmensének jelentős részét a hidroxizsírsavak képezik (Lodowska, Wolny, Weglarz, & Dzierzewicz, 2007.). Eredményeink is azt mutatták, hogy míg a baktériumban a MUFA, addig az LPS-ekben a hidroxizsírsavak domináltak. A *P. aeruginosa* antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájának egyik fő mechanizmusa általánosan a külső membrán alacsony permeabilitásának fenntartása (Pang, Raudonis, Glick, Lin, & Cheng, 2019.). Ezt tükrözi a SAFA és ciklopropán-zsírsavak magas jelenléte, amelyek csökkentik a membrán permeabilitását, valamint a *cisz*-MUFA zsírsavak kis előfordulása, amelyek pedig növelik a membrán permeabilitását.

Tanulmányok bebizonyították, hogy a baktériumok számos olyan mechanizmust képesek kifejleszteni, amelyek lehetővé teszik számukra, hogy kedvezőtlen körülmények között is túléljenek. Mivel a sejtvédelem első vonala a membrán összetételének megváltoztatásán alapul, amellyel csökkenthető a mérgező vegyületek/szennyező anyagok/antibiotikumok felé kialakuló fluiditás és permeabilitás, a baktériumsejtekre a következő zsírsavarányok megváltoztatása lehet jellemző: (1) telítetlen-telített zsírsavak, (2) *cisz-transz* izomerizáció, (3) *anteizo-izo*-elágazású szerkezetek, (4) rövid-hosszú láncú zsírsavak és (5) MUFA-ciklopropán zsírsavak arányának megváltozása.

A főbb zsírsavosztályok összehasonlítása azt mutatta, hogy a 25 °C-ról 42 °C-ra emelt **tenyésztési hőmérséklet** változást eredményezett a telített, telítetlen, elágazó, hidroxizsír- és ciklopropán-zsírsavak eloszlásában egyaránt. A növekvő hőmérséklet megváltoztatta a telített zsírsavak csúcs alatti terület százalékait az összes vizsgált izolátum esetén. A telített zsírsavak mennyiségében megfigyelt növekedés a sejtmembrán növekvő merevségét és csökkenő permeabilitását jelzi, amely megakadályozhatja az antibiotikumok/szennyező anyagok bejutását a sejtbe.

Junker és *mtsai*. (Junker & Ramos, 1999.) kimutatták, hogy a *cisz-transz* izomerizáció és a *transz*-MUFA zsírsavak jelenléte lehetővé tette a *P. putida* baktérium növekedését az optimális 37 °C-tól eltérő, magasabb hőmérsékleteken is. Bár kísérleteinkben a *cisz*-MUFA zsírsavak arányának csökkenése volt megfigyelhető, a megfelelő *transz*-MUFA zsírsavak aránya nem nőtt a hőmérséklet változásával. Mindazonáltal megfigyeltük a ciklopropán-zsírsavak megfelelő *cisz*-MUFA-prekurzoraikhoz viszonyított arányának növekedését a hőmérséklet 25 °C-ról 37 °C-ra emelése alatt. Mivel a ciklopropán-zsírsavak jelenléte csökkenti a sejtmembránok permeabilitását (Cronan & Luk, 2022.), megállapítható, hogy esetünkben a membrán permeabilitása és fluiditása 37 °C-on csökkent.

További megfigyelésünk a hőmérséklet-emelkedés hatására az elágazó zsírsavak megjelenése volt. Érdekes módon az *iC15:0*, *iC16:0* és *iC17:0* zsírsavak mindössze a hőmérséklet 42 °C-ra való emelésével voltak kimutathatók a *P. putida* baktériumban. A különböző *Pseudomonas* fajok zsírsavösszetételére vonatkozó korábbi eredmények alapján (Moss & Dees, 1975.) az elágazó zsírsavak teljes mennyiségét az *izo*-elágazó zsírsavak teszik ki. Az elágazó láncú zsírsavak nem adnak szoros tömörséget, így rugalmassá teszik a membránt, megakadályozva annak merevségét (Zhang & Rock, 2008.), azonban a mi esetünkben ilyen kis koncentrációban (6,6%) ez a hatás kevésbé érvényesülhetett.

Buchanan és *mtsai*. (Buchanan, Ernst, Elborn, & Schock, 2009.) megfigyelték, hogy a *P. aeruginosa* képes módosítani LPS-einek szerkezetét, azon belül is a különböző lánchosszúságú hidroxizsírsavaik arányát. Eredményeik összefüggésbe hozhatók a baktérium antibiotikum-rezisztenciájában bekövetkező változásokkal. Ezzel szemben mi azt találtuk, hogy a kimutatható hidroxizsírsavak közül a 2-OH és a 3-OH-C12:0 volt azonosítható a PAO1 LPS-ben, melyek aránya a hőmérséklet emelkedésének hatására változott.

A többszörösen telítetlen zsírsavak szintén nélkülözhetetlenek a membrán fluiditásának fenntartásában (Sanderson, 2013.). Érdekes módon ezeket a zsírsavakat nem azonosítottuk vizsgálataink során, kivéve a PAO1 LPS esetét, amikor 42 °C-on ~20%-os aránnyal jelentek meg.

A tenyésztési hőmérséklet változására adott további reakció az egyes zsírsavak eltűnése volt. Számos telített zsírsav, a hőmérsékletet 37 vagy 42 °C-ra emelése esetén nem volt kimutatható az izolátumokban.

Az **agar és véres agar táptalajokon** kapott zsírsavprofilok összehasonlítása során minőségi és mennyiségi különbségeket is megfigyeltünk. Hasonlóságuk ellenére a véres agaron kialakult zsírsavösszetétel szignifikánsan különbözött a hagyományos agar táptalajától.

Számos tanulmány jelent meg a hagyományosan használt agar-alapú táptalajok összehasonlításáról, baktériumok zsírsavösszetételének elemzése céljából. Walczak-Skierska és *mtsai*. (Walczak-Skierska, Złoch, Pauter, Pomastowski, & Buszewski, 2020.) azt feltételezik, hogy a zsírsavprofilokban jelentkező különbségek főként a táptalajok tápanyagbeli eltéréseiknek tulajdoníthatók, és vizsgálataik során a tápanyagban gazdag tápközegben volt megfigyelhető magasabb zsírsavtartalom. Annak ellenére, hogy a véres agar egy tápanyagban dúsított táptalaj, kísérleteinkben az egyik legszembetűnőbb különbség mégis a zsírsavak eltűnése volt az agar táptalajhoz képest. Általánosan többféle zsírsavat azonosítottunk, és sok esetben intenzívebb csúcsokat figyeltünk meg az agar táptalaj alkalmazásával. Továbbá a

SAFA és LCFA zsírsavak nagyobb aránya rugalmatlanabb és kevésbé permeabilis membránszerkezetre utal a véres agar táptalaj használatakor.

Mindamellett a táptalajok okozta jelentős különbségek, azok zsírsavarányainak változásából adódhatnak. Scherer és *mtsai*. (Scherer, Müller, Rath, & Ansorg, 2003.) a *Helicobacter pylori* tenyésztését hasonlították össze egy zsírsavmentes agar és egy 5% bárányvérrel dúsított, zsírsavakat is tartalmazó véres agar táptalaj használatakor, és a zsírsavprofilokban mutatkozó különbségeket a tápanyagban gazdag táptalajból történő zsírsavfelvételnek tulajdonították. Azt találták, hogy telített zsírsavakat a baktérium sejtek termelnek, így a nagyobb mennyiségben való jelenlétük a véres agar táptalajon arra utal, hogy a sejtek további telített zsírsavakat vesznek fel a véres agar táptalajból.

Csupán egyetlen esetben, a C18:1c esetében észleltünk új zsírsav képződését a véres agar táptalajban, amely összhangban van Scherer és munkatársai megállapításaival, akik azt is bebizonyították, hogy a C18:1c megjelenése a zsírsavprofilban a C18:1c-tartalmú véres agar táptalajból történő felvétel következménye.

Kísérleteinkben az **inkubációs idő** változása szintén jelentős hatást gyakorolt a zsírsavak eloszlására és koncentrációjára, mind agar, mind véres agar táptalaj esetén. Általánosságban elmondható, hogy a baktériumok növekedése exponenciális eloszlást követ az idő függvényében, amely négy fázissal modellezhető le, úgymint késleltetési fázis, exponenciális fázis, stacionárius fázis és halálzási fázis (Paulton, 1991.). Az egyes fázisok időtartama fajonként eltérő lehet. A *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó fajok növekedési görbéivel foglalkozó tanulmányok, a növekedés változásait többnyire maximum 50 óra alatti időtartamban vizsgálták (Khelissa, Abdallah, Jama, & Chihib, 2019.; Luo, és *mtsai.*, 2016.), amikor is a növekedési fázis lassan eléri a halálzási fázist és a baktériumok elpusztulnak tápanyaghiány miatt. Al-kafaween és *mtsai*. (Al-kafaween, Mohd Hilmi, Jaffar, Al-Jamal, & Zahri, 2019.) azonban kimutatták, hogy a harmadik nap az optimális tenyésztési idő a *P. aeruginosa* számára, hogy erős biofilmet képezzenek. Kísérleteink során szintén jellemzően a harmadik inkubációs napon gyűjtött minták esetén tapasztaltuk a legintenzívebb zsírsavcsúcsokat.

Ahogy az inkubációs idő az 1. nappól az 5. napra nőtt, főként a zsírsavprofilok eloszlási különbségeit figyeltük meg, azonban néhány esetben a 3. és 5. napon új zsírsavak is megjelentek az 1. naphoz képest. A 3. és 5. napon megjelentek az *izo*-elágazó zsírsavak, amely a membrán fluiditásának növekedését jelzi, és ami megkönnyíti a vegyületek bejutását a sejtmembránba.

A 42 °C és az 5 napos inkubációs idő olyan szintű eltérést mutatott az ideális körülményektől, amely a zsírsavak mennyiségének általános csökkenését okozta, a hidroxizsírsavak kivételével. A hidroxizsírsavak mennyisége ugyanis a napok előrehaladtával növekvő tendenciát mutatott agar és a véres agar táptalajon egyaránt. A szakirodalom ezt azzal magyarázza, hogy nagy mennyiségű polihidroxialkanoát (PHA) vegyület halmozódik fel a baktériumokban, amikor korlátozott tápanyag áll rendelkezésükre (Madison & Huisman, 1999.; Ayub, Julia Pettinari, Méndez, & López, 2006.). Ezek az anyagok hidroxizsírsavakból állnak, és fontos szén- és energiatároló vegyületek, amelyeket különféle baktériumok szintetizálnak.

Hasonlóképpen, az LCFA zsírsavak százalékos összetételének jelentős csökkenése volt megfigyelhető az 5. napon 42 °C-on. A tenyésztési körülményektől függetlenül azonban az LCFA zsírsavak domináltak az elemzések során.

Piotrowska-Seget és *mtsai*. (Piotrowska-Seget & Mrozik, 2003.) azt találták, hogy Gram-negatív baktériumok a korlátozott tápanyagokra is reagálhatnak azáltal, hogy a MUFA zsírsavakat ciklopropán-zsírsavakká alakítják. Eredményeink megerősítik ezt a hatást, nevezetesen az agar táptalajon a MUFA zsírsavak aránya csökkent, a ciklopropán-zsírsavak mennyisége pedig nőtt (pl. 25 °C-on az 1. és 3. nap között, illetve 37 és 42 °C-on a 3. és 5. közötti napokon).

Bár a *Pseudomonas* fajok zsírsavprofilját változatos körülmények között korábban már átfogóan vizsgálták, az azonos nemzetségbe tartozó baktériumok ilyen jellegű összehasonlítása, valamint az SLB-IL111 oszlop ilyen fajta használata a részletes módszerfejlesztéssel és validálási eljárással, korábban nem került leírásra.

A baktérium külső behatások által bekövetkező szerkezeti változásai révén befolyásolja a membrán permeabilitását, valamint az antimikrobiális szerekkel szembeni ellenálló képességét. A baktériumok szerkezetében bekövetkezett változások nyomonkövetése segíthet feltárni a bakteriális patogenitás számos ismeretlen aspektusát. A kapott eredmények új lehetőséget teremthetnek a betegséget okozó patogén baktériumok virulenciájának csökkentésében.

7 Összefoglalás

Kísérleteink során imidazólium-alapú ionfolyadékok szerepét vizsgáltuk kapilláris elektroforetikus és a gázkromatográfiás elválasztások hatékonyságában.

Bázikus fehérjék (citokróm c, lizozim, miogloblin, tripszin és apo-transzferrin) kiváló elválasztását értük el – a nem bevonatos kapillárisban végzett kísérletekhez képest – imidazólium-alapú ionfolyadékok (1-butil-3-metil-imidazólium-tetrafluoro-borát és 1-etil-3-metil-imidazólium-tetrafluoro-borát) alkalmazásával puffer komponensként és a kapillárisok belső felületének módosítására kapilláris zónaelektroforézisben. Az ionfolyadék bevonat megakadályozta a fehérjék kitapadását a kapilláris falára, az ionfolyadékokkal kialakuló kölcsönhatások révén pedig hatékony elválasztás valósult meg. Az ionfolyadékokkal létrejövő kölcsönhatások befolyásolták továbbá a fehérjék migrációs sorrendjét az elválasztás során. Bemutattuk, hogy az ionfolyadékok használatával végzett fehérjeelválasztások nagy biztonsággal megismételhetők. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az ionfolyadék oldatok elkészítési folyamata hat az oldat pH-jára és ezáltal a fehérjék elválasztására, amely összefüggést korábban mások nem tanulmányozták. Ily módon szisztematikusan standardizáltuk az elektroforetikus elválasztás folyamatát az optimális feltételek megteremtése érdekében. A kidolgozott módszert sikeresen alkalmaztuk valós biológiai minták, mint tojásfehérje- és humán könnyminták fehérjéinek elemzésére.

