

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

1 Bevezetés

A modern analitikai kémia egyik legnagyobb kihívása a komplex biológiai minták hatékony és megbízható elválasztása. Az elmúlt évtizedekben az ionfolyadékok (ionic liquids, ILs) növekvő figyelmet kaptak az analitikai kémiai alkalmazásokban, mivel számos előnyös tulajdonságuknak köszönhetően lehetővé teszik egyes vegyületek hatékonyabb elválasztását. Ezek a szobahőmérsékleten általánosan folyékony halmazállapotú, ionos összetételű anyagok rendkívül változatos szerkezeti egységekkel rendelkeznek, ezáltal képesek kölcsönhatásba lépni eltérő karakterű, akár poláris, apoláris, amfifil vagy ionos molekulákkal. Jellemzően egy szerves kationból (mint az ammónium, imidazólium, piridinium, piperidinium vagy pirrolidinium) és egy halogenidből, vagy más szerves (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 reagenssé teszik őket a kémia számos területén.

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, 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 Célkitűzések

A PhD munka elsődleges célja az imidazólium-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). Ennek megfelelően a következő célokat tűztük ki:

1. Imidazólium-alapú ionfolyadékok vizes elegyeinek alkalmazása pufferoldatként, illetve a kapillárisfal bevonásához, bázikus fehérjék (citokróm c, lizozim, mioglobín, tripszin, apo-transzferrin) elválasztására kapilláris zónaelektroforézis módszerrel. Az elválasztási paraméterek, mint az alkalmazott feszültség, az ionfolyadék típusa, a puffer koncentrációja, valamint a kapilláris hossz optimalizálása. A kidolgozott módszer statisztikai értékelése, valamint alkalmazhatóságának igazolása biológiai minták (tojásfehérje és humán könny) fehérjeösszetételének meghatározásával.
2. Különböző 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.
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 (25, 37, 42 °C), táptalaj (agar, véres agar), valamint inkubációs idő (1, 3, 5 nap) 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.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Kapilláris zónaelektroforézis módszerfejlesztés

3.1.1 Kapilláris zónaelektroforézis kísérletek

Vizsgálatainkhoz az 1-etil-3-metil-imidazólium tetrafluoro-borát ([emim][BF₄]) és 1-butil-3-metil-imidazólium tetrafluoro-borát ([bmim][BF₄]) ionfolyadékokat; és a citokrom c, lizozim, mioglobin, tripszin és apo-transzferrin fehérje standard-eket használtuk.

A fehérje standard-ekből 10 mg/ml koncentrációjú törzsoldatokat készítettünk desztillált víz segítségével. A mérésekhez használt mintákat a fehérje törzsoldatokból úgy állítottuk elő, hogy az oldatban minden 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.

Az ionfolyadékokból 400 mM koncentrációjú törzsoldatokat készítettünk desztillált víz felhasználásával. A törzsoldatok hígításával 25 és 125 mM koncentrációtartományban oldatokat készítettünk. Az IL-víz elegyeket a kapillárisok 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.

A CE-kísérleteket UV-detektorral felszerelt Agilent 7100 kapilláris elektroforézis készülékkel (Agilent Technologies, Waldbronn, Németország) végeztük. Az elválasztásokat 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 puffer oldattal 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, a kapilláriskazetta hőmérsékletét a mérések alatt 20 °C-on tartottuk.

3.1.2 Statisztikai elemzés

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. Az elemzést az SPSS 25.0 statisztikai szoftverrel végeztük. A lizozim minták LOD értékeit 3-as jel/zaj arány alapján számítottuk ki, míg a LOQ kiszámítása esetén 10-es jel/zaj arányt alkalmaztunk.

3.2 Gázkromatográfiás-tömegspektrometriás módszerfejlesztés

3.2.1 Felhasznált anyagok és GC oszlopok

A módszerfejlesztés során egy 52 darab, C4-től C24-ig terjedő lánchosszúságú zsírsav-metil-észter komponenseket tartalmazó GLC-674 és egy 4 darab, linolsav-metil-észter komponenseket tartalmazó CRM47791 referencia standard keveréket használtunk. A GLC-674 referencia standard esetén 1 mg/ml összkoncentrációjú, a CRM47791 standard esetében 0,08 mg/ml összkoncentrációjú törzsoldatot készítettünk n-hexánnal.

