

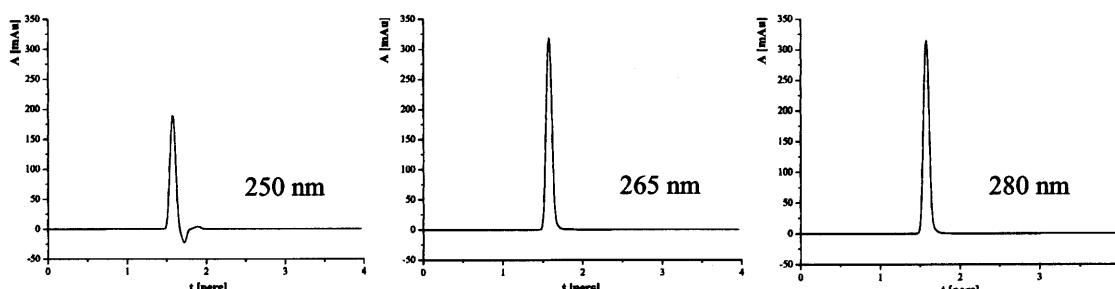
## Válasz Dr. Gáspár Attila egyetemi tanár opponensi véleményére

Őszintén köszönöm Dr. Gáspár Attila tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy bírálatát elkészítette és értekezésemmel kapcsolatban pozitív véleményt fogalmazott meg. Megjegyzéseire, kérdéseire az alábbi válaszokat adom.

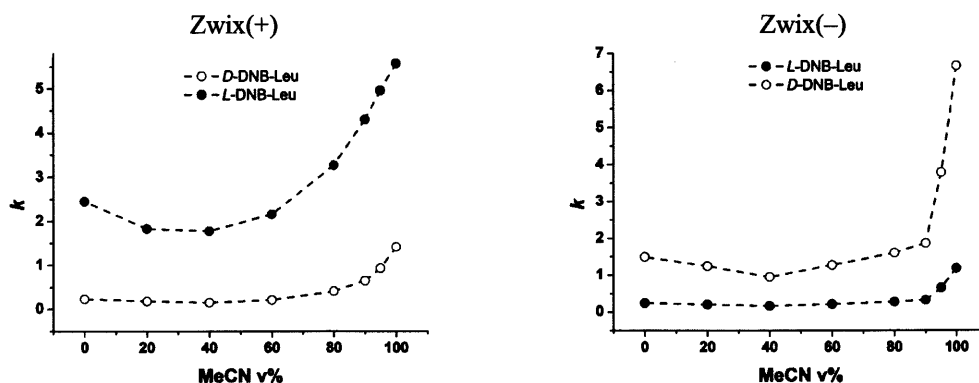
### A bírálói megjegyzésekre adott válaszok:

