

# PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

## Biopolimerek elválasztása különböző típusú folyadék- kromatográfiás állófázisokon

PhD értekezés tézisei

**Kiss Ibolya**

Témavezetők

**Dr. Felsing Attila**  
egyetemi tanár

**Dr. Ohmacht Róbert**  
egyetemi tanár



**PÉCS, 2010**



## 1. BEVEZETÉS

A múlt század második felében az elválasztástechnikai módszerek többsége jelentős fejlődésen ment keresztül.

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) napjainkra az egyik legjelentősebb műszeres analitikai módszerré vált. A folyadékfázisú analitikai elválasztások tervezése bonyolult feladat, mivel egyszerre több tényezőt is figyelembe kell venni, ilyen pl. a mozgófázis, az állófázis és a mintakomponensek kémiai szerkezete, fizikai-kémiai tulajdonsága, valamint a detektálhatóság paraméterei.

A fordított fázisú kromatográfia (RP-HPLC) retenciós mechanizmusának magyarázatára számos elmélet született. A hidrofób kölcsönhatások elmélete, a megoszlási elmélet, valamint az adszorpciós elmélet a legfontosabbak. Az RP-HPLC retenciós mechanizmusa jelenleg is a folyadékkromatográfia fontos kutatási területe. Napjainkban a kutatók arra törekednek, hogy minél jobban megértsék a retenciót és a szelektivitást meghatározó folyamatokat. Különösen fontos e folyamatok molekuláris szinten történő értelmezése, összefüggése az állófázisok fizikai-kémiai tulajdonságaival.

A kromatográfias berendezések fejlesztésével párhuzamosan szükségessé vált az állófázisok (a speciális töltetek) és oszlopok fejlesztése, kidolgozása is. Igény van az újabb és újabb, a korábitól eltérő tulajdonságú állófázisok alkalmazására, így a töltetfejlesztés területén ma is folyamatos fejlődés tapasztalható, hiszen az állófázis a kromatográfias elválasztások „lelke”.

Jelenleg valószínűleg több elválasztást végeznek HPLC módszerekkel, mint az összes többi elválasztáson alapuló módszerrel együttvéve. A módszer népszerűségének oka, hogy könnyen kivitelezhető és széleskörűen alkalmazható mind a kisméretű molekulák, mind pedig a biopolimerek elválasztására. A bioaktív vegyületek elválasztásánál nagy gondot kell fordítani az alkalmazandó kromatográfias töltet kiválasztására. Napjainkban az elválasztásokhoz egyre gyakrabban alkalmazzák a 3  $\mu\text{m}$ -nél kisebb szemcseátmérőjű fordított fázisú tölteteket.

## 2. KUTATÁSI CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során célul tűzzük ki a különböző típusú (porózus, porózus héjú és nemporózus fordított fázisú) töltetek összehasonlítását figyelembe véve mind a bioaktív kis és nagy molekulatömegű vegyületek nagysebességű HPLC elválasztását, mind pedig az anyagátadási gátlás együtthatóit.

Méréseinknél a kromatográfias analízisekhez olyan vegyületeket, vegyületcsoportokat választunk, melyek az élettudományok területén jelentőséggel bírnak.

Kutatási céljaink a következőképpen foglalhatók össze:

- Vizsgálni kívánjuk erősen savas és erősen bázikus kémhatású eluensek tartós használata mellett a Kovasil töltet(ek) kémiai stabilitását.
- Méréseink célja a biopolimerek elválasztása során a rövid analízisidő elérése nemporózus fordított fázisú tölteten. A biopolimerek (fehérje keverékek, peptidelegyek) HPLC elválasztása gyakran igen fontos analitikai feladat. Porózus töltetek alkalmazásával ezekre az elválasztásokra a hosszú analízisidő jellemző.
- Vizsgálatainkkal bizonyítani kívánjuk, hogy a nemporózus fordított fázisú töltet a biopolimerek elválasztása mellett kitűnően használható a kis molekulatömegű ( $M \sim 100-500$  Da) bioaktív vegyületek (pl. víz- és zsírolékony vitaminok) gyors, nagyérzékenységű elválasztására is.
- Célunk továbbá az anyagátadási együtthatók meghatározása és összehasonlítása a különböző típusú töltetek esetében. A méréseinket a porózus SunFire  $C_{18}$  és a porózus héjú Halo  $C_{18}$  állófázisokkal végezzük. Számításainkhoz meghatározzuk az állófázisok térkitöltési tényezőit inverz méretkizárásos kromatográfiát alkalmazva.