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); 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); valamint egy rendkívül magas polaritású 1,5-di-(2,3-dimetil-imidazólium)pentán bisz-((trifluorometil)szulfonil)imid fázisösszetételű SLB-IL111 oszlopon (hosszúság: 30 m; belső átmérő: 0,25 mm; filmvastagság: 0,20 μm). Az első használat előtt az oszlopokat a gyári ajánlások szerint kondicionáltuk.

3.2.2 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 kromatográfiás körülmények a következők voltak: hélium vivőgáz 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.

A zsírsavak elválasztásához 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. A zsírsavak azonosítása a keverékekben mutatott relatív koncentrációjuk, valamint az MS könyvtár segítségével történt.

3.2.3 Validálási eljárás

A FAME standard 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 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 rendszeralkalmasságot 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 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.

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

3.3.1 Felhasznált anyagok és GC oszlopok

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) alkalmaztunk. A vásárolt 10 mg/ml koncentrációjú metil-kaproátos törzsoldatot n-hexánnal tízszeresére hígítottuk. A zsírsavak azonosításához a GLC-463 referencia standard-et is felhasználtuk.

Vizsgálatainkhoz 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) használtuk. Az első használat előtt az oszlopot a gyári ajánlások szerint kondicionáltuk.

3.3.2 Felhasznált baktériumtörzsek és baktériumtenyésztés

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.

A vizsgált törzseket Müller-Hinton agarra 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.

3.3.3 Endotoxinok kinyerése

Vizsgálataink során a 25 °C-on, 37 °C-on és 42 °C-on tenyésztett *P. 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 fiziológias sóoldattal (500 ml), és acetonban szárítottuk. Az LPS-eket forró fenol-víz extrakciós módszerrel izoláltuk. A lipopoliszacharidokat dialízissel és ultracentrifugálással tisztítottuk 4 °C-on háromszor 100 000 g-vel négy órán keresztül, majd liofilizáltuk.

3.3.4 Származékképzési eljárás

A baktériumokat és az endotoxinokat 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-terc-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. 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.

3.3.5 GC-MS elemzés

A kromatográf és a detektor mérési körülményei megegyeznek a 3.2.2 fejezetben leírtakkal. A megfelelő elválasztási módszer megtalálásához az ott alkalmazott módszert módosítottuk az alábbiak szerint: 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. A zsírsavak azonosítása a retenciós idők, a keverékekben mutatott relatív koncentrációjuk, valamint az MS könyvtár segítségével történt.

3.3.6 Validálási eljárás

Az eljárás menete megegyezik a 3.2.3 fejezetben leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy jelen munkában a BAME CP Mix standard keveréket használtuk kalibrációs oldatként, amelyből acetilezés után egy öt koncentrációból álló oldatsorozatot (0,1; 0,25; 0,5; 0,75 és 1 mg/ml acetonban) készítettünk.

3.3.7 Statisztikai elemzés

Az elemzés menete megegyezik a 3.1.2 fejezetben leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy ebben a munkában a független változók a tenyésztési hőmérséklet (25; 37; 42 °C), a táptalaj típusa (agar, véres agar) és a tenyésztési idő (1, 3, 5 nap) voltak, a függő változók pedig a retenciós idő, az idővel korrigált terület és a zsírsavkomponensek csúcs alatti terület százalékai voltak.