Megvizsgáltuk egy 52 komponensű és egy 4 komponensű, C4-C24 lánchosszúságú, változatos szénatomszámú és telítettségű zsírsav-metil-észter keverék retenciós tulajdonságait, három, kereskedelmi forgalomban elérhető, különböző polaritású kapilláris oszlopon, GC-MS módszerrel. Bemutattuk, hogy a három oszlop eltérő szelektivitást mutatott a telített, telítetlen és *cisz/transz* zsírsavak irányába, valamint a komponensek elúciós sorrendje és koelúciója is különböző volt. Habár mindhárom módszer megfelelt a validálási kritériumoknak, az SLB-IL111 oszlopra kidolgozott módszer bizonyult a legmegfelelőbbnek a *cisz/transz* izomerek elválasztására. Eredményeink fényében feltételezhetjük, hogy az ionfolyadék állófázis által biztosított intermolekuláris kölcsönhatások széles skálája tette lehetővé a nagy szerkezeti heterogenitású zsírsavak sikeres elválasztását, valamint a linolsav-metil-észter négy geometriai izomerjének alapvonalis elválasztását, amely az első közvetlen GC-MS elválasztása a *cisz,cisz-9,12; cisz,transz-9,12; transz,cisz-9,12* és *transz,transz-9,12* C18:2 geometriai izomereknek, 30 m hosszú ionfolyadék-alapú oszlop segítségével.

Az SLB-IL111 rendkívül poláris ionfolyadék-alapú oszlop alkalmazásával, GC-MS módszerrel, megvizsgáltuk a tenyésztési hőmérséklet, a táptalaj és az inkubációs idő hatását a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 baktérium és lipopoliszacharidjai, a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, a *Pseudomonas putida* és a *Pseudomonas aeruginosa* polirezisztens baktériumok zsírsavösszetételére vonatkozóan. A kísérletek eredményei megerősítik, hogy a kidolgozott módszer, beleértve a komplex minta származékképzési eljárását, a validált GC-MS módszert, valamint az ionfolyadék-alapú oszlop nagy elválasztó képességét, megfelelőnek bizonyult a bakteriális mikroorganizmusok vizsgálatára és a külső hatások által bekövetkező szerkezetváltozások nyomonkövetésére. Megállapíthatjuk, hogy a zsírsav-összetételt mind minőségileg, mind mennyiségileg jelentősen befolyásolták azok a körülmények, amelyek között a kultúrákat tenyésztettük. A tenyésztési hőmérsékletben, a táptalaj minőségében, vagy az inkubációs időben alkalmazott változások egyes esetekben a zsírsavak arányának megváltozását, vagy éppen új zsírsavak megjelenését, akár eltűnését okozták. Az egyes zsírsavak aránya, és azok változása döntő szerepet játszik a baktériumsejt membránjának rugalmasságában és permeabilitásában, ami jelentősen befolyásolja a gazdasejthez való tapadását és az antibiotikus kezelések hatékonyságát. A körülményekben alkalmazott változások befolyásolták továbbá az endotoxinok összetételét is, amelyek a szervezetbe kerülve módosíthatják a gyulladásos folyamatok intenzitását.

8 Summary

In this work the role of imidazolium-based ionic liquids in the efficiency of capillary electrophoretic and gas chromatographic separations was investigated.

Excellent separation of basic proteins (cytochrome c, lysozyme, myoglobin, trypsin and apo-transferrin) was achieved – compared to the experiments performed in an uncoated capillary – using 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([emim][BF₄]) or 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([bmim][BF₄]) ionic liquids as a background electrolyte component and for modifying the inner surface of the capillaries in CZE. The ionic liquid-coating prevented the proteins from adsorbing on the capillary wall, and effective separation was achieved through the interactions with the ionic liquids. We have demonstrated that the use of ILs in the separation of proteins can be repeated with high certainty. In our experiments, we showed that the preparation process of ionic liquid solutions affects the pH of the solution and thus the separation of proteins which relationship has not been previously studied. In this way, we systematically standardized the process of electrophoretic separation to set up optimal conditions. The method has been applied successfully for the analyses of real biological samples such as proteins from egg whites and human tears.

The retention properties of two FAME mixtures (a 52-component and a 4-component, C₄–C₂₄ chain lengths with high structural diversity) on three commercial capillary columns of different polarities (non-polar HP-5MS, medium/high polarity DB-225MS and extremely polar SLB-IL111) were studied by GC-MS. We have demonstrated that the three columns showed distinct selectivity towards saturated, unsaturated and *cis/trans* fatty acids, and the elution orders and co-elutions of the components were also different. Although all three methods corresponded to the validation criteria, the method developed for the SLB-IL111 column proved to be the most suitable for the separation of *cis/trans* isomers. In the light of our results, we can assume that a wide range of intermolecular interactions provided by the ionic liquid stationary phase enabled the successful separation of fatty acids with high structural heterogeneity, as well as the baseline separation of the four geometric isomers of linoleic acid methyl ester, which is the first direct GC-MS separation of *cis,cis*-9,12; *cis,trans*-9,12; *trans,cis*-9,12 and *trans,trans*-9,12 C_{18:2} geometric isomers using a 30 m long IL-based column.

As an application of the method developed for the extremely polar ionic liquid-based SLB-IL111 column, the effect of cultivation temperature, media and incubation time on the fatty acid

composition of bacteria and their lipopolysaccharides (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PAO1 LPS, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* polyresistant and *P. putida*) was investigated using GC-MS. The results confirm that this technique, including the complex sample derivatization procedure, the validated GC-MS method, and the separation power of the ionic liquid-based column, proved to be suitable for the examination of bacterial microorganisms and for monitoring its structural changes caused by external influences. We can state that the fatty acid composition was significantly influenced both qualitatively and quantitatively by the conditions under which the cultures were cultivated. Differences in the culture conditions caused a change in the ratio of fatty acids, or even the appearance of new fatty acids. The ratio of individual fatty acids and their changes play a decisive role in the flexibility and permeability of the bacterial cell membrane, which significantly affects its adhesion to the host cell and the effectiveness of antibiotic treatments. The changes in the conditions also affect the composition of endotoxins, which can modify the intensity of the inflammatory processes when they enter the body.

Mellékletek

M1. táblázat A GLC-674 és CRM47791 standard keverékek zsírsav-metil-észter komponenseire vonatkozó kalibrációs görbe egyenletek és determinációs együtthatók, napon belüli és napok közötti ismételtelhetőség, rendszeralkalmasság, valamint átlagos pontosság értékek, a három GC-oszlop optimalizált módszerének meghatározásával. Az optimalizált kísérleti körülményeket az Anyagok és módszerek fejezetben részletezzük.

GLC-674								
Zsírsvak	GC oszlop	Kalibrációs görbe egyenlete ^a	Determinációs együttható (R ²) ^b	Ismételhetőség		Rendszeralkalmasság ^e		Átlagos pontosság ^f (%)
				Napon belül ^c (RSD%)	Napok között ^d (RSD%)	Retenció idő (RSD%)	Koncentráció (RSD%)	
C4:0	HP-5MS DB-225MS SLB-IL111			n.d.	n.d.	n.d.		
C6:0	HP-5MS DB-225MS SLB-IL111	y = 2,57E+07x - 1,16E+06 y = 3,69E+07x - 5,68E+05 y = 4,72E+07x - 8,16E+05	0,9355 0,9987 0,9969	9,83 3,43 4,22	9,11 2,04 2,78	0,08 0,04 0,17	2,89 3,37 4,12	102,4 101,1 102,7
C8:0	HP-5MS DB-225MS SLB-IL111	y = 3,94E+07x - 1,95E+06 y = 5,92E+07x - 1,65E+06 y = 7,47E+07x - 2,13E+06	0,9480 0,9976 0,9936	8,40 4,75 6,26	8,01 1,85 2,96	0,01 0,02 0,04	2,68 4,74 4,80	102,5 101,8 103,8
C10:0	HP-5MS DB-225MS SLB-IL111	y = 2,40E+07x - 1,47E+06 y = 3,68E+07x - 1,07E+06 y = 4,53E+07x - 1,28E+06	0,9438 0,9978 0,9941	9,66 5,61 6,24	9,02 1,72 2,96	0,01 0,00 0,02	2,57 4,71 2,97	102,9 101,7 103,6
C11:0	HP-5MS DB-225MS SLB-IL111	y = 5,08E+07x - 2,51E+06 y = 8,10E+07x - 2,38E+06 y = 9,82E+07x - 2,59E+06	0,9508 0,9979 0,9945	7,16 5,12 5,88	7,11 1,98 2,62	0,00 0,01 0,01	2,70 4,52 4,49	102,2 101,7 103,4
C12:0	HP-5MS DB-225MS SLB-IL111	y = 2,81E+07x - 1,73E+06 y = 4,39E+07x - 1,29E+06 y = 5,35E+07x - 1,55E+06	0,9439 0,9978 0,9943	8,77 5,45 5,99	4,92 1,51 2,76	0,00 0,00 0,01	2,65 4,42 4,65	102,8 101,8 103,4
C13:0	HP-5MS DB-225MS SLB-IL111	y = 5,85E+07x - 3,06E+06 y = 9,41E+07x - 2,70E+06 y = 1,13E+08x - 3,02E+06	0,9501 0,9979 0,9944	6,70 5,05 5,97	6,05 2,02 2,83	0,00 0,00 0,01	2,48 4,56 4,66	102,1 101,7 103,5

C14:1n-5t	HP-5MS	$y = 8,72E+07x - 4,88E+06$	0,9501	6,01	6,87	0,00	2,70	103,1
	DB-225MS	$y = 4,76E+07x - 1,47E+06$	0,9977	5,38	1,99	0,00	4,73	101,9
	SLB-IL111	$y = 5,82E+07x - 1,68E+06$	0,9938	6,49	2,58	0,01	4,61	103,7
C14:1n-5	HP-5MS	$y = 8,72E+07x - 4,88E+06$	0,9504	5,92	6,56	0,00	2,70	102,3
	DB-225MS	$y = 9,08E+07x - 2,54E+06$	0,9981	5,55	2,06	0,01	4,49	101,6
	SLB-IL111	$y = 1,23E+08x - 5,31E+06$	0,9938	5,29	1,61	0,01	4,33	103,8
C14:0	HP-5MS	$y = 6,24E+07x - 2,93E+06$	0,9528	4,99	4,27	0,00	2,49	102,1
	DB-225MS	$y = 9,41E+07x - 2,70E+06$	0,9980	5,34	2,01	0,01	4,56	101,7
	SLB-IL111	$y = 1,20E+08x - 3,21E+06$	0,9943	5,94	2,96	0,01	4,61	103,5
C15:1t	HP-5MS	$y = 9,29E+07x - 5,62E+06$	0,9499	5,23	4,61	0,01	2,56	102,7
	DB-225MS	$y = 4,95E+07x - 1,52E+06$	0,9972	6,95	2,34	0,01	4,43	102,0
	SLB-IL111	$y = 6,09E+07x - 1,86E+06$	0,9939	6,27	3,09	0,01	4,50	103,6
C15:1n-5	HP-5MS	$y = 9,29E+07x - 5,62E+06$	0,9496	5,17	4,58	0,01	2,56	102,5
	DB-225MS	$y = 9,67E+07x - 2,86E+06$	0,9979	4,26	1,94	0,00	4,37	101,8
	SLB-IL111	$y = 1,53E+08x - 2,93E+06$	0,9964	7,88	2,83	0,01	5,06	102,8
C15:0	HP-5MS	$y = 6,53E+07x - 3,26E+06$	0,9538	6,98	5,15	0,00	2,48	102,2
	DB-225MS	$y = 1,03E+08x - 3,21E+06$	0,9978	5,16	2,04	0,00	4,60	101,9
	SLB-IL111	$y = 1,09E+08x - 6,99E+05$	0,9946	4,73	3,73	0,01	5,57	103,1
C16:1n-7	HP-5MS	$y = 6,01E+07x - 4,05E+06$	0,9519	8,25	5,15	0,00	2,78	102,2
	DB-225MS	$y = 9,52E+07x - 2,79E+06$	0,9981	5,74	2,05	0,02	4,55	101,7
	SLB-IL111	$y = 1,17E+08x - 3,21E+06$	0,9941	5,73	2,63	0,01	4,63	103,6
C16:1t	HP-5MS	$y = 3,45E+07x - 2,06E+06$	0,9481	6,89	5,46	0,01	2,48	102,3
	DB-225MS	$y = 5,15E+07x - 1,58E+06$	0,9979	5,95	1,99	0,01	4,66	101,8
	SLB-IL111	$y = 6,36E+07x - 1,99E+06$	0,9936	6,11	2,39	0,01	5,21	103,6
C16:0	HP-5MS	$y = 1,01E+08x - 4,77E+06$	0,9573	6,52	5,07	0,00	2,60	101,9
	DB-225MS	$y = 1,61E+08x - 4,85E+06$	0,9979	5,12	1,96	0,01	4,53	101,7