Az anyagátadási együtthatókat a következő módszerek szerint kívánjuk meghatározni:

- az általános sebességi modell alapján;
- a van Deemter-egyenlet alapján;
- momentum analízissel;
- valamint a kromatográfia sztochasztikus modellje alapján.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Felmérések szerint az összes HPLC elválasztás kb. 80%-át fordított fázisú tölteteken végzik. A fordított fázisú folyadékkromatográfiás töltetek körében továbbra is a leginkább a szilikagél alapú (~75%) állófázisok (felületükön alkil-csoportokkal) terjedtek el.

#### **Bioaktív molekulák szupergyors folyadékkromatográfiás elválasztása**

A bioaktív molekulák rövid, néhány perces analízisét gradiens elúciós technika alkalmazásával értük el. A svájci Chemie Uetikon AG Kovasil-MS-H és Kovasil-C<sub>14</sub> oszlopait használtuk. Az állófázis egy nagy tisztaságú (nehézfémmentes), nemporózus, monodiszperz, 1,5 µm szemcseátmérőjű szilikagél, ahol a töltet szemcsék felületén kémiaiilag kötött C<sub>6</sub>, valamint C<sub>14</sub> lánchosszúságú, alifás szénhidrogén csoportok helyezkednek el.

A méréseket Gynkotec (Germering, Németország) készüléssel végeztem, mely egy terner gradiens szivattyúból, Rheodyne injektorból (Cotati CA, USA) 170S diódasoros detektorból és Chromeleon kromatográfiás szabályozó és kiértékelő szoftverből áll. A hőmérsékletet Grant W6 (Grant Instruments, Cambridge, Anglia) cirkulációs termosztáttal állítottuk be.

#### **Az anyagátadási együtthatók meghatározása**

A teljesen porózus (SunFire C<sub>18</sub>) és a porózus héjú (Halo C<sub>18</sub>) állófázis anyagátadási együtthatóinak meghatározására különböző áramlási sebességen, 0,02–1,4 cm<sup>3</sup>/perc tartományban (p ~ 5–325 bar) 20 °C-on végeztem a méréseket. Az eluens 79% vizet, 21% acetonitrilt (ACN) és 0,1% trifluor-ecetsavat (TFA) tartalmazott. A minta humán inzulin (c = 0,1 mg/ cm<sup>3</sup>) volt, 1 µl-t injektáltam. A detektálás 205 nm-es hullámhosszon történt.

A méréseket egy Agilent 1100 folyadékkromatográfval végeztem. A készülék egy bináris pumparendszerből, automata mintaadagolóból, oszlop termosztáttól és diódasoros UV-detektorból épül fel.

## 4. EREDMÉNYEK

Értekezésemben a kis molekulatömegű ( $M = 100-500$  Da) bioaktív vegyületek és a biopolimerek gyors, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztásához a nemporózus szilikagél alapú hidrofób állófázisok alkalmazhatóságát vizsgáltam.

A mérésekhez használt minták kiválasztásánál olyan vegyületcsoportokat részesítettem előnyben, amelyek az élettudományokban, az orvos-biológiai kutatásokban és a klinikai analízisekben is jelentőséggel bírnak (pl. peptidek, fehérjék, víz- és zsírolékony vitaminok). A kiválasztott vegyületek kromatográfiás szempontból is sokfélék; voltak közöttük erősen poláris, gyengén poláris, savas és bázikus kémhatású vegyületek. Az eltérő elválasztási problémát jelentő vegyületekkel igazoltam a nemporózus, monodiszperz töltetek széleskörű alkalmazhatóságát.

1. A kémiai stabilitással jellemeztük a Kovasil töltet viselkedését erősen savas és bázikus kémhatású eluensek használata esetén. A stabilitásvizsgálatnál  $\text{pH}=1,9$  és  $\text{pH}=8,5$  kémhatású eluenst áramoltattam át az oszlopon  $80^\circ\text{C}$ -on. A közel 400 órás folyamatos igénybevétel után a tesztvegyületek retenciója állandónak bizonyult, a töltet kémiai stabilitása kiváló, ami hosszú időn keresztül reprodukálható eredmények biztosítására utal.

A rövid, nemporózus töltetet tartalmazó oszlopokkal ( $33\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$ ), rutin folyadékkromatográfiás berendezéssel, gradiens elúciós technika alkalmazásával új, szupergyors folyadékkromatográfiás elválasztási eljárásokat dolgoztam ki kis molekulatömegű (víz- és zsírolékony vitaminok) és nagy molekulatömegű (peptidek, polipeptidek) bioaktív vegyületek analízisére.