4 Eredmények és értékelésük

4.1 Imidazólium-alapú ionfolyadékok alkalmazása fehérjék elválasztására kapilláris zónaelektroforézis módszerrel

Bázikus fehérjék (citokrom c, lizozim, tripszin, mioglobín és apo-transzferrin) kapilláris zónaelektroforézis elválasztását végeztük el imidazólium-alapú ionfolyadékok felhasználásával. Az ionfolyadékok elválasztásra gyakorolt hatásának vizsgálatára az elválasztásokat különböző kísérleti elrendezésekben, bevonat nélküli és bevonattal ellátott kapillárisokban végeztük. A bevonat nélküli kísérletekben foszfátpuffert (pH 2,2) használtunk, a kapillárisok belső falának módosításához [emim][BF₄] és [bmim][BF₄] ionfolyadékok különböző koncentrációjú vizes elegyeit alkalmaztuk. A bevonat nélküli kapillárisban, foszfátpuffer alkalmazása esetén a vizsgált fehérjék alapvonal szerinti elválasztása nem valósult meg. Ezzel szemben, az ionfolyadékkal bevont kapillárisban, de szintén foszfátpuffer használatával végzett kísérletekben a fehérjék elválasztása valamivel jobb felbontást mutatott és eltérő migrációs sorrend alakult ki. Végül, az ionfolyadékok puffer komponensként (pH 2,2) és bevonatként történő egyidejű alkalmazásával a vizsgált fehérjék hatékony elválasztása valósult meg. Továbbá megfigyelhető volt a korábbiaktól eltérő migrációs sorrend kialakulása.

Az azonos pH-jú, de eltérő pufferoldatok alkalmazásával kapott eredmények tehát azt mutatják, hogy a fehérjék felbontása nagymértékben megnövekedett az ionfolyadékok jelenlétében. Az imidazólium-alapú ionfolyadékok alkalmazása két szempontból jelentett előnyt. Egyrészt az imidazólium kationok jelenléte a kapilláris dinamikus bevonatához vezetett, amely megakadályozta a bázikus fehérjék adszorpcióját a kapilláris felületén. Másrészt a fehérjék és az ionfolyadékok között kialakuló különböző típusú kölcsönhatások az elválasztás mechanizmusában módosulást idézhetnek elő, melynek okán megváltozott a migrációs sorrend, és amellyel az elválasztandó komponensek jobb felbontását eredményezték.

Érdemes megjegyezni, hogy az ionfolyadék-tartalmú pufferoldatok pH-ja az ionfolyadék koncentráció, valamint a törzsoldat elkészítése során a hőmérséklet és az elkészítéstől eltelt idő függvényében változott, amely hatással volt a fehérjeelválasztásokra is. Amikor a frissen elkészített ionfolyadék-tartalmú törzsoldatot a megfelelő koncentrációra hígítottuk, az így kapott pufferrel nem sikerült megvalósítani az elválasztást. A törzsoldat 10 napos szobahőmérsékleten történő tárolása utáni hígításával viszont hatékony elválasztásokat értünk el. Ezek a tapasztalatok a tetrafluoro-borát anion hidrolízisére vezethetők vissza.

Részletesen tanulmányoztuk a különféle kísérleti paraméterek, mint a feszültség, az ionfolyadék koncentrációja és típusa, a pH, valamint a kapilláris hossz hatását az elválasztásra. Az elektroforetikus elválasztás optimális körülményeit a kísérleti paraméterek többváltozós analízisével (MANOVA) is megvizsgáltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a két ionfolyadék alkalmazása esetén nem volt szignifikáns különbség, az elválasztási időkben ($p = 0,874$), és a

módszer kidolgozása során a 100 mM ionfolyadék koncentrációt, a +18 kV feszültséget és az 51 cm kapilláris hosszát találtuk optimálisnak a fehérjék elválasztásához.

A dinamikusan 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 napon belüli és a napok közötti (napról napra és hónapról hónapra) ismétlődő kísérletekben a migrációs idők relatív hiba (RSD) értékei 10% alatt alakultak mindkét ionfolyadék esetén.

Módszerünket sikeresen alkalmaztuk a tojásfehérje és a humán könny fehérjeösszetételének meghatározására, ahol a valós minták elektroferogramjai a lizozim és ovalbumin komponensek jó felbontását tapasztaltuk.