1. (8. o.) Egyetértek a bírálói megjegyzéssel, miniatürizált rendszerekben, mint pl. egy LC chip a mozgófázisban oldott szelektorok alkalmazásának komolyabb jelentősége van. Azt gondolom, hogy UHPLC rendszereknél –a HPLC-hez hasonlóan– a szilárd hordozón rögzített szelektoroké a jövő.
2. (19. o.) A királis állófázisok fejlesztése túlnyomórészt a természetben fellelhető királis vegyületek alkalmazására épült és épül napjainkban is. Ezek az „alapanyagok” elegendően nagy mennyiségben és jellemzően megfelelő tisztaságban állnak rendelkezésre. Ezen királis szelektorok kémiai módosításával (a királis tisztaság megőrzése mellett) a jelenlegi gyakorlati problémák jelentős része megoldható. A szintetikus polimerek jellemzően nem rendelkeznek megfelelően széles és elegendően nagy enantioszelektivitással, így az állófázisok fejlesztésében nem játszanak meghatározó szerepet.
3. (23. o.) Egyetértek a bírálóval, a kérdéses állítás valóban elnagyolt, kapilláris elektroforézisnél mind a közvetlen, mind a közvetett detektálásra lehet irodalmi példákat találni az antibiotikum alapú szelektorok esetén. Köszönöm a pontosítást.
4. (25. o.) A kifogásolt állítás alapját az képezi, hogy a kereskedelmi forgalomban megvásárolható antibiotikum alapú állófázisok –fontos szerkezeti eltérések mellett– többféle szerkezeti jellemzőjükben is megegyeznek. Így egy adott vegyület esetén egy adott antibiotikum alapú oszlopon tapasztalt részleges elválasztás saját és irodalmi tapasztalatok szerint is sok esetben növelhető másik antibiotikum alapú oszlop alkalmazásával. Természetesen ez nem minden esetben igaz, így az állítás valóban túlzottan egyszerűsítő. Köszönöm az észrevételt.
5. (31. o.) A 31. oldalon megfogalmazott állításom (hasonlóan a bíráló által kifogásolt 8. oldalon szereplő állítással) HPLC alkalmazásokra vonatkozik, azt gondolom, hogy a mikrofluidikai eszközöknél említett ellentétes tendencia pozitívan hathat az LC állófázisok fejlesztésére.
6. (38. o.) Szekunder  $\alpha$ -aminosavak biológiai jelentőségénél kétségtelenül jobban kellett volna hangsúlyoznom, hogy ezen vegyületek peptidekbe történő beépítése –a disszertációban későbbiekben tárgyalt nem fehérjealkotó aminosavakhoz hasonlóan– az eredeti peptid tulajdonságainak célzott változtatását szolgálja. A konkrét biológiai hatás természetesen vegyületfüggő.
7. (45. o.) Az alábbi ábrákon különböző hullámhosszúságokon (250 nm – 280 nm) kiértékelve mutatom be a holtidő meghatározására alkalmazott metanolban oldott acetone kromatogramjait. Az oldószerfront ilyen körülmények között ioncserélő tulajdonságú oszlopokon 260 nm – 280 nm között jól kiértékelhető, így a holtidő meghatározható metanolban oldott acetone adagolásával. (A bemutatott kromatogramok esetén az alkalmazott körülmények: kolonna: ZWIX(–) (150 x 3 mm), eluens: MeOH/MeCN =

85/15 és 25 mM DEA és 50 mM FA, áramlási sebesség: 0,6 mL/perc,  $t=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t_0=1,57$  perc).



8. (49. o.) Egyetértek a bírálói megjegyzéssel, a kifogásolt mondat értelmét jobban visszaadja a szavak javasolt sorrendben történő alkalmazása. Köszönöm szépen az észrevételt.
9. (50. o.) A metanol/acetonitril arány változtatásának hatását bemutató 11. ábrán nem adtam meg 0 és 100% metanol tartalomnál a kromatográfiás paramétereket, se az említett rendszernél, se más, a dolgozatban bemutatott rendszereknél ezeket nem határoztuk meg, mivel tapasztalataink szerint a két oldószer együttes jelenléte szükséges a megfelelő retenció és enantioszelektivitás biztosításához. (Tapasztalataink szerint 90 v% feletti metanol tartalomnál jellemzően kicsi visszatartással eluálódnak az elválasztandó komponensek, míg 90 v% feletti acetonitril tartalom a csúcsok hátsó megnyúlását („tailing”) eredményezi.) A bírálói megjegyzés jogosságát kiválóan alátámasztja az a tény, hogy a dolgozat megírását követően ilyen méréseket is végeztünk. Mivel ezeket még nem publikáltuk, így itt csak egy-egy példát mutatok be. Az alábbi két ábra a 3,5-dinitrobenzoil-leucin két enantiomerének retenciós viselkedését mutatja 0/100 és 100/0 között változó MeOH/MeCN arányú mozgófázisoknál hangyasavat (50 mM) és trietil-amint (25 mM) alkalmazva sav, ill. bázis adalékként ZWIX(+) és ZWIX(−) ikerionos kolonnák esetén. Amint az ábrákból kitűnik, mindkét ikerionos kolonnán azt tapasztaltuk, hogy 60 v% MeOH-tartalom felett az addigi csökkenést követően –különösen a később eluálódó enantiomer esetén– növekedett a retenció a csökkenő MeCN-tartalom ellenére. Azt gondolom, hogy a későbbiekben ezen vizsgálataink kibővítésével további értékes következtetéseket vonhatunk le a retenciós mechanizmusról.