2. Hat vízóldékony vitamint (savas és bázikus komponenst) tartalmazó keveréket 1,1 perc alatt választottam el, ionpárképzőt (heptán-szulfonsav) adagolva, gradiens elúciót alkalmazva, az oldószererősség mellett az eluens kémhatását is változtattam.
3. Az általam vizsgált nyolc zsírolékony vitamin elválasztásának időszükséglete 2,5 perc volt. Vizsgáltam az elválasztott vegyületek kimutatási határát, az alkalmazott körülmények között a vegyületek többségére az alacsony,  $10^{-12}$  mol kimutatási határ volt a jellemző.
4. Módszert dolgoztam ki magas hőmérsékleten ( $70^\circ\text{C}$ ), nagy áramlási sebességgel, többlépcsős gradienst alkalmazva fehérjék enzimatis bontása során keletkező peptidek elválasztására. A nagy molekulatömegű szarvasmarha szérumalbumin ( $M \sim$

68.000 Da) tripszines bontása 7-12 aminosav hosszúságú 79 peptid képződéséhez vezet. A lényegesen kisebb molekulatömegű szarvasmarha citokróm-c (M ~ 13.000 Da) tripszines kezelése során 13 jól meghatározott peptid keletkezik. A bontás után kapott peptidek elválasztására az általam kidolgozott módszer időszükséglete kevesebb, mint 3 perc, ami 10-15-ször kisebb, mint az irodalomban közétett porózus tölteten végzett elválasztások időszükséglete.

5. Méréseimmel igazoltam a gyors fehérjeelválasztások hatékonyságát nemporózus állófázisokon, amikor is a visszanyerés gyakorlatilag teljes. (A jó visszanyerhetőség jelentősen befolyásolja az állófázis élettartamát, a töltetszemcsék felületének elszennyződése – biopolimerek analízisének gyakori probléma – nem jelentős.)
6. Bemutattam a  $\beta$ -laktoglobulin B és  $\beta$ -laktoglobulin A elválasztását. Az alkalmazott magas analízis hőmérsékleten (95 °C) az eluens viszkozitásának csökkenése miatt az áramlási sebesség (3,6 cm<sup>3</sup>/perc) növelhető, így igen gyors (0,2 perc) elválasztás végezhető el. Az elválasztás hatékonysága is javul magasabb hőmérsékleten, hiszen a viszkozitás csökkenés miatt a rendszerben csökken az anyagátadási ellenállás.

Kísérleteim, méréseim kiértékelésére makroszkópikus és mikroszkópikus módszereket alkalmaztam. Meghatároztam az inzulinra vonatkozóan az anyagátadási együtthatókat porózus (Sun Fire) és porózus héjú (Halo) állófázis alkalmazása mellett.

7. Méréseim, számításaim alapján megállapítottam, hogy a mért inzulin, ill. nagy molekulák esetében az áramlási sebesség, ill. a nyomásváltozás erősen befolyásolja a retenciót. Az általános sebességi modellt alkalmazva meghatároztam az axiális diszperziót ( $D_L$ ), a külső anyagátadási együtthatót ( $k_{ext}$ ), valamint a pórusbeli diffúziós együttható ( $D_p$ ) értékét.
8. A sztochasztikus elmélet segítségével meghatároztam az inzulin olyan molekuláris retenciós tulajdonságait, mint az adszorpciós-deszorpciós lépések száma ( $n$ ), az átlagos tartózkodási idő egy-egy megkötődés alkalmával ( $\tau_s$ ), vagy a mozgófázisban való átlagos tartózkodási idő egy deszorpció és az azt követő adszorpció között ( $\tau_m$ ). A mérési eredmények alapján megállapítottam, hogy a nagy áramlási sebességek mellett az inzulin molekulák átlagos adszorpciós ideje a porózus héjú állófázison (150 ms) nagyobb, mint a teljesen porózus állófázison (100 ms). Az inzulin retenciós tényezője kétszer nagyobb a porózus héjú állófázison, mint a teljesen porózus állófázison. Az állófázisban a tartózkodási idő egyenesen arányos a retenciós tényezővel ( $k' = \tau_s / \tau_m$ ), ha a retenciós tényezők megegyeznének a két oszlopon, akkor a porózus héjú töltetben az átlagos tartózkodási idő a teljesen porózus fázisban eltöltött idő 75%-a lenne.

## **5. AZ EREDMÉNYEK HASZNOSÍTÁSI LEHETŐSÉGEI**

Munkánkban az általunk vizsgált állófázisok tulajdonságait bemutattuk, azokat méréseinkkel alátámasztottuk. A levont következtetések mind a felhasználók mind pedig a gyártók számára hasznosak, segítik az elválasztási folyamat jobb, teljesebb megértését, valamint segítik a nehéz elválasztási feladatok megoldását, a módszerek megtervezését.