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

Három különböző tulajdonságú gázkromatográfias oszlop, az apoláris HP-5MS, a közepes/nagy polaritású DB-225MS és az extrém poláris, ionfolyadék-alapú SLB-IL111 oszlop hatékonyságát vizsgáltuk meg zsírsav-metil-észterek elválasztásában GC-MS módszerrel. Méréseinkhez egy 52 darab, C4-től C24-ig terjedő lánchosszúságú zsírsav-metil-észter komponenseket tartalmazó és egy 4 darab, linolsav-metil-észter komponenseket tartalmazó standard keveréket használtunk. Kimutattuk, hogy szignifikáns különbségek tapasztalhatók a polisziloxán-alapú és az ionfolyadék-alapú oszlopok hatékonyságában. Ugyan az apoláris és a közepes/nagy polaritású polisziloxán-alapú oszlopok hatékonyak bizonyultak a telített és egyszeresen telítetlen zsírsavak elválasztásában, az extrém poláris ionfolyadék-alapú oszlop mutatta a legkevesebb koelúciót mindkét standard keverék esetében. Az IL-alapú oszlop kiemelkedően alkalmas volt továbbá a linolsav-metil-észter geometriai izomereinek alapvonal szerinti elválasztására. Az ionfolyadék-alapú állófázis által biztosított intermolekuláris kölcsönhatások (dipól-dipól, hidrogénkötés, diszperziós kölcsönhatások) együttesen növelték a komponensek retencióját, különösen a C18:2 régió *cisz/transz* izomereinek hatékonyabb elválasztását eredményezve. Ez 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.

A kidolgozott módszereket validáltuk, azaz megvizsgáltuk a válaszjel linearitását, a kimutatási és mennyiségi meghatározás határát, a rendszeralkalmasságot, a napon belüli és napok közötti ismételhetséget és a pontosságot. A validálási eredmények mindhárom módszer esetén megfeleltek a rájuk vonatkozó kritériumoknak; ugyanakkor az ionfolyadék-alapú oszlop adta a legjobb eredményeket. Mindezek megmutatják az ionfolyadékok speciális kölcsönhatásainak nagy elválasztó erejét még a rövid, 25-30 m hosszú oszlopok esetében is.

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

A tenyésztési körülmények zsírsavösszetételre gyakorolt hatását a *P. aeruginosa* PAO1 baktérium és lipopoliszacharidjai (LPS), a *P. aeruginosa* ATCC 27853, a *P. aeruginosa* polirezisztens és a *P. putida* baktériumok esetében GC-MS módszerrel vizsgáltuk meg. A zsírsavakat metil-észter formában elemeztük, és vizsgálatainkhoz, a változatos szénatomszámú és telítettségű zsírsav-metil-észterek elválasztására korábban sikeresen alkalmazott, ionfolyadék-alapú SLB-IL111 oszlopot használtuk. A kidolgozott módszert egy, a baktériumokban általánosan előforduló zsírsav-metil-észtereket tartalmazó standard keverék felhasználásával validáltuk, azaz meghatároztuk a válaszjel linearitását, a kimutatási és mennyiségi meghatározási határt, a rendszeralkalmasságot, a napon belüli és napok közötti ismételhetséget, valamint a pontosságot. A validálási eredmények alátámasztották az ionfolyadék-alapú oszlop magas elválasztási hatékonyságát bakteriális eredetű zsírsavak tekintetében.

A különböző tenyésztési körülmények hatását agar és véres agar táptalajon; 25, 37 és 42 °C-on; valamint a beoltást követő 1., 3. és 5. napon követtük nyomon. A tenyésztés **optimális körülményei** között (37 °C, agar táptalaj, egynapos inkubáció) a vizsgált *Pseudomonas* fajokban a legnagyobb arányban a telített (SAFA - 60,6%) és az egyszeresen telítetlen zsírsavak (MUFA - 24,4%) fordultak elő. Kis mértékben kimutathatók voltak továbbá a hidroxil- (9,0%) és a ciklopropán-zsírsavak (8,0%) is. Ezenkívül legnagyobb arányban a hosszú szénláncú zsírsavak (LCFA), míg kis mértékben a közepes szénláncú zsírsavak (MCFA) voltak jelen az izolátumokban. A *P. aeruginosa* antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájának egyik fő mechanizmusa a külső membrán alacsony permeabilitásának fenntartása. A telített zsírsavak általános nagyarányú előfordulása, merev és kevésbé permeábilis membránszerkezetre utal az optimális körülmények esetén, amelyet tovább erősít a nagy mennyiségű (90%) LCFA zsírsavak jelenléte. A *P. aeruginosa* PAO1 baktérium és lipopoliszacharidjainak eredményeit összehasonlítva elsősorban a zsírsavkomponensek eloszlásában találtunk szignifikáns különbségeket. Míg a baktériumban a MUFA, addig az LPS-ekben a hidroxil-zsírsavak domináltak.