	SLB-IL111	$y = 1,55E+08x - 4,31E+06$	0,9922	4,44	2,34	0,02	5,75	104,0
C17:1n-7	HP-5MS	$y = 6,57E+07x - 4,96E+06$	0,9489	7,38	5,11	0,00	2,55	102,8
	DB-225MS	$y = 1,00E+08x - 2,44E+06$	0,9984	4,64	2,78	0,00	4,54	101,4
	SLB-IL111	$y = 1,26E+08x - 3,72E+06$	0,9935	5,05	2,64	0,01	4,79	103,9
C17:1t	HP-5MS	$y = 6,75E+07x - 3,66E+06$	0,9554	8,36	4,83	0,00	2,55	102,1
	DB-225MS	$y = 1,04E+08x - 3,34E+06$	0,9975	5,32	2,25	0,01	4,58	102,0
	SLB-IL111	$y = 1,28E+08x - 3,71E+06$	0,9938	6,17	2,78	0,01	4,92	103,7
C17:0	HP-5MS	$y = 1,04E+08x - 5,25E+06$	0,9576	6,98	4,75	0,00	2,50	102,1
	DB-225MS	$y = 1,63E+08x - 5,08E+06$	0,9977	5,05	2,11	0,01	4,57	101,8
	SLB-IL111	$y = 2,01E+08x - 5,61E+06$	0,9938	5,36	2,66	0,03	4,75	103,7
C18:3n-6	HP-5MS	$y = 1,03E+08x - 7,95E+06$	0,9526	6,59	5,19	0,01	2,65	102,8
	DB-225MS	$y = 1,49E+08x - 5,11E+06$	0,9975	3,42	2,26	0,02	4,88	101,9
	SLB-IL111	$y = 1,85E+08x - 4,79E+05$	0,9966	6,45	2,07	0,01	4,65	100,4
C18:2n-6tt	HP-5MS	$y = 1,01E+08x - 6,54E+06$	0,9571	5,58	4,51	0,00	2,62	102,6
	DB-225MS	$y = 1,02E+08x - 3,30E+06$	0,9977	5,47	3,33	0,01	4,85	101,8
	SLB-IL111	$y = 1,42E+08x - 6,01E+06$	0,9918	6,23	4,00	0,02	6,19	104,3
C18:2n-6	HP-5MS	$y = 1,01E+08x - 6,54E+06$	0,9570	5,48	4,99	0,00	2,60	102,5
	DB-225MS	$y = 1,53E+08x - 4,52E+06$	0,9973	5,15	1,65	0,01	4,95	101,8
	SLB-IL111	$y = 1,85E+08x - 4,73E+06$	0,9948	5,80	2,66	0,02	4,76	103,0
C18:3n-3	HP-5MS	$y = 1,11E+08x - 6,81E+06$	0,9554	6,53	5,56	0,01	3,62	102,6
	DB-225MS	$y = 1,49E+08x - 5,20E+06$	0,9973	5,03	2,27	0,01	4,88	102,1
	SLB-IL111	$y = 1,82E+08x - 7,10E+06$	0,9786	2,69	1,22	0,01	5,00	105,0
C18:1n-12	HP-5MS	$y = 2,00E+08x - 8,12E+06$	0,9689	9,59	4,27	0,01	2,08	102,0
	DB-225MS	$y = 1,06E+08x + 4,19E+06$	0,9976	3,03	2,82	0,01	6,20	97,3
	SLB-IL111	$y = 9,38E+07x + 5,28E+06$	0,9839	3,37	2,83	0,02	4,12	96,1

C18:1n-7t	HP-5MS	$y = 2,72E+08x - 1,03E+07$	0,9615	9,45	5,23	0,01	2,87	102,5
	DB-225MS	$y = 5,31E+07x - 2,34E+06$	0,9964	6,04	1,84	0,02	4,78	102,7
	SLB-IL111	$y = 1,20E+08x - 1,61E+07$	0,9667	8,04	2,01	0,03	4,78	109,5
C18:1n-7	HP-5MS	$y = 2,72E+08x - 1,03E+07$	0,9626	9,31	5,02	0,01	2,63	102,1
	DB-225MS	$y = 1,03E+08x - 2,60E+06$	0,9980	5,08	1,65	0,01	4,59	101,5
	SLB-IL111	$y = 2,40E+08x - 3,22E+07$	0,9667	8,04	2,01	0,03	4,78	109,5
C18:1n-9t	HP-5MS	$y = 2,72E+08x - 1,03E+07$	0,9624	9,35	5,12	0,01	2,63	102,3
	DB-225MS	$y = 1,59E+08x - 7,02E+06$	0,9964	6,04	1,84	0,02	4,78	102,7
	SLB-IL111	$y = 1,47E+08x + 4,71E+06$	0,9998	5,70	3,23	0,03	3,59	100,2
C18:1n-9	HP-5MS	$y = 2,72E+08x - 1,03E+07$	0,9626	9,31	5,02	0,01	2,63	102,1
	DB-225MS	$y = 1,06E+08x - 4,68E+06$	0,9964	6,04	1,84	0,02	4,78	102,7
	SLB-IL111	$y = 1,10E+08x + 1,04E+07$	0,9859	3,45	2,20	0,03	5,08	97,8
C18:1n-12t	HP-5MS	$y = 2,00E+08x - 8,12E+06$	0,9688	9,56	5,02	0,01	2,08	102,3
	DB-225MS	$y = 1,06E+08x - 4,68E+06$	0,9964	6,04	1,84	0,02	4,78	100,4
	SLB-IL111	$y = 7,55E+07x + 6,65E+06$	0,9852	8,24	2,92	0,02	2,34	100,3
C18:0	HP-5MS	$y = 7,54E+07x - 4,54E+06$	0,9579	7,22	4,81	0,01	2,42	102,7
	DB-225MS	$y = 1,14E+08x - 3,65E+06$	0,9971	5,29	3,19	0,01	4,68	102,1
	SLB-IL111	$y = 1,41E+08x - 4,74E+06$	0,9936	5,05	2,66	0,04	4,66	103,9
C19:1n-12t	HP-5MS	$y = 1,24E+07x - 1,88E+06$	0,9767	9,82	7,17	0,01	3,71	108,8
	DB-225MS	$y = 5,41E+07x - 2,05E+06$	0,9952	8,75	1,88	0,01	5,29	102,9
	SLB-IL111	$y = 5,17E+07x - 1,67E+06$	0,9920	6,51	2,06	0,02	4,87	104,8
C19:1n-9t	HP-5MS	$y = 9,59E+07x - 6,78E+06$	0,9584	6,36	4,93	0,01	2,51	102,4
	DB-225MS	$y = 1,11E+08x - 2,91E+06$	0,9983	3,42	4,14	0,01	7,88	101,5
	SLB-IL111	$y = 1,12E+08x - 2,99E+06$	0,9953	5,52	2,43	0,02	4,78	103,0
C20:4n-6	HP-5MS	$y = 1,12E+08x - 1,02E+07$	0,9550	8,54	5,46	0,00	2,71	103,5
	DB-225MS	$y = 1,54E+08x - 6,81E+06$	0,9963	8,16	2,50	0,01	5,76	102,8

	SLB-IL111	$y = 1,89E+08x - 5,92E+06$	0,9952	7,13	3,61	0,01	4,23	103,4
C20:5n-3	HP5 –MS	$y = 7,73E+07x - 5,79E+06$	0,9555	8,55	5,21	0,00	2,57	102,5
	DB-225MS	$y = 9,88E+07x - 4,99E+06$	0,9939	4,72	2,06	0,02	5,71	103,3
	SLB-IL111	$y = 1,24E+08x - 3,64E+06$	0,9938	6,12	3,22	0,00	3,81	102,5
C20:3n-6	HP–5MS	$y = 7,37E+07x - 5,91E+06$	0,9533	8,59	5,45	0,00	2,50	103,1
	DB-225MS	$y = 1,01E+08x - 4,83E+06$	0,9953	6,09	2,09	0,01	6,11	103,2
	SLB-IL111	$y = 1,30E+08x - 4,33E+06$	0,9948	5,30	2,68	0,01	2,04	103,4
C20:2n-6	HP–5MS	$y = 1,06E+08x - 7,27E+06$	0,9619	9,76	5,43	0,00	2,53	102,5
	DB-225MS	$y = 1,55E+08x - 6,14E+06$	0,9960	6,16	1,82	0,01	5,10	102,6
	SLB-IL111	$y = 1,98E+08x - 7,48E+06$	0,9939	6,86	2,82	0,02	4,78	103,7
C20:1n-9	HP–5MS	$y = 1,45E+08x - 7,45E+06$	0,9657	8,62	4,98	0,00	2,43	101,9
	DB-225MS	$y = 1,00E+08x - 2,18E+06$	0,9957	5,04	2,91	0,01	7,10	102,5
	SLB-IL111	$y = 1,18E+08x - 4,91E+06$	0,9835	5,33	3,05	0,02	5,92	104,9
C20:3n-3	HP5 –MS	$y = 1,45E+08x - 7,45E+06$	0,9652	8,55	5,02	0,00	2,43	102,1
	DB-225MS	$y = 1,07E+08x - 3,90E+06$	0,9972	5,43	2,68	0,01	3,83	102,3
	SLB-IL111	$y = 1,26E+08x - 3,95E+06$	0,9952	7,13	3,61	0,01	4,23	103,4
C20:1n-9t	HP–5MS	$y = 4,03E+07x - 2,59E+06$	0,9543	9,92	5,09	0,00	2,48	102,4
	DB-225MS	$y = 6,35E+07x - 3,48E+06$	0,9946	6,49	5,30	0,04	7,86	102,7
	SLB-IL111	$y = 6,29E+07x - 1,16E+06$	0,9976	6,45	2,07	0,01	4,50	101,8
C20:0	HP–5MS	$y = 8,02E+07x - 5,01E+06$	0,9591	9,41	5,02	0,00	2,48	102,5
	DB-225MS	$y = 1,16E+08x - 3,74E+06$	0,9969	3,22	1,45	0,02	4,01	102,0
	SLB-IL111	$y = 1,46E+08x - 5,77E+06$	0,9941	6,07	2,60	0,03	4,63	103,7
C21:0	HP–5MS	$y = 1,53E+08x - 1,36E+07$	0,9578	5,62	5,37	0,00	2,66	103,5
	DB-225MS	$y = 1,07E+08x - 3,90E+06$	0,9972	5,43	2,68	0,01	3,83	102,3
	SLB-IL111	$y = 1,33E+08x - 2,17E+06$	0,9715	4,61	4,15	0,03	3,40	100,8

C22:5n-6	HP5 –MS	$y = 7,87E+07x - 8,21E+06$	0,9606	9,61	5,02	0,00	2,57	101,8
	DB-225MS	$y = 1,13E+08x - 8,74E+06$	0,9871	8,97	3,17	0,01	6,81	105,3
	SLB-IL111	$y = 1,27E+08x - 5,51E+06$	0,9945	6,21	3,03	0,01	3,93	103,7
C22:6n-3	HP5 –MS	$y = 8,05E+07x - 6,82E+06$	0,9546	9,49	5,43	0,00	2,69	103,0
	DB-225MS	$y = 8,94E+07x - 5,93E+06$	0,9898	6,11	3,12	0,01	4,58	104,6
	SLB-IL111	$y = 1,22E+08x - 6,10E+06$	0,9936	6,77	3,41	0,01	4,31	103,9
C22:4n-6	HP5 –MS	$y = 7,66E+07x - 6,44E+06$	0,9568	7,15	5,35	0,00	2,48	103,2
	DB-225MS	$y = 9,93E+07x - 6,61E+06$	0,9881	7,75	3,76	0,01	6,87	104,9
	SLB-IL111	$y = 1,26E+08x - 5,29E+06$	0,9947	6,19	3,28	0,01	4,07	103,6
C22:5n-3	HP5 –MS	$y = 8,09E+07x - 6,01E+06$	0,9538	9,02	5,46	0,00	2,82	102,5
	DB-225MS	$y = 9,16E+07x - 5,67E+06$	0,9909	7,36	3,62	0,01	4,71	104,1
	SLB-IL111	$y = 1,24E+08x - 5,96E+06$	0,9940	6,42	3,21	0,01	3,96	103,8
C22:2n-6	HP5 –MS	$y = 7,15E+07x - 6,48E+06$	0,9572	8,25	5,81	0,00	2,58	103,5
	DB-225MS	$y = 9,88E+07x - 3,57E+06$	0,9960	6,73	3,57	0,01	5,31	102,6
	SLB-IL111	$y = 1,28E+08x - 6,04E+06$	0,9930	7,05	3,09	0,01	4,60	104,1
C22:1n-9	HP-5MS	$y = 7,82E+07x - 4,47E+06$	0,9632	8,78	5,14	0,00	2,44	101,8
	DB-225MS	$y = 9,23E+07x - 1,67E+05$	0,9981	8,32	8,51	0,01	5,10	99,7
	SLB-IL111	$y = 1,30E+08x - 4,33E+06$	0,9948	5,30	2,68	0,02	2,04	103,4
C22:1n-9t	HP-5MS	$y = 4,39E+07x - 2,83E+06$	0,9467	9,04	5,36	0,00	2,37	102,2
	DB-225MS	$y = 6,50E+07x - 4,77E+06$	0,9808	4,80	7,50	0,03	5,60	95,1
	SLB-IL111	$y = 6,57E+07x - 2,93E+06$	0,9903	5,30	2,68	0,05	6,40	104,2
C22:0	HP-5MS	$y = 4,17E+07x - 3,49E+06$	0,9457	9,89	5,54	0,00	2,46	103,3
	DB-225MS	$y = 5,96E+07x - 2,62E+06$	0,9926	8,95	2,70	0,01	4,61	103,7
	SLB-IL111	$y = 6,87E+07x - 3,07E+06$	0,9952	6,18	2,98	0,03	4,06	103,6
C23:0	HP-5MS	$y = 8,23E+07x - 7,96E+06$	0,9430	9,98	5,59	0,00	2,56	103,8
	DB-225MS	$y = 1,02E+08x - 2,97E+06$	0,9925	8,78	2,59	0,02	6,49	103,1