## 6. MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

### A PhD értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények

R. Ohmacht - **I. Kiss**: Application of a New Non-porous Stationary Phase (Kovasil-H) for Fast Separation of Peptides by HPLC. *Chromatographia*, 42 (1996) 595. IF 1,869

Ohmacht R. - **Kiss I.**: Peptidek gyors HPLC elválasztása nemporózus állófázison. *Magyar Kémiai Folyóirat*, 103 (1997) 506. IF 0,215

R. Ohmacht - B. Boros - **I. Kiss** – L. Jelinek: Quick and Sensitive HPLC Separations on Non-porous Reversed-Phase Packings. *Chromatographia*, 50 (1999) 75. IF 1.741

Ohmacht R. - Boros B. - Kovács K. - **Kiss I.**: Bioaktív vegyületek gyors és nagyérzékenységű folyadékkromatográfiás elválasztása nemporózus állófázison. *Magyar Kémiai Folyóirat*, 105 (1999) 465. IF 0,130

**I. Kiss** - I. Bacskay - F. Kilár - A. Felinger: Comparison of the Mass Transfer in Totally Porous and Superficially Porous Stationary Phases in Liquid Chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397 (2010) 1307. IF 3,328

### A PhD értekezés alapjául szolgáló előadások, poszterek

R. Ohmacht - **I. Kiss** - M. Kele: Application of a New Non-porous Stationary Phase for Peptide Mapping. Balaton Conference on High Performance Separation Techniques. Sept. 6 - 8, 1995. Siófok, Hungary

R. Ohmacht - B. Boros - **I. Kiss** -L. Jelinek: Non Porous Silica Based Reversed Phase HPLC Packings. A Universal, Easy to Use Alternative to Porous Adsorbents? Balaton Symposium '97: on High Performance Separation Techniques Sept. 3 - 5, 1997. Siófok, Hungary

**Kiss I.** -Ohmacht R.: Peptidek folyadékkromatográfiás elválasztása nemporózus állófázison. XX. Kémiai Előadói Napok Szeged, 1997. október 13-15

**Kiss I.** - Ohmacht R.: Nemporózus állófázis alkalmazása polipeptidek folyadékkromatográfiájában. Dél - Dunántúli Analitikai Nap Kaposvár, 1998. június 19

Ohmacht R., Boros B., **Kiss I.**, Jelinek L.: Non Porous Silica Based Reversed Phase Packings. XI. Roman National Congress of Pharmacy Iasi, 1998. október 08 - 10.

**I. Kiss** - R. Ohmacht: Quick Peptide Mapping by HPLC on Non Porous Stationary Phase. 4th Symposium on Instrumental Analysis. May 20 - 23, 1997. Graz, Austria

Ohmacht R. - **Kiss I.**: Fast Peptide Separation on Non Porous *Kovasil-H* Column. Balaton Symposium '97: on High Performance Separation Techniques. Sept. 3 - 5, 1997. Siófok, Hungary

R. Ohmacht - B. Boros - **I. Kiss** -L. Jelinek: Non Porous Silica Based Reversed Phase HPLC Packings. A Universal, Easy to Use Alternative to Porous Adsorbents? The Fourth Pharm Analysis Europe Conference. October 27 - 28, 1997. London, GB

**I. Kiss**, R. Ohmacht, M. Fodor, A. Barna: Separation of Water- and Fat-soluble Vitamins in Tomato. 12<sup>th</sup> International Conference of Chemistry. October 3-8, 2006. Miercurea Ciuc, Romania

**I. Kiss**, I. Bacskay, A. Felinger: Comparison of the Mass Transfer Kinetics in Totally Porous, Superficially Porous and Nonporous Reversed Phase in Liquid Chromatography. 9<sup>th</sup> Symposium on Instrumental Analysis. June 29-July 2, 2008, Pécs, Hungary. P31

I. Bacskay, **I. Kiss**, A. Felinger: Macroscopic and Microscopic Analysis of Mass Transfer Kinetics in Totally Porous and Superficially Porous Reversed Phase in Liquid Chromatography. 14<sup>th</sup> Symposium on Separation Science; New Achievements in Chromatography. 30 September – 3 October 2008, Primosten, Croatia. P77

**Kiss I.**, Bacskay I., Felinger A.: Az anyagátadási együtthatók vizsgálata különböző geometriájú állófázisok esetében. Elválasztástudományi vándorgyűlés. Sárvár, 2008. november 5-7, P24

**I. Kiss**, I Bacskay, F. Kilár, A. Felinger: The Examination of the Mass Transfer Coefficients on Different Geometry Stationary Phases in Reversed Phase Liquid Chromatography. 8<sup>th</sup> Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods. 15<sup>th</sup> International Symposium on Separation Science. September 2-4, 2009, Siófok, Hungary. P10