A baktériumok számos olyan mechanizmust képesek kifejleszteni, amelyek lehetővé teszik számukra, hogy kedvezőtlen körülmények között is túléljenek. Ezek a folyamatok főként a membrán összetételének megváltoztatásán alapulnak. A főbb zsírsavosztályok összehasonlítása azt mutatta, hogy a 25 °C-ról 42 °C-ra emelt **tenyésztési hőmérséklet** növekedést eredményezett a telített zsírsavak mennyiségében az összes vizsgált izolátum esetén. Ez a sejtmembrán növekvő merevségét és csökkenő permeabilitását jelzi, amely megakadályozhatja az antibiotikumok/szennyező anyagok bejutását a sejtbe. Ezzel szemben 37 °C-on a *cis*-MUFA zsírsavak arányának csökkenése és a ciklopropán-zsírsavak megfelelő *cis*-MUFA-prekurzoraikhoz viszonyított arányának növekedése volt megfigyelhető. Ez a két változás

csökkenti a sejtmembránok permeabilitását, így megállapítható, hogy a membrán permeabilitása és fluiditása 37 °C-on csökkent. A tenyésztési hőmérséklet változására adott további reakció az egyes zsírsavak megjelenése, vagy éppen eltűnése volt. Több elágazó zsírsav mindössze a hőmérséklet 42 °C-ra való emelése esetén jelent meg, számos telített zsírsav pedig a hőmérséklet 37 vagy 42 °C-ra emelésével nem volt kimutatható az izolátumokban. Végül, a PAO1 LPS-ben kimutatható hidroxizsírsavak közül a 2-OH és a 3-OH-C12:0 aránya a hőmérséklet emelkedésének hatására változott. A hidroxizsírsavak arányának változása összefüggésbe hozható a baktériumok antibiotikum-rezisztenciájában bekövetkező változásokkal.

Az **agar és véres agar táptalajokon** kapott zsírsavprofilok összehasonlítása során minőségi és mennyiségi különbségeket is megfigyeltünk. 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. Csupán a C18:1c esetében észleltünk új zsírsav képződését a véres agar táptalajban, amely a véres agar táptalajból történő felvétel következménye lehetett.

Az **inkubációs idő** változása szintén jelentős hatást gyakorolt a zsírsavak eloszlására mind agar, mind véres agar táptalaj esetén. Jellemzően a harmadik inkubációs napon gyűjtött minták esetén tapasztaltuk a legintenzívebb zsírsavcsúcsokat. Az inkubációs idő 1 napról 5 napra emelésével, főként a zsírsavprofilok eloszlási különbségeit figyeltük meg, azonban néhány esetben új zsírsavak is megjelentek. 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, melynek oka, hogy a baktériumokban korlátozott tápanyag esetén hidroxizsírsavakat is tartalmazó vegyületek halmozódnak fel. Továbbá az LCFA zsírsavak százalékos arányának jelentős csökkenése is megfigyelhető volt az 5. napon 42 °C-on. 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), amely tapasztalat megerősíti, hogy a Gram-negatív baktériumok a korlátozott tápanyagokra is reagálhatnak azáltal, hogy a MUFA zsírsavakat ciklopropán-zsírsavakká alakítják.

A baktérium külső behatások által bekövetkező szerkezeti változásai révén befolyásolja a membrán permeabilitását, valamint az antimikrobiális szerekkel szembeni ellenálló képességét. Az SLB-IL111 oszlop ilyen fajta használata a részletes módszerfejlesztéssel és validálási eljárással, korábban nem került leírásra.