10. A 4.4. fejezetben szerepeltettem, hogy mindkét Waters HPLC rendszer (I és II) 20  $\mu$ L-es mintaadagolóval volt ellátva, a harmadik alkalmazott rendszernél (Agilent 1100) sajnos figyelmetlenül elfelejtettem megadni, hogy a másik két rendszerrel megegyezően szintén 20  $\mu$ L-es térfogatokat adagoltunk, annak érdekében, hogy az egyes rendszereken az adagolási térfogatok megegyezzenek. Az egyes kísérleti eredmények tárgyalásánál valóban nem szerepeltettem, hogy éppen melyik HPLC rendszerrel határoztuk meg a kromatográfiás jellemzőket, ennek a kísérleti eredmények értelmezésére véleményem szerint nincsen hatása. Egyetérttek a bírálóval, kapilláris elektroforézisnél informatívabb lehet a kimutatási, ill. meghatározási határ koncentrációban történő megadása, de LC-nél megvan az a veszélye, hogy nagy térfogatú adagolással, az elválasztás rovására érnek el alacsonyabb LOD, LOQ értékeket. Véleményem szerint mindkét adat megadása szükséges annak érdekében, hogy egy adott módszer analitikai teljesítőképességét megítélhessük.
11. Az 1901-ben publikált két közleményt sajnos nem tudtam beszerezni, sőt olyan hivatkozást sem találtam, ahol megemlítenék volna az eredeti közlemények címeit. Mivel az eredeti hivatkozásokat fontosnak tartottam, így „slendrián módon” cím nélkül szerepeltettem őket.
12. A függelékben bemutatott (F2-F7) kromatogramok Y tengelye az adott mérés során alkalmazott detektor jele. A szemléltetést szolgáló kromatogramok esetén nem tartottam fontosnak megadni az adott mérésre vonatkozó jelet, ezért nem skáláztam az Y tengelyt. Kétségtelenül ezekben az esetekben is szerencsésebb lett volna szerepeltetni az Y tengelyen a mért értékeket. Hadd említsem meg, hogy abban az esetben, amikor mennyiségi következtetést vontam le (pl. F1. ábra) megadtam a mért mennyiségeket.

A bírálói kérdésekre adott válaszok:

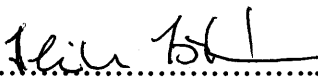
1. A dolgozatban említtem, hogy a bázis anyagi minősége általában nem befolyásolta számottevően a szelektivitást, de amint a bíráló is megállapította a felbontásban komolyabb különbségek észlelhetők. A fenilcsoportot tartalmazó **70** vegyület esetén az aromás gyűrű jelenléte miatt kialakuló  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatások nagyobb retenciót és szelektívebb felismerést biztosítottak az alifás **62** vegyülethez képest. Erre vezethető vissza a **70** vegyületnél tapasztalt nagyobb felbontás is. A kromatogramok alapján meghatározott elméleti tányérszámok értékei a **62** vegyület később eluálódó enantiomere esetén 2000 és 3500  $m^{-1}$  között változtak, míg a **70** vegyület később eluálódó enantiomere esetén lényegesen szélesebb tartományban, 5300 és 16000  $m^{-1}$  között. A felbontás bázikus módosítók anyagi minőségétől való függését más vegyületcsaládoknál is tapasztaltuk. Hasonlóan ehhez a példához, számos más esetben is a később eluálódó enantiomer csúcsának jelentősebb kiszélesedése eredményezte a felbontás változását.
2. Valamennyi a dolgozatban bemutatott eredmény 20  $\mu$ L-es mintadagolásokhoz tartozik, míg a mintaoldatok koncentrációja többségében 0,1–1 mg/mL (megközelítőleg 0,1–10 mM) koncentráció tartományban változott. Mindhárom oszlopcsalád esetén biztosnak vehető, hogy ekkora mintatérfogatokkal dolgozva nem terheljük túl a kolonnát. Azt gondolom, hogy az 5  $\mu$ m átmérőjű szemcsékkel töltött 4,6 mm átmérőjű oszlopok esetében az optimális térfogat 10 és 30  $\mu$ L, míg a 3  $\mu$ m átmérőjű szemcsékkel töltött 3 mm átmérőjű kolonnák esetén 5 és 15  $\mu$ L közé esik. Véleményem szerint a minta