**I. Kiss**, I. Bacskay, F. Kilár, A. Felinger: Mass Transfer on Superficially Porous and Totally Porous Reversed Phases in HPLC. CECE 2009. 6<sup>th</sup> International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis. November 5 -8, 2009, Pécs, Hungary. P20

### **Egyéb tudományos közlemények**

F. Gaizer - **I.I. Kiss**: A PC Program for Calculation of the Stability Constants of Complexes  $M_qL_pH_r$  from pH-metric Measurements. Talanta 41 (1994) 419. IF 1,167

I. Bacskay, R. Góra, Z. Szabó, **I. Kiss**, V. Kasicka, G. Peltre, F. Kilár: Seasonal variation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Air Particulate Extracts. Chromatographia 68 (2008) 113. IF 1,145

### **Egyéb posztetek**

E. Korom, **I. Kiss**, M. Biesaga, M Trojanowicz, L. Gy. Szabó, Á. Farkas, F. Kilár. Determination of Flavonoids, Chlorogenic Acid and Caffeic Acid in Apple and Pear Samples Using HPLC. 5<sup>th</sup> International Symposium and Course Teaching and Learning "Analytical and Bioanalytical Monitoring Methods". May 31-June 07, 2004. Sofia, Bulgaria

I. Bacskay, **I. Kiss**, R. Góra, Z. Szabó, F. Kilár: Determination of polynuclear Aromatic hydrocarbons from Air Contamination by HPLC. 5<sup>th</sup> Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods. September 7-9, 2005, Siófok, Hungary. P71

I. Bacskay, **I. Kiss**, R. Góra, Z. Szabó, F. Kilár: Monitoring of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons from air. 8<sup>th</sup> Symposium on Instrumental Analysis. September 25-28, 2005, Graz, Austria. P46

Bacskay I., **Kiss I.**, Góra R., Szabó Z., Kilár F.: Szálló porhoz kötött policiklikus szénhidrogének meghatározása, a PAH profil változása. II. Kárpát-medencei Környezettudományi Konferencia. Pécs, Magyarország, 2006. június 1-2.

**UNIVERSITY OF PÉCS**

Doctoral School for Chemistry

**Separation of Biopolymers on Stationary Phases of  
Different Geometry in Reversed Phase Liquid  
Chromatography**

**PhD Thesis**

**Ibolya Kiss**

Supervisors

**Dr. Attila Felinger**  
professor

**Dr. Róbert Ohmacht**  
professor



**PÉCS, 2010**



# 1. INTRODUCTION

The separation techniques have undergone considerable developments in the second half of the last century.

Nowadays, HPLC has found broad acceptance as the analytical technique of choice in many scientific and application oriented areas, like life science, food chemistry, and environmental chemistry. Developing liquid-phase separations is a complex task because several factors must be considered, such as the mobile phase, the stationary phase, the chemical structure and physical-chemical properties of samples, and parameters of detection.

There are different theories to envision the retention mechanism in reversed-phase chromatography (RP-HPLC). The most important ones are the well known hydrophobic interaction theory, the theory of partition and the adsorption theory. The RP-HPLC retention mechanism is still an important research area. Today, researchers seek to a better understanding of processes of retention and selectivity. The interpretation of these processes at the molecular level, as well as their connection with the physical-chemical properties of the stationary phases is particularly important.

The development of the chromatographic instrumentation was necessary in parallel with the development of stationary phases (of special packing materials) and columns. The developments and the availability of high-performance instrumentation and high-quality stationary phases have substantially supported the growth of HPLC researches and applications. In addition, new and also special instrumentation and columns for RPLC are continuously developed and marketed today. The stationary phases are the 'heart' of the chromatographic separations.

Probably, today's separations are mostly performed by HPLC. The reason for its popularity is the easy solubility and widespread applicability for the separation of small molecules and for biopolymers, as well. Selection of the chromatographic column for the separation of bioactive compounds requires special attention. Today, particles of less than 3  $\mu\text{m}$  diameter are being increasingly applied in RP separations.

## 2. RESEARCH AIMS

In our work we aim to test and compare the different types (porous, superficially porous and non-porous) of reversed phase packing materials; taking into account both, the bioactive low molecular weight compounds and high-speed HPLC separations, and the determination of mass-transfer coefficients.

In our measurements we selected compounds, which are important in the field of life sciences.

Research goals are summarized as follows:

- In this study I aimed to investigate the chemical stability of Kovalsil packing, by using strong acidic and basic pH of eluents.
- The aim of the measurements was to separate biopolymers within short time on non-porous reversed-phase packing. The HPLC separation of biopolymers (protein and peptide mixtures) is often a very important analytical task. These separations on porous packing require long analysis time.
- We ought to certify that the non-porous reversed-phase packing is excellent to use in the separation of biopolymers and in addition of low molecular weight ( $M_w = 100-500$  Da) bioactive compounds (e.g. water- and fat-soluble vitamins).
- We also wanted to determine and compare the mass transfer coefficients by using different types of packing materials. In our measurements we used the porous Sun Fire  $C_{18}$  and the superficially porous Halo  $C_{18}$  stationary phase. For further calculations, we determined the porosity factors of these phases by applying inverse size exclusion chromatography.