	SLB-IL111	$y = 1,26E+08x - 3,92E+06$	0,9967	7,13	3,61	0,03	3,87	102,8
C24:1n-9	HP5 –MS	$y = 3,82E+07x - 5,47E+06$	0,9012	8,33	6,64	0,00	3,16	107,9
	DB-225MS	$y = 4,98E+07x - 1,06E+06$	0,9985	7,56	1,65	0,01	5,53	101,5
	SLB-IL111	$y = 6,57E+07x - 5,58E+06$	0,9818	6,19	3,01	0,02	3,78	108,0
C24:0	HP5 –MS	$y = 4,15E+07x - 5,28E+06$	0,9148	7,46	5,71	0,00	3,19	106,3
	DB-225MS	$y = 5,35E+07x - 1,59E+06$	0,9971	2,89	2,41	0,01	2,99	102,6
	SLB-IL111	$y = 6,09E+07x - 2,87E+06$	0,9920	6,24	3,05	0,02	4,26	104,5
CRM47791								
Zsírsvak	GC oszlop	Kalibrációs görbe egyenlete ^g	Determinációs együttható (R ²) ^h	Ismételhetőség		Rendszeralkalmasság ^k		Átlagos pontosság ^l (%)
				Napon belül ⁱ (RSD%)	Napok között ^j (RSD%)	Retenció idő (RSD%)	Koncentráció (RSD%)	
C18:2n-6cc	HP-5MS	$y = 6,59E+06x - 1,13E+06$	0,9174	4,63	3,96	0,02	2,64	112,7
	DB-225MS	$y = 2,36E+07x + 4,80E+05$	0,9972	1,27	1,73	0,01	3,54	117,1
	SLB-IL111	$y = 2,77E+09x - 1,37E+05$	0,9772	0,64	1,62	0,00	3,22	98,1
C18:2n-6tt	HP5 –MS	$y = 1,02E+08x - 7,73E+06$	0,9219	1,61	2,54	0,02	2,26	100,8
	DB-225MS	$y = 1,16E+08x + 1,29E+06$	0,9968	1,46	1,01	0,02	3,30	110,6
	SLB-IL111	$y = 3,03E+09x + 7,54E+04$	0,9778	0,88	1,32	0,01	2,64	100,5
C18:2n-6tc	HP5 –MS	$y = 1,02E+08x - 7,73E+06$	0,9219	1,61	2,54	0,01	2,52	92,2
	DB-225MS	$y = 5,11E+07x + 7,82E+05$	0,9957	1,67	1,56	0,01	4,53	114,0
	SLB-IL111	$y = 3,28E+09x - 6,41E+05$	0,9787	1,14	1,46	0,00	2,45	100,8
C18:2n-6ct	HP5 –MS	$y = 3,36E+07x - 1,63E+06$	0,9332	2,29	2,61	0,01	3,06	101,3
	DB-225MS	$y = 4,71E+07x + 9,60E+05$	0,9972	1,27	1,73	0,01	3,54	117,1
	SLB-IL111	$y = 3,38E+09x - 4,66E+05$	0,9765	0,94	1,89	0,00	2,46	100,5

n.d. nem detektálható

- ^a. A kalibrációs görbe az öt kalibrációs oldat (0,1; 0,25; 0,5; 0,75 és 1 mg/ml koncentrációjú oldat) egy napon belül elvégzett, három párhuzamos elemzéséből (n = 3) jött létre.
- ^b. A kalibrációs tartomány 0,1 és 1 mg/ml között volt.
- ^c. Az egyes minták egy napon belül elvégzett, három párhuzamos elemzéséből (n = 3) megállapított koncentráció RSD% értékei 0,75 mg/ml koncentráció esetén.
- ^d. A három egymást követő napon megismételt, három párhuzamos elemzéséből (n = 9) megállapított koncentráció RSD% értékei 0,75 mg/ml koncentráció esetén.
- ^e. Az egyes minták egy napon belül elvégzett, hét párhuzamos elemzéséből (n = 7) megállapított retenció idő és koncentráció RSD% értékei 0,5 mg/ml koncentráció esetén.
- ^f. Az öt kalibrációs oldat egy napon belül elvégzett, három párhuzamos elemzéséből (n = 3) megállapított koncentráció átlagos pontosságának százalékos aránya.
- ^g. A kalibrációs görbe az öt kalibrációs oldat (0,008; 0,02; 0,04; 0,06 és 0,08 mg/ml koncentrációjú oldat) egy napon belül elvégzett, három párhuzamos elemzéséből (n = 3) jött létre.
- ^h. A kalibrációs tartomány 0,008 és 0,08 mg/ml között volt.
- ⁱ. Az egyes minták egy napon belül végzett, három párhuzamos elemzéséből (n = 3) megállapított RSD% értékei 0,06 mg/ml koncentráció esetén.
- ^j. A három egymást követő napon megismételt, három párhuzamos elemzéséből (n = 9) megállapított RSD% értékek 0,06 mg/ml koncentráció esetén.
- ^k. Az egyes minták egy napon belül végzett, hét párhuzamos elemzéséből (n = 7) megállapított RSD% értékei 0,04 mg/ml koncentráció esetén.
- ^l. Az öt kalibrációs oldat egy napon belül elvégzett, három párhuzamos elemzéséből (n = 3) megállapított koncentráció átlagos pontosságának százalékos aránya.

M2. táblázat A BAME CP Mix standard keverék zsírsav-metil-észter komponenseire vonatkozó kalibrációs görbe egyenletek és determinációs együtthatók, napon belüli és napok közötti ismételhetség, rendszeralkalmasság, valamint átlagos pontosság értékek, az SLB-IL111 oszlop optimalizált módszerének meghatározásával. Az optimalizált kísérleti körülményeket az Anyagok és módszerek fejezetben részletezzük.

Zsírsvak	Kalibrációs görbe egyenlete ^a	Determinációs együttható (R ²) ^b	Ismételhetőség		Rendszeralkalmasság ^e		Átlagos pontosság ^f (%)
			Napon belül ^c (RSD%)	Napok között ^d (RSD%)	Retenció idő (RSD%)	Koncentráció (RSD%)	
C11:0	$y = 7,96E+06x + 1,08E+05$	0,9951	4,53	3,81	0,03	4,25	100,9
C12:0	$y = 2,61E+07x - 1,35E+05$	0,9975	3,85	3,07	0,02	5,60	98,7
C13:0	$y = 4,91E+07x - 8,95E+05$	0,9923	2,15	2,21	0,02	5,68	99,5
C14:0	$y = 6,65E+07x - 8,25E+05$	0,9894	2,80	3,25	0,02	7,79	100,6
i C15:0	$y = 7,20E+07x - 1,91E+06$	0,9896	3,00	3,31	0,02	8,70	100,6
ai C15:0	$y = 6,92E+07x - 1,71E+06$	0,9946	2,69	2,50	0,02	9,70	100,5
C15:0	$y = 7,66E+07x - 2,00E+06$	0,9921	4,36	3,84	0,02	6,25	100,4
i C16:0	$y = 7,87E+07x - 2,18E+06$	0,9899	4,16	4,65	0,02	8,66	101,2
C16:0	$y = 8,46E+07x + 5,15E+05$	0,9929	4,23	3,78	0,02	5,59	99,9
i C17:0	$y = 8,59E+07x - 1,56E+06$	0,9994	2,14	2,74	0,02	5,28	99,5
C16:1c	$y = 7,57E+07x - 1,39E+06$	0,9975	2,41	3,76	0,01	5,81	99,8
C17:0	$y = 8,60E+07x - 5,36E+05$	0,9981	2,42	2,33	0,02	4,61	98,9
C17:0Δ	$y = 7,85E+07x - 1,77E+06$	0,9974	4,02	2,99	0,01	5,79	100,8
C18:0	$y = 9,48E+07x - 2,86E+06$	0,9975	3,64	2,67	0,02	9,68	101,0
2-OH C10:0	$y = 1,49E+07x - 1,63E+05$	0,9930	4,47	3,49	0,01	5,43	100,2
C18:1t	$y = 9,06E+07x - 3,15E+06$	0,9949	6,39	5,01	0,02	9,19	101,4
C18:1c	$y = 8,91E+07x - 3,17E+06$	0,9962	5,18	5,95	0,02	9,59	102,0
C19:0	$y = 9,52E+07x - 2,25E+06$	0,9626	6,43	6,26	0,02	6,39	99,6
C19:0Δ	$y = 8,71E+07x - 2,28E+06$	0,9991	5,14	6,05	0,02	9,02	100,4
C20:0	$y = 1,21E+08x - 9,24E+06$	0,9793	5,54	5,29	0,03	8,17	104,7
C18:2cc	$y = 5,72E+07x + 4,51E+06$	0,9511	4,48	3,20	0,01	5,54	91,9

2-OH C12:0	$y = 4,11E+07x - 1,49E+06$	0,9944	5,15	5,64	0,01	4,08	102,2
3-OH C12:0	$y = 7,40E+07x - 2,42E+06$	0,9975	7,15	6,35	0,02	4,12	101,0
2-OH C14:0	$y = 5,73E+07x - 1,17E+06$	0,9956	4,36	4,34	0,01	5,44	101,0
3-OH C14:0	$y = 6,95E+07x - 3,63E+06$	0,9964	4,30	4,95	0,02	5,72	101,3
2-OH C16:0	$y = 6,63E+07x - 1,10E+06$	0,9954	5,34	5,64	0,01	5,33	101,2

^a. A kalibrációs görbe az öt kalibrációs oldat (0,1; 0,25; 0,5; 0,75 és 1 mg/ml koncentrációjú oldat) egy napon belül elvégzett, három párhuzamos elemzéséből (n = 3) jött létre.

^b. A kalibrációs tartomány 0,1 és 1 mg/ml között volt.

^c. Az egyes minták egy napon belül elvégzett, három párhuzamos elemzésből (n = 3) megállapított koncentráció RSD% értékei 0,75 mg/ml koncentráció esetén.

^d. A három egymást követő napon megismételt, három párhuzamos elemzésből (n = 9) megállapított koncentráció RSD% értékei 0,75 mg/ml koncentráció esetén.

^e. Az egyes minták egy napon belül elvégzett, hét párhuzamos elemzésből (n = 7) megállapított retenció idő és koncentráció RSD% értékei 0,5 mg/ml koncentráció esetén.

^f. Az öt kalibrációs oldat egy napon belül elvégzett, három párhuzamos elemzéséből (n = 3) megállapított koncentráció átlagos pontosságának százalékos aránya.

M3. táblázat A BAME CP Mix standard keverék komponenseinek kimutatási (LOD) és meghatározási (LOQ) határ értékei az SLB-IL111 GC-oszlopra optimalizált módszerrel meghatározva, GC–MS módszerrel. Az optimalizált kísérleti körülményeket az Anyagok és módszerek részben részletezzük.

Zsírsavak	LOD ($\mu\text{g/ml}$) ^a	LOQ ($\mu\text{g/ml}$) ^b
C11:0	0,08	0,25
C12:0	0,06	0,18
C13:0	0,10	0,31
C14:0	0,12	0,37
i C15:0	0,12	0,37
ai C15:0	0,09	0,26
C15:0	0,11	0,32
i C16:0	0,12	0,36
C16:0	0,10	0,30
i C17:0	0,03	0,09
C16:1c	0,06	0,18
C17:0	0,05	0,15
C17:0 Δ	0,06	0,18
C18:0	0,06	0,18
2-OH C10:0	0,10	0,30
C18:1t	0,08	0,25
C18:1c	0,07	0,22
C19:0	0,07	0,20
C19:0 Δ	0,04	0,11
C20:0	0,17	0,52
C18:2cc	0,27	0,80
2-OH C12:0	0,09	0,27
3-OH C12:0	0,06	0,18
2-OH C14:0	0,08	0,24
3-OH C14:0	0,07	0,21
2-OH C16:0	0,08	0,24

^a. A LOD értékek a jel/zaj arány > 3 esetén lettek meghatározva.

^b. A LOQ értékek a jel/zaj arány > 10 esetén lettek meghatározva.

Köszönetnyilvánítás

A doktori képzés egy kihívásokat, azonban hatalmas lehetőségeket is tartogató utazás, amely nem jöhetne létre támogató környezet nélkül. Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik valamilyen formában segítettek munkámat a képzés során.

Szeretném hálámat kifejezni témavezetőimnek, **Dr. Makszin Lillának** és **Fenyvesiné Dr. Páger Csillának**, hogy kezdettől fogva segítettek és támogattak az ötletek megfogalmazásában, a kísérletek végrehajtásában és az eredmények elemzésében, publikálásában. Támogatásuk nélkül nem sikerülhetett volna elérnem eredményeimet.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Kilar Ferenc** volt munkahelyi vezetőmnek, hogy a PTE ÁOK Bionalitikai Intézetben végezhettem doktori kutatásaimat. Köszönöm bölcs iránymutatásait és szakmai segítségét a hosszú évek folyamán.

Köszönöm továbbá munkatársaimnak, **Dr. Bufa Anitának**, **Marosvölgyi Tamásnak** és **Madarászné Horváth Ibolyának** a közös munkát és szakmai segítséget. Együttműködésük és támogatásuk mélyen hozzájárult kutatási eredményeimhez. Köszönöm **Dr. Kocsis Bélának** a mikrobiológiai minták előkészítésében nyújtott segítségét, a mindig bátorító és kedves szavait. Köszönet illeti a **PTE ÁOK Bioanalitikai Intézet** és **PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológia és Immunitástani Intézet** valamennyi munkatársát a munkámhoz nyújtott segítségükért és támogatásukért.