5 Tézisek

1. Imidazólium-alapú ionfolyadékok felhasználásával hatékony kapilláris zónaelektroforézis és gázkromatográfiás módszereket dolgoztunk ki fehérjék és zsírsavak meghatározására különféle biológiai mintákban.
2. Eredményeink alátámasztják, hogy az imidazólium-alapú ionfolyadékok kapilláris zónaelektroforézisben, valamint gázkromatográfiában történő alkalmazása biológiai minták vizsgálatára jelentősen javítja az elválasztások szelektivitását.
3. Részletesen bemutattuk az ionfolyadékok használatával elérhető hatékonyságnövelés hátterében álló folyamatokat az egyes analitikai eljárások esetén.
4. A validálási eredmények megerősítik, hogy valamennyi kidolgozott módszer pontos, hiteles és alkalmas a vizsgált anyagok analízisére.
5. Bázikus fehérjék kiváló elválasztását értük el - a nem bevonatos kapillárisban végzett kísérletekhez képest - [bmim][BF₄] és [emim][BF₄] ionfolyadékok alkalmazásával puffer komponensként és a kapillárisok belső felületének módosítására kapilláris zónaelektroforézisben. 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 nem vizsgáltak korábban. A kidolgozott módszert sikeresen alkalmaztuk valós biológiai minták, mint tojásfehérje- és humán könnyminták fehérjéinek elemzésére.
6. Az ionfolyadékok használata kapilláris elektroforézis módszer esetében több előnyt is kínál. Puffer komponensként alkalmazva és a kapilláris dinamikus bevonata által megakadályozhatják a komponensek kitapadását a kapilláris belső felületére, az ionfolyadékokkal kialakuló kölcsönhatások pedig növelhetik az elektroforetikus elválasztások hatékonyságát.
7. Megállapítottuk, hogy a rendkívül poláris ionfolyadék-alapú SLB-IL111 oszlop kivételes hatékonyságot nyújt a *cisz/transz* izomerek elválasztásában, legfőképp a linolsav-metil-észter négy geometriai izomerje esetében, 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 az ionfolyadék-alapú oszlop használatával.
8. Az ionfolyadék állófázis által biztosított intermolekuláris kölcsönhatások (hidrogénkötés, dipól-dipól, diszperziós kölcsönhatások) sokfélesége lehetővé tette a változatos szénatomszámú és telítettségű zsírsavak sikeres elválasztását, valamint minőségi és mennyiségi meghatározását biológiai mátrixokból, mint például baktérium izolátumokból.

Megállapítottuk, hogy a tenyésztési körülményekben (tenyésztési hőmérséklet, táptalaj, inkubációs idő) bekövetkező eltérések a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó baktériumok és lipopoliszacharidjai zsírsavösszetételének megváltozását okozzák, azaz eloszlásbeli különbségeket, vagy éppen új zsírsavak megjelenését, akár eltűnését eredményezhetik. Az SLB-IL111 oszlop ilyen fajta használata korábban nem került leírásra.

6 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 irányításait 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.

7 Publikációs jegyzék

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 Madarász né 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*. XXIV. Nemzetközi Vegyészkonferencia, 24th International Conference on Chemistry (Szóvatafűrdő, 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, 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, 2018.06.25-30.): p. 63.

4. **Mező Emerencia**, Bufa Anita, Páger Csilla, Poór Viktória, Marosvölgyi Tamás, Kilar 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, 2019.11.09.): p. 41.
5. **Mező Emerencia**, Bufa Anita, Páger Csilla, Poór Viktória, Marosvölgyi Tamás, Kilar 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, 2019.09.11-13.): p. 19.
6. **Mező Emerencia**, Bufa Anita, Páger Csilla, Poór Viktória, Marosvölgyi Tamás, Kilar 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, Kilar 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, 2020.10.17.): p. 47.
8. **Mező Emerencia**, Bufa Anita, Madarászné Horváth Ibolya, Balogh-Hartmann Fruzsina, Kilar Ferenc, Kocsis Béla, Makszin Lilla: *Környezeti tényezők változásainak hatása baktériumok zsírsavösszetételére*. 10. Jubileumi Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia (Pécs, 2021.11.12-13.): p. 301.
9. **Mező Emerencia**, Bufa Anita, Madarászné Horváth Ibolya, Balogh-Hartmann Fruzsina, Kilar Ferenc, Kocsis Béla, Makszin Lilla: *Orvosi szempontból fontos baktériumok zsírsavösszetételének vizsgálata GC-MS módszerrel*. METT25 a Magyar Elválasztástudományi Társaság jubileumi konferenciája (Egerszalók, 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, Kószegi Tamás, Ludány Andrea, Kilar Ferenc: *Electrophoretic Analyses of Perchloric Acid Soluble Serum Proteins of Patients*. 11th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods in memoriam of Ernő Tyihák (Siófok, 2017.09.06-08.): p. 50.