We used the following methods to define the mass transfer coefficients:

- the general rate model;
- the van Deemter equation;
- the moment analysis;
- and the stochastic model of chromatography.

### 3. MATERIALS AND METHODS

Among the different available HPLC separation methods, definitely reversed-phase liquid chromatography (RPLC) has taken and still takes a dominant position; presently about 80% of HPLC separations are performed using RPLC. The silica-based stationary phases (bonded alkyl groups) are the most widespread (~75%) among the reversed phase liquid chromatography packing materials.

#### **Fast separation of bioactive molecules**

A short, few-minute analysis of bioactive molecules was achieved by multistep gradient elution. The separations were carried out on Kovalsil-MS-H and Kovalsil-C<sub>14</sub> columns (Chemie AG, Swiss Uetikon). The stationary phases are based on a high purity non-porous, monodisperse silica bed ( $d_p = 1.5 \mu\text{m}$ ) chemically bound with C<sub>6</sub> and C<sub>14</sub> chain, respectively.

HPLC separations were performed with ternary gradient pump, Rheodyne injector (Cotati CA, USA), 170S diode array detector with a Chromeleon Chromatographic Data System (GynkoteK, Germering, Germany). The columns were heated using a W6 Grant (Grant Instruments, Cambridge, England) circulating water bath.

#### **Determination of the mass transfer coefficients**

Two columns were used: Halo column (Advanced Materials Technology, Wilmington, DE) packed with shell particles ( $d_p = 2.7 \mu\text{m}$  and a shell thickness of  $0.5 \mu\text{m}$ ), and SunFire column (Waters Co., Milford, MA) with a fully porous silica particles ( $d_p = 3.5 \mu\text{m}$ ). Both materials have an average mesopore size of 9 nm, prior to the bonding of the C<sub>18</sub> alkyl chains.

The mobile phase flow rate was changed over the range 0.02–1.4 mL/min ( $p \sim 5\text{--}325$  bar) at 20°C. Each measurement was executed with eluent containing 21 percent acetonitrile and 79 percent water (v/v), with 0.1 percent TFA. 1 mL sample containing 1 mg/mL bovine insulin (Mw = 5.5 kDa) was injected. The insulin was detected at 205 nm.

An Agilent 1100 HPLC instrument (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), equipped with a diode array detector, high-pressure multisolvent delivery system, column thermostat compartment, and a computer data station with Chemstation software was used in all measurements.

## 4. RESULTS

In my dissertation, I studied the applicability of non-porous hydrophobic silica-based stationary phases in high performance liquid chromatography for the fast separation of low molecular weight bioactive compounds ( $M_w = 100\text{-}500$  Da) and biopolymers

In the selection of samples, the preferred groups of compounds were those, which are important in life science, medical and biological research (e.g. peptides, proteins, water- and fat-soluble vitamins). The selected compounds were diverse from the point of view of chromatographic separations, since among them there were highly polar, weakly polar, acidic and basic compounds. I verified the comprehensive applicability of non-porous, monodisperse packing by the separation of these different compounds.

1. The behavior of Kovalsil packings by using highly acidic and alkaline pH of eluent were characterized by the chemical stability. In the stability test, eluents at pH 1.9 and pH 8.5 were pumped through the column at 80°C. The retention of the test compounds proved to be stable during the nearly 400 hours of continuous usage. The chemical stability of the packing was excellent, ensuring the reproducibility of results over a long period of time.

I developed a new super-fast separation procedure for the analysis of low molecular weight (water and fat soluble vitamins) and high molecular weight (peptides, polypeptides) of bioactive compounds using a short, non-porous column (33 mm × 4.6 mm), routine liquid chromatography equipment and gradient elution technique.

2. The separation of six water soluble vitamins (acidic and basic components) required 1.1 minutes at room temperature, using gradient elution with quick ion-pair separation, the solvent strength and the pH of the eluent were changed, too.
3. I studied eight fat soluble vitamins. The analysis time of the vitamins was 2.5 minutes. In most cases the detection limit of the separated compounds was low, typically  $10^{-12}$  mole.
4. I developed the method for separation of enzymatic digest of proteins and peptides using high-temperature (70°C), high flow speed and multi-step gradient. The digestion of high molecular weight bovine serum albumin ( $M_w = 68,000$  Da) with trypsin resulting in an average number of 7-12 of fairly short fragments gives rise to a complex mixture of 79 fragments. Although Cytochrome c is a relatively small molecular weight protein ( $M_w = 13\ 000$ ) for



the separation of the 13 peptide fragments, good resolution and reproducibility was necessary. The analysis time is less than 3 minutes, which is one tenth (or even less) of that measured on porous stationary phases.