Elismeréssel tölt el, hogy doktori kutatási témám érdekesnek bizonyult a **Richter Gedeon Talentum Alapítvány** ösztöndíjára, így külön köszönettel tartozom az Alapítványnak az évek során biztosított anyagi támogatásért.

Nem tudom eléggé kifejezni hálámat a családom és barátaim felé. Köszönöm, hogy mindig mellettem álltak és bátorító szavaikkal erőt adtak még a legnehezebb napokon is.

Irodalomjegyzék

- Ab Rani, M. A., Brant, A., Crowhurst, L., Dolan, A., Lui, M., Hassan, N. H., Hallett, J. P., Hunt, P. A., Niedermeyer, H., Perez-Arlandis, J. M., Schrems, M., Welton, T., & Wilding, R. (2011.). Understanding the polarity of ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *13.*, 16831–16840.
- Abdelhamid, H. N. (2018.). Ionic Liquid-Assisted Laser Desorption/Ionization–Mass Spectrometry: Matrices, Microextraction, and Separation. *Methods Protoc.*, *1.*, 23-54.
- Abel, K., Schmertzing, H. D., & Peterson, J. I. (1963.). Classification of microorganisms of chemical composition. I. Feasibility of utilizing gas chromatography. *J. Bacteriol.*, *85.*, 1039–1044.
- Abraham, M. H. (1993.). Scales of solute hydrogen-bonding: their construction and application to physicochemical and biochemical processes. *Chem. Soc. Rev.*, *22.*, 73–83.
- Abraham, M. H., Ibrahim, A., & Zissimos, A. M. (2004.). Determination of sets of solute descriptors from chromatographic measurements. *J. Chromatogr. A*, *1037.*, 29–47.
- Abraham, M., Poole, C., & Poole, S. K. (1999.). Classification of stationary phases and other materials by gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, *842.*, 79–114.
- Abu-Eishah, S. (2011.). Ionic liquids recycling for reuse. In S. E. Handy, *Ionic Liquids-Classes and Properties* (old.: 239–272.). Rijeka, Horvátország: InTechOpen.
- Akulava, V., Smirnova, M., Byrtusova, D., Zimmermann, B., Ekeberg, D., Kohler, A., Blazhko, U., Miamin, U., Valentovich, L., & Shapaval, V. (2024.). Explorative characterization and taxonomy-aligned comparison of alterations in lipids and other biomolecules in Antarctic bacteria grown at different temperatures. *Environ. Microbiol. Rep.*, 13232-13259.
- Al-kafaween, M., Mohd Hilmi, A., Jaffar, N., Al-Jamal, H., & Zahri, M. (2019.). Determination of optimum incubation time for formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pyogenes* biofilms in microtiter plate. *Bull. Natl. Res. Cent.*, *43.*, 100-105.
- Allinger, N. (1997.). Conformational-analysis. 130. MM2—Hydrocarbon force-field utilizing V1 and V2 torsional terms. *J. Am. Chem. Soc.*, *99.*, 8127–8134.
- Anderson, J. L., Ding, J., Welton, T., & Armstrong, D. W. (2002.). Characterizing Ionic Liquids On the Basis of Multiple Solvation Interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, *124.*, 14247-14254.

- Arednarczyk, A., Zgórska, A., & Grabinska-Sota, E. (2011.). Toxicity of 1-heksyl-3-methylimidazolium chloride according to selected marine and freshwater organisms. *Inzynieria Ochr. Srodowiska*, 14., 137-143.
- Armstrong, D. W., He, L., & Liu, Y.-S. (1999.). Examination of ionic liquids and their interaction with molecules, when used as stationary phases in gas chromatography. *Anal. Chem.*, 71., 3873–3876.
- As, S., & Ramasamy, P. (2016.). Fatty Acid Methyl Ester (FAME) Analysis of Moderately Thermophilic Bacteria Isolated from the Coramandal Coast, Chennai, Tamilnadu. *Eur. J. Exp. Biol.*, 6., 1-7.
- Ayub, N., Julia Pettinari, M., Méndez, B., & López, N. (2006.). Impaired polyhydroxybutyrate biosynthesis from glucose in *Pseudomonas* sp. 14-3 is due to a defective beta-ketothiolase gene. *FEMS Microbiol. Lett.*, 264., 125–131.
- Balducci, A. (2017.). Ionic Liquids in Lithium-Ion Batteries. *Top. Curr. Chem.*, 375., 20-47.
- Barber, D. W., Phillips, C. S., Tusa, G. F., & Verdin, A. (1959.). The chromatography of gases and vapours. Part VI. Use of the stearates of bivalent manganese, cobalt, nickel, copper, and zinc as column liquids in gas chromatography. *J. Chem. Soc.*, 18–24.
- Baylin, A., Kabagambe, E., Siles, X., & Campos, H. (2002.). Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *Am. J. Clin. Nutr.*, 76., 750–757.
- Bellina, F., & Chiappe, C. (2010.). The Heck reaction in ionic liquids: progress and challenges. *Molecules*, 15., 2211–2245.
- Berthod, A., Ruiz-Angel, M. J., & Carda-Broch, S. (2008.). Ionic liquids in separation techniques. *J. Chromatogr. A*, 1184., 6-18.
- Bingham, R. J., & Ballone, P. (2012.). Computational study of room-temperature ionic liquids interacting with a POPC phospholipid bilayer. *J. Phys. Chem. B*, 116., 11205-11216.
- Biswas, M., Dule, M., Samanta, P., Ghosh, S., & Mandal, T. K. (2014.). Imidazolium-based ionic liquids with different fatty acid anions: phase behavior, electronic structure and ionic conductivity investigation. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16., 16255-16263.
- Breitbach, Z. S., & Armstrong, D. W. (2008.). Characterization of phosphonium ionic liquids through a linear solvation energy relationship and their use as GLC stationary phases. *Anal. Bioanal. Chem.*, 390., 1605–1617.
- Buchanan, P., Ernst, R., Elborn, J., & Schock, B. (2009.). Role of CFTR, *Pseudomonas aeruginosa* and Toll-like receptors in cystic fibrosis lung inflammation. *Biochem. Soc. Trans.*, 37., 863–867.

- Cadena, C., Anthony, J. L., Shah, J. K., Morrow, T. I., Brennecke, J. F., & Maginn, E. J. (2004.). Why is CO₂ so soluble in imidazoliumbased ionic liquids? *J. Am. Chem. Soc.*, *126.*, 5300–5308.
- Cagliero, C., Bicchi, C., Cordero, C., Liberto, E., Rubiolo, P., & Sgorbini, B. (2017.). Analysis of essential oils and fragrances with a new generation of highly inert gas chromatographic columns coated with ionic liquids. *J. Chromatogr. A*, *1495.*, 64-75.
- Calder, P. (2001.). Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids*, *36.*, 1007-1024.
- Cammarata, L. K. (2001.). Molecular states of water in room temperature ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *3.*, 5192–5200.
- Carrasco, V., Roldán, D. M., Valenzuela-Ibaceta, F., & Lagos-Moraga, S. (2024.). *Pseudomonas violetae* sp. nov. and *Pseudomonas emilianonis* sp. nov., two new species with the ability to degrade TNT isolated from soil samples at Deception Island, maritime Antarctica. *Arch. Microbiol.*, *206.*, 39-49.
- Chakraborti, A. K., & Roy, S. R. (2009.). On Catalysis by Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.*, *131.*, 6902–6903.
- Chao, J., Wolfaardt, G., & Arts, M. (2010.). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid profiles in biofilms and batch planktonic cultures. *Can. J. Microbiol.*, *56.*, 1028–1039.
- chemdata.nist.gov*. (2024. 01. 23.). Forrás:
<https://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=chemdata:amdis>
- Chen, F. A., Kelly, L., Palmieri, R., Biehler, R., & Schwartz, H. (1992.). Use of high ionic strength buffers for the separation of proteins and peptides with capillary electrophoresis. *J. Liq. Chromatogr.*, *15.*, 1143–1161.
- Cho, C. W., Pham, T. P., Jeon, Y. C., & Yun, Y. S. (2008.). Influence of anions on the toxic effects of ionic liquids to a phytoplankton *Selenastrum capricornutum*. *Green Chem.*, *10.*, 67–72.
- Corazzin, M., Romanzin, A., Sepulcri, A., Pinosa, M., Piasentier, E., & Bovolenta, S. A. (2019.). Fatty Acid Profiles of Cow's Milk and Cheese as Affected by Mountain Pasture Type and Concentrate Supplementation. *Animals*, *9.*, 68-81.
- Corradini, D. (2023.). Buffering agents and additives for the background electrolyte solutions used for peptide and protein capillary zone electrophoresis. *Trends Anal. Chem.*, *164.*, 117080-117089.

- Corradini, D., Nicoletti, I., & Bonn, G. K. (2009.). Co-electroosmotic capillary electrophoresis of basic proteins with 1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ionic liquids as non-covalent coating agents of the fused-silica capillary and additives of the electrolyte solution. *Electrophoresis*, *30.*, 1869–1876.
- Crihfield, C. L., Kristoff, C. J., Veltri, L. M., Penny, W. M., & Holland, L. A. (2019.). Semi-permanent cationic coating for protein separations. *J. Chromatogr. A*, *1607.*, 460397.
- Cronan, J., & Luk, T. (2022.). Advances in the Structural Biology, Mechanism, and Physiology of Cyclopropane Fatty Acid Modifications of Bacterial Membranes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, *86.*, e0001322.
- Cui, X., Zhang, S., Shi, F., Zhang, Q., Ma, X., Lu, L., & Chem., D. Y. (2010.). The Influence of the Acidity of Ionic Liquids on Catalysis. *Chem. Sus.*, *3.*, 1043 – 1047.
- David, F., Sandra, P., & Vickers, A. (2005.). Column selection for the analysis of fatty acid methyl esters. *Agil. Technol.*, *19.*, 19-31.
- de Boer, J., Blok, D., & Ballesteros-Gómez, A. (2014.). Assessment of ionic liquid stationary phases for the determination of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and polybrominated diphenyl ethers. *J. Chromatogr. A*, *1348.*, 158–163.
- de Santana-Filho, A., Noleto, G., Gorin, P., de Souza, L., Iacomini, M., & Sasaki, G. (2012.). GC–MS detection and quantification of lipopolysaccharides in polysaccharides through 3-O-acetyl fatty acid methyl esters. *Carbohydr. Polym.*, *87.*, 2730-2734.
- Delmonte, P., Fardin-Kia, A. R., Kramer, J. K., Mossoba, M. M., Sidisky, L., & Rader, J. I. (2011.). Separation characteristics of fatty acid methyl esters using SLB-IL111, a new ionic liquid coated capillary gas chromatographic column. *J. Chromatogr. A*, *1218.*, 545–554.
- Delmonte, P., Fardin-Kia, A. R., Kramer, J. K., Mossoba, M. M., Sidisky, L., Tyburezy, C., & Rader, J. I. (2012.). Evaluation of highly polar ionic liquid gas chromatographic column for the determination of the fatty acids in milk fat. *J. Chromatogr. A*, *1233.*, 137-146.
- Devillard, E., McIntosh, F., Paillard, D., Thomas, N., Shingfield, K., & Wallace, R. (2009.). Differences between human subjects in the composition of the faecal bacterial community and faecal metabolism of linoleic acid. *Microbiology*, *155.*, 513-520.
- Diddens, D. L. (2017.). Aqueous ionic liquids and their influence on peptide conformations: denaturation and dehydration mechanisms. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *19.*, 20430–20440.

- Dodds, E. D., McCoy, M. R., Rea, L. D., & Kennish, J. M. (2005.). Gas chromatographic quantification of fatty acid methyl esters: Flame ionization detection vs. electron impact mass spectrometry. *Lipids*, 40., 419–428.
- Dong, K., Zhang, S., Wang, D., & Yao, X. (2006.). Hydrogen bonds in imidazolium ionic liquids. *J. Phys. Chem. A*, 110., 9775–9782.
- Dymek, C. J., Grossie, D. A., Fratini, A. V., & Adams, W. W. (1989.). Evidence for the presence of hydrogen-bonded ion-ion interactions in the molten salt precursor, 1-methyl-3-ethylimidazolium chloride. *J. Mol. Struct.*, 231., 25–34.
- Dzyuba, S. V., & Bartsch, R. A. (2002.). Influence of Structural Variations in 1-Alkyl(aralkyl)-3-Methylimidazolium Hexafluorophosphates and Bis(trifluoromethylsulfonyl)imides on Physical Properties of the Ionic Liquids. *Chem. Phys. Chem.*, 3., 161-166.
- Eberlein, C., Baumgarten, T., Starke, S., & Heipieper, H. (2018.). Immediate response mechanisms of Gram-negative solvent-tolerant bacteria to cope with environmental stress: Cis/trans isomerization of unsaturated fatty acids and outer membrane vesicle secretion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102., 2583–2593.
- El-Hady, D. A., & Albishri, H. M. (2018.). Temperature controlled ionic liquid aqueous two phase system combined with affinity capillary electrophoresis for rapid and precise pharmaceutical-protein binding measurements. *Methods*, 146., 120-125.
- Endo, J., & Arita, M. (2016.). Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Cardiol.*, 67., 22–27.
- Fanali, C., Micalizzi, G., Dugo, P., & Mondello, L. (2017.). Ionic liquids as stationary phases for fatty acid analysis by gas chromatography. *Analyst*, 142., 4601–4612.
- Fardin-Kia, A., Delmonte, P., Kramer, J., Jahreis, G., Kuhnt, K., Santercole, V., & Rader, J. (2013.). Separation of the Fatty Acids in Menhaden Oil as Methyl Esters with a Highly Polar Ionic Liquid Gas Chromatographic Column and Identification by Time of Flight Mass spectrometry. *Lipids*, 48., 1279–1295.
- FDA Laboratory Manual Volume II: Methods, Method Verification and Validation*. (2023. 10. 11.). Forrás: <https://www.fda.gov/media/73920/download>
- Feng, J., Loussala, H. M., Han, S., Ji, X., Li, C., & Sun, M. (2020.). Recent advances of ionic liquids in sample preparation. *Trends Anal. Chem.*, 125., 115833.
- Fischer, T., Sethi, A., Welton, T., & Woolf, J. (1999.). Diels-Alder reactions in room-temperature ionic liquids. *Tetrahedron Lett.*, 40., 793-796.
- Flieger, J., & Flieger, M. (2020.). Ionic Liquids Toxicity-Benefits and Threats. *Int. J. Mol. Sci.*, 21., 6267-6308.