oldószerének jelentősebb hatása van a kromatogramra. Számos esetben tapasztaltuk, hogy az alkalmazott eluensből jelentősen különböző mintaoldat (pl. kizárólag az egyik eluensalkotóban oldott minta) torzult jelalakot, nehezen (vagy egyáltalán nem) kiértékelhető kromatogramot eredményezett. A minta térfogatának változása okozhat kisebb eltéréseket a kromatográfiás jellemzőkben, de erre vonatkozó kísérleti eredményeink nincsenek. Az alábbiakban megadok néhány irodalmi hivatkozást, melyben vizsgálták a minta térfogatának hatását enantiomerek HPLC elválasztása esetén és a fentiekkel megegyező következtetésre jutottak. Campanero és munkatársai (Chromatographia, 1998, 48, 203) ketorolac enantiomereinek elválasztását vizsgálták Chiral AGP kolonnán (100 x 4 mm). Az adagolt térfogatot 25  $\mu$ L-ről 100  $\mu$ L-re növelve nem tapasztaltak számottevő csökkenést a párhuzamos adagolások precizitásában. (Az alkalmazott koncentrációtartomány 20-20000 ng/mL volt.) Grimm és munkatársai (Chirality, 2013, 25, 923) indatraline enantiomereit választották el Cyclobond I 2000 DM kolonnán (250 x 4,6 mm). Az 1 mM koncentrációjú mintaoldatból adagolt térfogatot 10  $\mu$ L-ről 50  $\mu$ L-re növelve mindössze 10 %-kal csökkent a felbontás. Azt gondolom, hogy az említett oszlop dimenzióktól számottevően eltérő esetekben (preparatív kromatográfia, illetve UHPLC) már lényegesen jelentősebb hatásokkal lehet számolni, sajnos ezeken a területeken saját tapasztalatokkal nem rendelkezem, így konkrét eredményeket válaszomban nem tudok bemutatni.

3. A 30. ábra a **97** vegyület négy sztereoizomerének retenciós viselkedését mutatja. Három sztereoizomer esetén a *lgk* – *lgc* függvényre illesztett egyenesek meredekségének egyezősége azt jelzi, hogy a *d*, *e* és *g* izomerek gyakorlatilag ugyanúgy reagálnak az ellenionok koncentrációjának változására, ami a fennálló szerkezeti egyezőséggel értelmezhető. Érdekes módon az *a* izomer retenciója lényegesen kisebb mértékben függött az ellenionok koncentrációjától, ami arra utal, hogy a disszertációban tárgyalt helyettesítési modell érvényessége mellett az egyes izomerek konkrét térszerkezete jelentős hatással van a visszatartásért felelős kölcsönhatások kialakulására. Feltételezésem szerint ebben a speciális esetben az elúcióhoz szükséges ellenionok a szelektor-szelektand komplex adott körülmények között kialakult térszerkezete miatt kevésbé férnek hozzá az ionos funkciók csoportokhoz, így az ellenionokat nagyobb koncentrációban kell alkalmazni ugyanolyan mértékű hatás eléréséhez. Sajnos ezen feltételezést kísérleti adatokkal nem tudom alátámasztani.
4. Azt gondolom, hogy a bíráló által említett protokollok kidolgozása (amint azt Dr. Kilár Ferenc bírálataiban is felveti) nagyon kíváncsú lenne, de azt kell mondjam, hogy a gyakorló kromatográfus számára használható eljárások részletes kidolgozása még várat magára. (Természetesen a gyártók honlapjukon megadnak a saját állófázisaikra vonatkozó segédleteket, de ezek alkalmazhatósága még meglehetősen korlátozott.) Amint arra kutatócsoportunk is mutatott be példát (Journal of Chromatography A 2018, 1535, 72) kicsiny szerkezeti változás a vizsgált modellvegyületnél (pl. egy hidrogénatom metilcsoportra történő cseréje) akár az elúciós sorrend megváltozását is eredményezheti, jelezve, hogy a királis felismerés jelenlegi ismereteinkre alapozva meglehetősen nehezen jósolható.

Végezetül újra megköszönöm Dr. Gáspár Attilának disszertációm bírálatának elkészítését, munkám eredményeinek elismerését, az építő jellegű kritikai észrevételeket, valamint a nyilvános vita kitűzésének támogatását.

Szeged, 2018. november 30.

.....

Ilisz István

egyetemi docens

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszeranalitikai Intézet