5. The efficiency, the short analysis times, and sensitivities were demonstrated by the separation of different proteins, where the recovery was almost complete. (This could explain the long lifetime of the non-porous columns in protein separation – no protein precipitation occurs on the surface of the particles.)
6. I presented the separation of  $\beta$ -lactoglobulin B and  $\beta$ -lactoglobulin A. The analysis was carried out at high temperature (95°C), thus due to a reduction in the viscosity of the eluent, the flow rate (3.6 mL/min) could be increased, consequently a very fast (0.2 min) separation could be carried out. The separation efficiency is improved at higher temperatures because the viscosity of the system decreases due to decrease in the mass transfer resistance.

I applied macroscopic and microscopic methods to evaluate the experiments. I determined the mass transfer coefficients of insulin on totally porous (Sun Fire) and superficially porous (Halo) stationary phases.

7. In case of insulin and other large molecules I found that the flow rate and the pressure strongly influence the retention. I determined the axial dispersion ( $D_L$ ), the external mass transfer coefficient ( $k_{ext}$ ) and the internal diffusion coefficient ( $D_p$ ) using the general rate model.
8. With the stochastic analysis, I defined the molecular retention characteristics of insulin such as the number of the adsorption-desorption steps ( $n$ ), the average stationary phase sojourn time ( $\tau_s$ ) and the average mobile phase sojourn time ( $\tau_m$ ). At high flow rates, the average stationary phase residence times are found at 150 ms for the superficially porous stationary phase, whereas they are above 100 ms for the totally porous stationary phase. The retention factor of insulin is two times higher for the superficially porous stationary phase than for the totally porous one. The stationary phase sojourn time is directly proportional to the retention factor, since  $k' = \tau_s / \tau_m$ . If the mobile phase composition were changed so that the retention factors are equal on the two columns, the average residence time in the shell particle would be three quarters of that in the totally porous one.

## **5. RESULTS OF THE POSSIBILITIES OF EXPLOITATION**

In our work we studied and presented the properties of the stationary phases, and we supported the results by our measurements. The conclusions are useful for the users and manufacturers, and help them better understand the separation processes, as well as help to solve difficult separations, as well as to plan separation methods.

## 7. PUBLICATIONS, PRESENTATIONS

### Publications related to this thesis

R. Ohmacht - **I. Kiss**: Application of a New Non-porous Stationary Phase (Kovasil-H) for Fast Separation of Peptides by HPLC. *Chromatographia*, 42 (1996) 595. IF 1,869

Ohmacht R. - **Kiss I.**: Peptidek gyors HPLC elválasztása nemporózus állófázison. *Magyar Kémiai Folyóirat*, 103 (1997) 506. IF 0,215

R. Ohmacht - B. Boros - **I. Kiss** – L. Jelinek: Quick and Sensitive HPLC Separations on Non-porous Reversed-Phase Packings. *Chromatographia*, 50 (1999) 75. IF 1.741

Ohmacht R. - Boros B. - Kovács K. - **Kiss I.**: Bioaktív vegyületek gyors és nagyérzékenységű folyadékkromatográfiás elválasztása nemporózus állófázison. *Magyar Kémiai Folyóirat*, 105 (1999) 465. IF 0,130

**I. Kiss** - I. Bacskay - F. Kilar - A. Felinger: Comparison of the Mass Transfer in Totally Porous and Superficially Porous Stationary Phases in Liquid Chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397 (2010) 1307. IF 3,328

### Lectures and posters related to this thesis

R. Ohmacht - **I. Kiss** - M. Kele: Application of a New Non-porous Stationary Phase for Peptide Mapping. Balaton Conference on High Performance Separation Techniques. Sept. 6 - 8, 1995. Siófok, Hungary

R. Ohmacht - B. Boros - **I. Kiss** - L. Jelinek: Non-Porous Silica Based Reversed Phase HPLC Packings. A Universal, Easy to Use Alternative to Porous Adsorbents? Balaton Symposium '97: on High Performance Separation Techniques Sept. 3 - 5, 1997. Siófok, Hungary

**Kiss I.** - Ohmacht R.: Peptidek folyadékkromatográfiás elválasztása nem porózus állófázison. XX. Kémiai Előadói Napok Szeged, 1997. október 13-15

**Kiss I.** - Ohmacht R.: Nemporózus állófázis alkalmazása polipeptidek folyadékkromatográfiájában. Dél - Dunántúli Analitikai Nap Kaposvár, 1998. június 19

Ohmacht R., Boros B., **Kiss I.**, Jelinek L.: Non-Porous Silica Based Reversed Phase Packings. XI. Roman National Congress of Pharmacy Iasi, 1998. október 08 - 10.