- Freire, M. G., Neves, C. M., Marrucho, I. M., Coutinho, J. A., & Fernandes, A. M. (2010.). Hydrolysis of Tetrafluoroborate and Hexafluorophosphate Counter Ions in Imidazolium-Based Ionic Liquids. *J. Phys. Chem. A*, *114.*, 3744–3749.
- Freire, M. G., Neves, C. M., Shimizu, K., Bernardes, C. E., Marrucho, I. M., Coutinho, J. A., Lopes, J. N., & Rebelo, L. P. (2010.). Mutual solubility of water and structural/positional isomers of N-alkylpyridinium-based ionic liquids. *J. Phys. Chem. B*, *114.*, 15925–15934.
- Fumino, K., Wulf, A., & Ludwig, R. (2008.). Strong, Localized, and Directional Hydrogen Bonds Fluidize Ionic Liquids. *Angew. Chem. Int. Edit.*, *47.*, 8731-8734.
- Gao, W. W., Zhang, F. X., Zhang, G. X., & Zhou, C. H. (2015.). Key factors affecting the activity and stability of enzymes in ionic liquids and novel applications in biocatalysis. *Biochem. Engin. J.*, *99.*, 67–84.
- Gomez-Cortes, P., Brenna, J., Lawrence, P., & de La Fuente, M. (2016.). Novel characterisation of minor alpha-linolenic acid isomers in linseed oil by gas chromatography and covalent adduct chemical ionisation tandem mass spectrometry. *Food Chem.*, *200.*, 141-145.
- Gomez-Cortes, P., Rodriguez-Pino, V., Juarez, M., & de La Fuente, M. (2017.). Optimization of milk odd and branched-chain fatty acids analysis by gas chromatography using an extremely polar stationary phase. *Food Chem.*, *231.*, 11–18.
- Gram, H. C. (1884.). Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschr. Med.*, *2.*, 185-189.
- Griinari, J., Corl, B., Lacy, S., Chouinard, P., Nurmela, K., & Bauman, D. (2000.). Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by $\Delta 9$ -desaturase. *J. Nutr.*, *130.*, 2285–2291.
- Grishina, E., Ramenskaya, L., & Gruzdev, M. (2013.). Water effect on physicochemical properties of 1-butyl-3-methylimidazolium based ionic liquids with inorganic anions. *J. Mol. Liq.*, *177.*, 267–272.
- Guo, Q., Jiang, F., Jin, J., Li, Q., Wang, F., Wang, Q., & Ha, Y. (2017.). Highly sensitive method for the quantification of trans-linolenic acid isomers in trilinolenin of edible oils using an ionic liquid capillary column. *J. Sci. Food Agric.*, *97.*, 4697–4703.
- Guo, X. F., Chen, H. Y., Zhou, X. H., Wang, H., & Zhang, H. S. (2013.). N-methyl-2-pyrrolidonium methyl sulfonate acidic ionic liquid as a new dynamic coating for separation of basic proteins by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, *34.*, 3287-3292.

- Haberler, M., Schröder, C., & Steinhauser, O. (2012.). Hydrated Ionic Liquids with and without Solute: The Influence of Water Content and Protein Solutes. *J. Chem. Theory Comp.*, 8., 3911–3928.
- Hajba, L., & Guttman, A. (2017.). Recent advances in column coatings for capillary electrophoresis of proteins. *Trends Anal. Chem.*, 90., 38-44.
- Hajba, L., & Guttman, A. (2024.). Ionic liquids in capillary electrophoresis analysis of proteins and carbohydrates. *J. Chromatogr. A*, 1716., 464642-464660.
- Harada, L. K., Pereira, J. F., Campos, W. F., Silva, E. C., Moutinho, C. G., Vila, M., Oliveira, J. M., Teixeira, J. A., Balcao, V. M., & Tubino, M. (2018.). Insights into Protein-Ionic Liquid Interactions Aiming at Macromolecule Delivery Systems. *J. Brazilian Chem. Soc.*, 29., 1983–1998.
- Hartig, C. (2008.). Rapid identification of fatty acid methyl esters using a multidimensional gas chromatography-mass spectrometry database. *J. Chromatogr. A*, 1177., 159-169.
- Harynuk, J., Wynne, P., & Marriott, P. (2006.). Evaluation of new stationary phases for the separation of fatty acid methyl esters. *Chromatographia*, 63., 61-66.
- Haselberg, R., de Jong, G. J., & Somsen, G. W. (2010.). Capillary electrophoresis–mass spectrometry of intact basic proteins using Polybrene–dextran sulfate–Polybrene-coated capillaries: System optimization and performance. *Anal. Chim. Acta*, 678., 128-134.
- He, L., Prodhan, M., Yuan, F., Yin, X., Lorkiewicz, P., Wei, X., Feng, W., McClain, C., & Zhang, X. (2018.). Simultaneous quantification of straight-chain and branched-chain short chain fatty acids by gas chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 1092., 359-367.
- Hjertén, S. (1985.). High-performance electrophoresis: Elimination of electroendosmosis and solute adsorption. *J. Chromatogr. A*, 347., 191-198.
- Hoffmann, M., Fischer, M., & Whittaker, P. (2010.). Evaluating the use of fatty acid profiles to identify deep-sea *Vibrio* isolates. *Food Chem.*, 122., 943-950.
- Holbrey, J., & Seddon, K. (1999.). The phase behaviour of 1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborates; ionic liquids and ionic liquid crystals. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 13., 2133-2139.
- Huang, J. F., Chen, P. Y., Sun, I. W., & Wang, S. P. (2001.). NMR evidence of hydrogen bonding in 1-ethyl-3-methylimidazolium-tetrafluoroborate room temperature ionic liquid. *Inorg. Chim. Acta*, 320., 7-11.

- Jiang, T. F., Wang, Y. H., & Lv, Z. H. (2006.). Dynamic coating of a capillary with room-temperature ionic liquids for the separation of amino acids and acid drugs by capillary electrophoresis. *J. Anal. Chem.*, *61.*, 1108–1112.
- Jiang, T., Gu, Y., Liang, B., Li, J., Shi, Y., & Ou, Q. (2003.). Dynamically coating the capillary with 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids for separation of basic proteins by capillary electrophoresis. *Anal. Chim. Acta*, *479.*, 249–254.
- Jing, B., Lan, N., Qiu, J., & Zhu, Y. (2016.). Interaction of Ionic Liquids with Lipid Bilayer: A Biophysical Study of Ionic Liquid Cytotoxicity. *J. Phys. Chem. B*, *120.*, 2781–2789.
- Judge, R. A., Takahashi, S., Longenecker, K. L., Fry, E. H., Abad-Zapatero, C., & Chiu, M. L. (2009.). The Effect of Ionic Liquids on Protein Crystallization and X-ray Diffraction Resolution. *Cryst. Growth Des.*, *9.*, 3463–3469.
- Junker, F., & Ramos, J. (1999.). Involvement of the cis/trans isomerase Cti in solvent resistance of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.*, *181.*, 5693–5700.
- Karnes, H., & March, C. (1993.). Precision, Accuracy, and Data Acceptance Criteria in Biopharmaceutical Analysis. *Pharm. Res.*, *10.*, 1420-1426.
- Khelissa, S., Abdallah, M., Jama, C., & Chihib, N. (2019.). Actively detached *Pseudomonas aeruginosa* biofilm cell susceptibility to benzalkonium chloride and associated resistance mechanism. *Arch. Microbiol.*, *201.*, 747–755.
- Kim, B., Kim, S., Kim, H., Lee, J., Lee, I., & Park, Y. (2005.). The formation of cyclopropane fatty acids in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, *151.*, 209–218.
- Klahn, M., Lim, G., Seduraman, A., & Wu, P. (2011.). On the different roles of anions and cations in the solvation of enzymes in ionic liquids. *Phys.. Chem. Chem. Phys.*, *13.*, 1649–1662.
- Kowalski, P., Olędzka, I., Plenis, A., Roszkowska, A., & Bączek, T. (2023.). Strengths and weaknesses of ionic liquids as efficiency enhancers in capillary electrophoresis. *Trends Anal. Chem.*, *162.*, 117031.
- Kropinski, A. M., Lewis, V., & Berry, D. (1987.). Effect of growth temperature on the lipids, outer membrane proteins, and lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.*, *169.*, 1960-1966.
- LaBauve, A., & Wargo, M. (2012.). Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Protoc. Microbiol.*, *25.*, 6E.1.1-6E.1.8.
- Landers, J. P., Oda, R. P., Madden, B. J., & Spelsberg, T. C. (1992.). High-performance capillary electrophoresis of glycoproteins: the use of modifiers of electroosmotic flow for analysis of microheterogeneity. *Anal. Biochem.*, *205.*, 115–124.

- Landgraf-Leurs, M., Drummer, C., Fröschl, H., Steinhuber, R., von Schacky, C., & Landgraf, R. (1990.). Pilot study on omega-3 fatty acids in type I diabetes mellitus. *Diabetes*, *39*, 369–375.
- Lenca, N., & Poole, C. F. (2017.). Liquid Chromatography with Room Temperature Ionic Liquids. *JPC-J. Planar Chromat.-Modern TLC*, *30*, 97–105.
- Lim, G., Jaenicke, S., & Klahn, M. (2015.). How the spontaneous insertion of amphiphilic imidazolium-based cations changes biological membranes: a molecular simulation study. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *17*, 29171-29183.
- Lin, C. C., Wasta, Z., & Mjøs, S. A. (2014.). Evaluation of the retention pattern on ionic liquid columns for gas chromatographic analyses of fatty acid methyl esters. *J. Chromatogr. A*, *1350*, 83–91.
- Lin, S. T., Ding, M. F., Chang, C. W., & Lue, S. S. (2004.). Nuclear magnetic resonance spectroscopic study on ionic liquids of 1-alkyl-3-methylimidazolium salts. *Tetrahedron*, *60*, 9441-9446.
- Lingfa, L. (2015.). Study of membrane fatty acids of Gram-negative bacteria and its influence towards the terrestrial ecosystem. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, *4*, 1-19.
- Lodowska, J., Wolny, D., Weglarz, L., & Dzierzewicz, Z. (2007.). The structural diversity of lipid A from Gram-negative bacteria. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, *61*, 106–121.
- Lu, Y., Wang, D., Kong, C., Zhong, H., & Breadmore, M. (2014.). Analysis of aromatic acids by nonaqueous capillary electrophoresis with ionic-liquid electrolytes. *Electrophoresis*, *35*, 3310–3316.
- Łuczak, J., Hupka, J., Thöming, J., & Jungnickel, C. (2008.). Self-organization of imidazolium ionic liquids in aqueous solution. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng.*, *329*, 125–133.
- Lukáčová, M., Barák, I., & Kazár, J. (2008.). Role of structural variations of polysaccharide antigens in the pathogenicity of Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Inf.*, *14*, 200-206.
- Luo, J., Kong, J., Dong, B., Huang, H., Wang, K., Wu, L. H., Hou, C. C., Liang, Y., Li, B., & Chen, Y. (2016.). Baicalein attenuates the quorum sensing-controlled virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and relieves the inflammatory response in *P. aeruginosa*-infected macrophages by downregulating the MAPK and NFκB signal-transduction pathways. *Drug Des. Dev.*, *10*, 183–203.
- Lüderitz, O., Freudenberg, M. A., Galanos, C., Lehmann, V., Rietschel, E. T., & Shaw, D. H. (1982.). Lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. *Curr. Top. Membr. Transp.*, *17*, 79-151.

- MacFarlane, D. R., Vijayaraghavan, R., Ha, H. N., Izgorodin, A., Weaver, K. D., & Elliott, G. D. (2010.). Ionic liquid “buffers”—pH control in ionic liquid systems. *Chem. Commun.*, *46.*, 7703-7705.
- MacFarlane, D. R., Vijayaraghavan, R., Ha, H. N., Izgorodin, A., Weaver, K. D., & Elliott, G. D. (2010.). Ionic liquid “buffers”—pH control in ionic liquid systems. *Chem. Commun.*, *46.*, 7703-7705.
- Machado, M., Queiros, R., Santos, M., Fidalgo, L., Delgadillo, I., & Saraiva, J. (2014.). Effect of ionic liquids alkyl chain length on horseradish peroxidase thermal inactivation kinetics and activity recovery after inactivation. *World J. Microbiol. Biotech.*, *30.*, 487–494.
- Madison, L., & Huisman, G. (1999.). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, *63.*, 21–53.
- Malham, I., & Turmine, M. (2008.). Viscosities and refractive indices of binary mixtures of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and 1-butyl-2,3-dimethylimidazolium tetrafluoroborate with water at 298 K. *J. Chem. Thermodynamics*, *40.*, 718–723.
- Mandal, P. K., Sarkar, M., & Samanta, A. (2004.). Excitation-Wavelength-Dependent Fluorescence Behavior of Some Dipolar Molecules in Room-Temperature Ionic Liquids. *J. Phys. Chem. A*, *108.*, 9048–9053.
- Matreya LLC. (2023. 10. 11.). Forrás: https://www.matreya.com/Products/Bacterial-Acid-Methyl-Esters-CP-Mixture__1114.aspx
- McCormick, R. (1988.). Capillary zone electrophoretic separation of peptides and proteins using low pH buffers in modified silica capillaries. *Anal. Chem.*, *60.*, 2322–2328.
- McReynolds, W. O. (1970.). Characterization of some liquid phases. *J. Chromatogr. Sci.*, *8.*, 685-691.
- Melo, C., Rodrigues, A., & Bogel-Lukasik, R. e. (2012.). Outlook on the phase equilibria of the innovative system of ‘protected glycerol’: 1,4-dioxaspiro[4.5]decane-2-methanol and alternative solvents. *J. Phys. Chem. A*, *116.*, 1765–1773.
- Merck. (2024. 01. 23.). Forrás: <https://www.sigmaaldrich.com/HU/en/product/supelco/crm47791>
- Mesmer, R. E., & Rutenberg, A. C. (1973.). Fluorine-19 Nuclear Magnetic Resonance Studies on Fluoroborate Species in Aqueous Solution. *Inorg. Chem.*, *12.*, 699-702.
- Mező, E., Bufa, A., Páger, Cs., Poór, V., Marosvölgyi, T., Kilar, F., & Makszin, L. (2021.). The Role of Ionic Liquid Interaction in the Separation of Fatty Acid Methyl Esters—Polyunsaturated Geometric Isomers in GC–MS. *Separations*, *8.*, 38-54.

- Mező, E., Hartmann-Balogh, F., Madarászné Horváth, I., Bufa, A., Marosvölgyi, T., Kocsis, B., & Makszin, L. (2022.). Effect of Culture Conditions on Fatty Acid Profiles of Bacteria and Lipopolysaccharides of the Genus *Pseudomonas*—GC-MS Analysis on Ionic Liquid-Based Column. *Molecules*, *27.*, 6930-6951.
- Mező, E., Páger, Cs., Makszin, L., & Kilár, F. (2020.). Capillary zone electrophoresis of proteins applying ionic liquids for dynamic coating and as background electrolyte component. *Electrophoresis*, *41.*, 2083–2091.
- Michalaki, A., Kakavas, D., Giannouli, M., & Grintzalis, K. (2023.). Toxicity of “green solvents” - The impact of butyl methylimidazolium ionic liquids on daphnids. *J. Ionic Liq.*, *3.*, 100059-100068.
- Moss, C. W., & Dees, S. (1975.). Identification of microorganisms by gas chromatographic-mass spectrometric analysis of cellular fatty acids. *J. Chromatogr. A*, *112.*, 595–604.
- Mrozik, A., Labuzek, S., & Piotrowska-Seget, Z. (2005.). Changes in fatty acid composition in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri* during naphthalene degradation. *Microbiol. Res.*, *160.*, 149–157.
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., & Łabuzek, S. (2004.). Changes in whole cell-derived fatty acids induced by naphthalene in bacteria from genus *Pseudomonas*. *Microbiol. Res.*, *159.*, 87-95.
- Müllerová, L., Dubský, P., Svobodová, J., & Gaš, B. (2013.). Determination of effective mobilities of EOF markers in BGE containing sulfated β -cyclodextrin by a two-detector method. *Electrophoresis*, *34.*, 768-776.
- Nguyen, T. V., Viver, T., Smets, I., Bernaerts, K., Faust, K., Lavigne, R., Poughon, L. G., Dussap C., & Springael, D (2023.). *Thermocaproicibacter melissae* gen. nov., sp. nov., a thermophilic chain-elongating bacterium, producing n-caproate from polymeric carbohydrates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, *73.*
- Niu, J., Qiu, H., Li, J., Liu, X., & Jiang, S. (2009.). 1-Hexadecyl-3-methylimidazolium Ionic Liquid as a New Cationic Surfactant for Separation of Phenolic Compounds by MEKC. *Chromatographia*, *69.*, 1093–1096.
- Noritomi, H., Minamisawa, K., Kamiya, R., & Kato, S. (2011.). Thermal stability of proteins in the presence of aprotic ionic liquids. *J. Biomed. Sci. Eng.*, *4.*, 94–99.
- Nu-Check-Prep, Inc.* (2024. 01. 23.). Forrás: <http://www.nu-chekprep.com/catalog.pdf>
- Ober, C., & Gupta, R. (2012.). pH Control of Ionic Liquids with Carbon Dioxide and Water: 1-Ethyl-3-methylimidazolium Acetate. *Ind. Eng. Chem. Res.*, *51.*, 2524-2530.

- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019.). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.*, *37.*, 177–192.
- Patil, R. A., Talebi, M., Sidisky, L. M., & Armstrong, D. (2017.). Examination of selectivities of thermally stable geminal dicationic ionic liquids by structural modification. *Chromatographia*, *80.*, 1563–1574.
- Patil, R. A., Talebi, M., Sidisky, L. M., Berthod, A., & Armstrong, D. W. (2018.). Gas chromatography selectivity of new phosphonium-based dicationic ionic liquid stationary phases. *J. Sep. Sci.*, *41.*, 4142–4148.
- Patil, R. A., Talebi, M., Xu, C., Bhawal, S. S., & Armstrong, D. W. (2016.). Synthesis of thermally stable geminal dicationic ionic liquids and related ionic compounds: an examination of physicochemical properties by structural modification. *Chem. Mater.*, *28.*, 4315–4323.
- Paulton, R. (1991.). The bacterial growth curve. *J. Biol. Educ.*, *25.*, 92–94.
- Payagala, T., Zhang, Y., Wanigasekara, E., Huang, K., Breitbach, Z. S., Sharma, P. S., Sidisky, L. M., & Armstrong, D. W. (2008.). Trigonal tricationic ionic liquids: a generation of gas chromatographic stationary phases. *Anal. Chem.*, *81.*, 160–173.
- Pereiro, A. B., Araujo, J. M., & Esperanca, J. M. (2012.). liquids in separations of azeotropic systems – a review. *J. Chem. Thermodyn.*, *46.*, 2-28.
- Pham, T., Cho, C. W., & Yun, Y. S. (2010.). Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. *Water. Res.*, 352–372.
- Piotrowska-Seget, Z., & Mrozik, A. (2003.). Signature Lipid Biomarker (SLB) Analysis in Determining Changes in Community Structure of Soil Microorganisms. *Pol. J. Environ. Stud.*, *12.*, 669–675.
- Qin, W., & Li, S. F. (2002.). An ionic liquid coating for determination of sildenafil and UK-103,320 in human serum by capillary zone electrophoresis-ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis*, *23.*, 4110–4116.
- Qin, W., Wei, H., & Li, S. F. (2003.). 1,3-Dialkylimidazolium-Based Room-Temperature Ionic Liquids as Background Electrolyte and Coating Material in Aqueous Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, *985.*, 447–454.
- Rather, M. A., Dar, T. A., Singh, L. R., Rather, G. M., & Bhat, M. A. (2020.). Structural-functional integrity of lysozyme in imidazolium based surface active ionic liquids. *Int. J. Biol. Macromol.*, *156.*, 271–279.

- Ratnayake, W., & Pelletier, G. (1992.). Positional and geometrical-isomers of linoleic-acid in partially hydrogenated oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, *69.*, 95–105.
- Robb, C. S. (2007.). Applications of Physically Adsorbed Polymer Coatings in Capillary Electrophoresis. *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, *30.*, 729-759.
- Roy, S., Mandal, S., Banerjee, P., & Sarkar, N. (2018.). Modification of fatty acid vesicle using an imidazolium-based surface active ionic liquid: A detailed study on its modified properties using spectroscopy and microscopy techniques. *J. Chem. Sci.*, *130.*, 1-14.
- Ruiz, E., Ferro, V. R., Palomar, J., Ortega, J., & Rodriguez, J. J. (2013.). Interactions of ionic liquids and acetone: thermodynamic properties, quantum-chemical calculations, and NMR analysis. *Phys. Chem. B*, *117.*, 7388–7398.
- Russell, N., Evans, R., ter Steeg, P., Hellemons, J., Verheul, A., & Abee, T. (1995.). Membranes as a target for stress adaptation. *Int. J. Food Microbiol.*, *28.*, 255–261.
- Saha, D., & Mukherjee, A. (2018.). Effect of water and ionic liquids on biomolecules. *Biophys. Rev.*, *10.*, 795-808.
- Sanderson, S. (2013.). Nutritional Strategies in Gastrointestinal Disease. In R. Washabau, & M. Day, *Canine and Feline Gastroenterology* (old.: 409–428.). Saint Louis, MI, USA: Saunders, W.B.
- Sasser, M. (1990.). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *MIDI technical note 101. Newark, DE: MIDI inc, 101*, 1-7.
- Scherer, C., Müller, K., Rath, P., & Ansorg, R. (2003.). Influence of culture conditions on the fatty acid profiles of laboratory-adapted and freshly isolated strains of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.*, *41.*, 1114–1117.
- Schlormann, W., Birringer, M., Lochner, A., Lorkowski, S., Richter, I., Rohrer, C., & Glei, M. (2016.). In vitro fermentation of nuts results in the formation of butyrate and c9, t11 conjugated linoleic acid as chemopreventive metabolites. *Eur. J. Nutr.*, *55.*, 2063-2073.
- Schröder, C. (2017.). Proteins in Ionic Liquids: Current Status of Experiments and Simulations. *Top. Curr. Chem.*, *375.*, 25-51.
- Segura, A., Duque, E., Mosqueda, G., Ramos, J., & Junker, F. (1999.). Multiple responses of Gram-negative bacteria to organic solvents. *Env. Microbiol.*, *1.*, 191–198.
- Sheldon, R. (2001.). Catalytic reactions in ionic liquids. *Chem. Commun.*, 2399-2407.
- Shukla, S. K., & Mikkola, J. P. (2020.). Use of Ionic Liquids in Protein and DNA Chemistry. *Front. Chem.*, *8.*, 598662-598685.
- Sigma Aldrich. (2014.). *Supelco Ionic Liquid GC Columns: Introduction to the Technology*.
Forrás:

https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/197/160/ionic_liquid_gc_columns.pdf

- Smiatek, J. (2017.). Aqueous ionic liquids and their effects on protein structures: an overview on recent theoretical and experimental results. *J. Phys. Condens. Matter*, 29., 233001.
- Smiglak, M., Reichert, W., Holbrey, J., Wilkes, J., Sun, L., Thrasher, J., Kirichenko, K., Singh, S., Katritzky, A. R., & Rogers, R. (2006.). Combustible ionic liquids by design: Is laboratory safety another ionic liquid myth? *Chem. Comm.*, 24., 2554–2556.
- Soukup-Hein, R. J., Warnke, M. M., & Armstrong, D. W. (2009.). Ionic liquids in analytical chemistry. *Ann. Rev. Anal. Chem.*, 2., 145–168.
- Stavrou, I., & Kapnissi-Christodoulou, C. (2013.). Use of chiral amino acid ester-based ionic liquids as chiral selectors in CE. *Electrophoresis*, 34., 524–530.
- Stoppa, A., Hunger, J., & Buchner, R. (2009.). Conductivities of Binary Mixtures of Ionic Liquids with Polar Solvents. *J. Chem. Engin. Data*, 54., 472–479.
- Suarez, P. A., Einloft, S., Dullius, J. E., de Souza, R. F., & Dupont, J. (1998.). Synthesis and physical-chemical properties of ionic liquids based on 1-n-butyl-3-methylimidazolium cation. *J. Chim. Phys.*, 95., 1626-1639.
- Sun, P., & Armstrong, D. W. (2010.). Ionic liquids in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta*, 661., 1–16.
- Takamuku, T., Tokuda, T., Uchida, T., Sonoda, K., Marekha, B., Idrissi, A., Takahashi, O., Horikawa, Y., Matsumura, J., & Tokushima, T. (2018.). Hydrogen bonds of the imidazolium rings of ionic liquids with DMSO studied by NMR, soft X-ray spectroscopy, and SANS. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 20., 12858–12869.
- Talebi, M., Patil, R. A., & Armstrong, D. W. (2020.). Gas Chromatography Columns Using Ionic Liquids as Stationary Phase. In M. B. Shiflett, *Commercial Applications of Ionic Liquids* (old.: 879–886.). Switzerland: Springer.
- Talebi, M., Patil, R. A., Sidisky, L. M., Berthod, A., & Armstrong, D. W. (2018.). Branched-chain dicationic ionic liquids for fatty acid methyl ester assessment by gas chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.*, 410., 4633–4643.
- Taverniers, I., de Loose, M., & van Bockstaele, E. (2004.). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends Anal. Chem.*, 23., 535–552.
- Todinova, S. G. (2016.). Thermal and conformational stability of insulin in the presence of imidazolium-based ionic liquids. *J. Therm. Anal. Calorimetry*, 123., 2591–2598.