**I. Kiss** - R. Ohmacht: Quick Peptide Mapping by HPLC on Non-Porous Stationary Phase. 4th Symposium on Instrumental Analysis. May 20 - 23, 1997. Graz, Austria

Ohmacht R. - **Kiss I.**: Fast Peptide Separation on Non-Porous *Kovasil-H* Column. Balaton Symposium '97: on High Performance Separation Techniques. Sept. 3 - 5, 1997. Siófok, Hungary

R. Ohmacht - B. Boros - **I. Kiss** -L. Jelinek: Non-Porous Silica Based Reversed Phase HPLC Packings. A Universal, Easy to Use Alternative to Porous Adsorbents? The Fourth Pharm Analysis Europe Conference. October 27 - 28, 1997. London, GB

**I. Kiss**, R. Ohmacht, M. Fodor, A. Barna: Separation of Water- and Fat-soluble Vitamins in Tomato. 12<sup>th</sup> International Conference of Chemistry. October 3-8, 2006. Miercurea Ciuc, Romania

**I. Kiss**, I. Bacskay, A. Felinger: Comparison of the Mass Transfer Kinetics in Totally Porous, Superficially Porous and Non-porous Reversed Phase in Liquid Chromatography. 9<sup>th</sup> Symposium on Instrumental Analysis. June 29-July 2. 2008. Pécs, Hungary. P31

I. Bacskay, **I. Kiss**, A. Felinger: Macroscopic and Microscopic Analysis of Mass Transfer Kinetics in Totally Porous and Superficially Porous Reversed Phase in Liquid Chromatography. 14<sup>th</sup> Symposium on Separation Science; New Achievements in Chromatography. 30 September – 3 October 2008, Primosten, Croatia. P77

**Kiss I.**, Bacskay I., Felinger A.: Az anyagátadási együtthatók vizsgálata különböző geometriájú állófázisok esetében. Elvásztástudományi vándorgyűlés. Sárvár, 2008. november 5-7, P24

**I. Kiss**, I Bacskay, F. Kilár, A. Felinger: The Examination of the Mass Transfer Coefficients on Different Geometry Stationary Phases in Reversed Phase Liquid Chromatography. 8<sup>th</sup> Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods. 15<sup>th</sup> International Symposium on Separation Science. September 2-4, 2009, Siófok, Hungary. P10

**I. Kiss**, I. Bacskay, F. Kilár, A. Felinger: Mass Transfer on Superficially Porous and Totally Porous Reversed Phases in HPLC. CECE 2009. 6<sup>th</sup> International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis. November 5 -8, 2009, Pécs, Hungary. P20

### Other publications

F. Gaizer - **I.I. Kiss**: A PC Program for Calculation of the Stability Constants of Complexes  $M_qL_pH_r$  from pH-metric Measurements. Talanta 41 (1994) 419. IF 1,167

I. Bacskay, R. Góra, Z. Szabó, **I. Kiss**, V. Kasicka, G. Peltre, F. Kilár: Seasonal variation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Air Particulate Extracts. Chromatographia 68 (2008) 113. IF 1,145

### Other posters

E. Korom, **I. Kiss**, M. Biesaga, M Trojanowicz, L. Gy. Szabó, Á. Farkas, F. Kilár. Determination of Flavonoids, Chlorogenic Acid and Caffeic Acid in Apple and Pear Samples Using HPLC. 5<sup>th</sup> International Symposium and Course Teaching and Learning "Analytical and Bioanalytical Monitoring Methods". May 31-June 07, 2004. Sofia, Bulgaria

I. Bacskay, **I. Kiss**, R. Góra, Z. Szabó, F. Kilár: Determination of polynuclear Aromatic hydrocarbons from Air Contamination by HPLC. 5<sup>th</sup> Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods. September 7-9, 2005, Siófok, Hungary. P71

I. Bacskay, **I. Kiss**, R. Góra, Z. Szabó, F. Kilár: Monitoring of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons from air. 8<sup>th</sup> Symposium on Instrumental Analysis. September 25-28, 2005, Graz, Austria. P46

Bacskay I., **Kiss I.**, Góra R., Szabó Z., Kilár F.: Szálló porhoz kötött policiklikus szénhidrogének meghatározása, a PAH profil változása. II. Kárpát-medencei Környezettudományi Konferencia. Pécs, Magyarország. 2006. június 1-2.