- Tokuda, H., Hayamizu, K., Ishii, K., Susan, A. B., & Watanabe, M. (2004.). Physicochemical Properties and Structures of Room Temperature Ionic Liquids. 1. Variation of Anionic Species. *J. Phys. Chem. B*, *42.*, 16593–16600.
- Tyburczy, C., Delmonte, P., Fardin-Kia, A., Mossoba, M., Kramer, J., & Rader, J. (2012.). Profile of trans Fatty Acids (FAs) Including Trans Polyunsaturated FAs in Representative Fast Food Samples. *J. Agric. Food Chem.*, *60.*, 4567–4577.
- Vaher, M., Koel, M., & Kaljurand, M. (2001.). Non-aqueous capillary electrophoresis in acetonitrile using ionic-liquid buffer electrolytes. *Chromatographia*, *53.*, S302–S306.
- Vaher, M., Koel, M., & Kaljurand, M. (2002.). Application of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids in non-aqueous capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, *979.*, 27–32.
- Vaher, M., Koel, M., & Kaljurand, M. (2002.). Ionic liquids as electrolytes for nonaqueous capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, *23.*, 426–430.
- Veríssimo, N. V., Vicente, F. A., de Oliveira, R. C., Likozar, B., de Souza Oliveira, R. P., & Pereira, J. F. (2022.). Ionic liquids as protein stabilizers for biological and biomedical applications: A review. *Biotechnol. Adv.*, *61.*, 108055.
- Villagrán, C., Deetlefs, M., Pitner, W. R., & Hardacre, C. (2004.). Quantification of Halide in Ionic Liquids Using Ion Chromatography. *Anal. Chem.*, *76.*, 2118-2123.
- Vrikkis, R. M., Fraser, K. J., Fujita, K., MacFarlane, D. R., & Elliott, G. D. (2009.). Biocompatible ionic liquids: a new approach for stabilizing proteins in liquid formulation. *J. Biomech. Eng.*, *131.*, 074514.
- Walczak-Skierska, J., Złoch, M., Pauter, K., Pomastowski, P., & Buszewski, B. (2020.). Lipidomic analysis of lactic acid bacteria strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Dairy Sci.*, *103.*, 11062–11078.
- Walden, P. (1914.). Ueber die Molekulargrösse und elektrische Leitfähigkeit einiger geschmolzenensalze. *Bull. Acad. Imper. Sci. St. Petersburg*, *8.*, 405-422.
- Walden, P. (1927.). Untersuchungen an tief schmelzenden Salzen. *Z. Phys. Chem.*, *130.*, 495–515.
- Wamser, C. A. (1948.). Hydrolysis of Fluoboric Acid in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.*, *70.*, 1209-1215.
- Wan, J., Hu, S., Ni, K., Chang, G., Sun, X., & Yu, L. (2016.). Characterisation of Fecal Soap Fatty Acids, Calcium Contents, Bacterial Community and Short-Chain Fatty Acids in

- Sprague Dawley Rats Fed with Different sn-2 Palmitic Triacylglycerols Diets. *PLoS ONE*, *11*, e0164894.
- Wang, X., Nie, Y., Zhang, X., Zhang, S., & Li, J. (2012.). Recovery of ionic liquids from dilute aqueous solutions by electrodialysis. *Desalination*, *285*, 205-212.
- Watanabe, M., Thomas, M. L., Zhang, S., Ueno, K., Yasuda, T., & Dokko, K. (2017.). Application of Ionic Liquids to Energy Storage and Conversion Materials and Devices. *Chem. Rev.*, *117*, 7190–7239.
- Weber, W., & Andersson, J. T. (2014.). Ionic liquids as stationary phases in gas chromatography—an LSER investigation of six commercial phases and some applications. *Anal. Bioanal. Chem.*, *406*, 5347–5358.
- Welton, T. (2004.). Ionic liquids in catalysis. *Coord. Chem. Rev.*, *248*, 2459-2477.
- Welton, T. (2011.). Ionic liquids in Green Chemistry. *Green Chem.*, *13*, 225-225.
- Westphal, O., & Jann, K. (1965.). Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr. Chem.*, *5*, 83-91.
- Wu, X., Wei, W., Su, Q., Xu, L., & Chen, G. (2008.). Simultaneous separation of basic and acidic proteins using 1-butyl-3-methylimidazolium-based ion liquid as dynamic coating and background electrolyte in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, *29*, 2356–2362.
- Xiao, Y., & Malhotra, S. V. (2005.). Friedel-Crafts acylation reactions in pyridinium based ionic liquids. *J. Organomet. Chem.*, *690*, 3609-3613.
- Yanes, E., Gratz, S., Baldwin, M., Robison, S., & Stalcup, A. (2001.). Capillary electrophoretic application of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids. *Anal. Chem.*, *73*, 3838–3844.
- Yurchenko, S., Sats, A., Tatar, V., Kaart, T., Mootse, H., & Joudu, I. (2018.). Fatty acid profile of milk from Saanen and Swedish Land-race goats. *Food Chem.*, *254*, 326–332.
- Zanferari, F., Vendramini, T., Rentas, M., Gardinal, R., Calomeni, G., Mesquita, L., Takiya, C., & Renno, F. (2018.). Effects of chitosan and whole raw soybeans on ruminal fermentation and bacterial populations, and milk fatty acid profile in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, *101*, 10939–10952.
- Zeng, A., Chin, S., Nolvachai, Y., Kulsing, C., Sidisky, L., & Marriott, P. (2013.). Characterisation of capillary ionic liquid columns for gas chromatography-mass spectrometry analysis of fatty acid methyl esters. *Anal. Chim. Acta*, *803*, 166-173.

- Zhang, Q., Wang, N., & Yu, Z. (2010.). The Hydrogen Bonding Interactions between the Ionic Liquid 1-Ethyl-3-Methylimidazolium Ethyl Sulfate and Water. *J. Phys. Chem. B*, *114*., 4747–4754.
- Zhang, W., Wu, H., Zhang, R., Fang, X., & Xu, W. (2019.). Structure and effective charge characterization of proteins by a mobility capillary electrophoresis based method. *Chem. Sci.*, *10*., 7779–7787.
- Zhang, Y., & Rock, C. (2008.). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, *6*., 222–233.
- Zhou, H., Chen, J., Li, H., Quan, K., Zhang, Y., & Qiu, H. (2020.). Imidazolium ionic liquid-enhanced poly(quinine)-modified silica as a new multi-mode chromatographic stationary phase for separation of achiral and chiral compounds. *Talanta*, *211*., 120743.
- Zhou, J., Sui, H., Jia, Z., Yang, Z., He, L., & Li, X. (2018.). Recovery and purification of ionic liquids from solutions: a review. *RSC Adv.*, *8*., 32832-32864.
- Zuchowska-Grzywacz, M., & Kowalska, M. (2019.). Trans Fatty Acids in food—Current legal regulations as protections for consumers and food manufacturers. *Acta Aliment.*, *48*., 105–114.

Megjelent közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

1. **Emerencia Mező**, Csilla Páger, Lilla Makszin, Ferenc Kilár
Capillary zone electrophoresis of proteins applying ionic liquids for dynamic coating and as background electrolyte component
ELECTROPHORESIS: (2020) 41, 2083-2091. **IF: 3,535**
2. **Emerencia Mező**, Anita Bufa, Csilla Páger, Viktória Poór, Tamás Marosvölgyi, Ferenc Kilár and Lilla Makszin
The Role of Ionic Liquid Interaction in the Separation of Fatty Acid Methyl Esters—Polyunsaturated Geometric Isomers in GC–MS
SEPARATIONS: (2021) 8, 38-54. **IF: 2,6**
3. **Emerencia Mező**, Fruzsina Hartmann-Balogh, Ibolya Madarászné Horváth, Anita Bufa, Tamás Marosvölgyi, Béla Kocsis and Lilla Makszin
Effect of Culture Conditions on Fatty Acid Profiles of Bacteria and Lipopolysaccharides of the Genus Pseudomonas—GC-MS Analysis on Ionic Liquid-Based Column
MOLECULES: (2022) 27, 6930-6951. **IF:4,6**

Az értekezés témáján kívül készült publikációk

1. Buzády Andrea, Tóth György, Unferdorben Márta, Hebling János, Oláh Laura, Hajdara Ivett, Kovács László, **Mező Emerencia**, Lemli Beáta, Kunsági-Máté Sándor, Pálfalvi László
Dielektromos jellemzők meghatározása a THz-es frekvenciatartományban
FIZIKAI SZEMLE: (2016) 66, 413-417.
2. Lilla Makszin, Péter Kustán Balázs Szirmay, Csilla Páger, **Emerencia Mező**, Krisztina Ildikó Kalács, Vera Pászthy, Erzsébet Györgyi, Ferenc Kilár, Andrea Ludány, Tamás Kőszegi
Microchip gel electrophoretic analysis of perchloric acid-soluble serum proteins in systemic inflammatory disorders
ELECTROPHORESIS: (2019) 40, 447-454 **IF: 3,535**

Az értekezés témájában készült konferencia előadások:

1. **Mező Emerencia**, Páger Csilla, Makszin Lilla, Kilár Ferenc
Application of Imidazolium-based Ionic Liquids in the Separation of Proteins by Capillary Zone Electrophoresis
24th International Conference on Chemistry (Szovátafürdő, Románia 2018.10.24-27.):
p. 37.

Az értekezés témájában készült poszter prezentációk

1. **Emerencia Mező**, Csilla Páger, Lilla Makszin, Ferenc Kilár
Separation of Proteins by Capillary Zone Electrophoresis Using Ionic Liquids as Dynamic Coating and Running Electrolyte
11th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods in memoriam of Ernő Tyihák (Siófok, Magyarország 2017.09.06-08.): p. 45.
2. **Mező Emerencia**, Páger Csilla, Makszin Lilla, Kilár Ferenc
Imidazólium-alapú ionfolyadékok alkalmazása fehérjék elválasztására kapilláris zónaelektroforézis módszerrel
Elválasztástudományi vándorgyűlés 2018 (Tapolca, 2018.11.08-10.): p. 110.
3. **Emerencia Mező**, Csilla Páger, Lilla Makszin, Ferenc Kilár
Separation of Proteins by Capillary Zone Electrophoresis Using Ionic Liquids as Dynamic Coating and Running Electrolyte
18th International Symposium and Summer School on Bioanalysis (Komárno, Szlovákia 2018.06.25-30.): p. 63.
4. **Mező Emerencia**, Bufa Anita, Páger Csilla, Poór Viktória, Marosvölgyi Tamás, Kilár Ferenc, Makszin Lilla
Evaluation and validation of gas chromatographic columns for the analysis of the fatty acid methyl esters
Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences (Pécs, Magyarország 2019.11.09.): p. 41.
5. **Mező Emerencia**, Bufa Anita, Páger Csilla, Poór Viktória, Marosvölgyi Tamás, Kilár Ferenc, Makszin Lilla
Characterisation of Gas Chromatography Columns with Different Polarity for Fatty Acid Methyl Esters' Analysis
12th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods (Siófok, Magyarország 2019.09.11-13.): p. 19.

6. **Mező Emerencia**, Bufa Anita, Páger Csilla, Poór Viktória, Marosvölgyi Tamás, Kilár Ferenc, Makszin Lilla
Different polarity of Gas Chromatography columns testing for Fatty Acid Methyl Ester standards
Interdisciplinary Doctoral Conference 2019 (Pécs, 2019.05.24-25.): p. 148.
7. **Mező Emerencia**, Bufa Anita, Páger Csilla, Kocsis Béla, Kilár Ferenc, Makszin Lilla
Application of Ionic Liquid-Based Column for the Analysis of Fatty Acid Composition in Bacteria and its Lipopolysaccharides by GC-MS
Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences (Pécs, Magyarország 2020.10.17.): p. 47.
8. **Mező Emerencia**, Bufa Anita, Madarászné Horváth Ibolya, Balogh-Hartmann Fruzsina, Kilár Ferenc, Kocsis Béla, Makszin Lilla
Környezeti tényezők változásainak hatása baktériumok zsírsavösszetételére
10. Jubileumi Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia (Pécs, Magyarország 2021.11.12-13.): p. 301.
9. **Mező Emerencia**, Bufa Anita, Madarászné Horváth Ibolya, Balogh-Hartmann Fruzsina, Kilár Ferenc, Kocsis Béla, Makszin Lilla
Orvosi szempontból fontos baktériumok zsírsav-összetételének vizsgálata GC-MS módszerrel
METT25 a Magyar Elválasztástudományi Társaság jubileumi konferenciája (Egerszalók, Magyarország 2021.10.18-20.): p. 22.

Az értekezés témáján kívül készült poszter prezentációk

1. **Mező Emerencia**, Matisz Gergely, Kunsági-Máté Sándor, Lemli Beáta
Imidazólium alapú ionfolyadékok és elegyeik szerkezete a folyadékfázisban
XXII. Nemzetközi Vegyészkonferencia (Temesvár, Románia 2016.11.03-06.): p. 52.
2. Buzády Andrea, Tóth György, Unferdorben Márta, Hebling János, Oláh Laura, Hajdara Ivett, Kovács László, **Mező Emerencia**, Lemli Beáta, Kunsági-Máté Sándor, Pálfalvi László
Dielektromos jellemzők meghatározása a THz-es frekvenciatartományban
Fizikus Vándorgyűlés (Szeged, 2016.08.24-27.)
3. Makszin Lilla, Páger Csilla, **Mező Emerencia**, Kustán Péter, Szirmay Balázs, Györgyi Erzsébet, Kőszegi Tamás, Ludány Andrea, Kilár Ferenc
Electrophoretic Analyses of Perchloric Acid Soluble Serum Proteins of Patients

11th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods in memoriam of
Ernö Tyihák (Siófok, Magyarország 2017.09.06-08.): p. 50.