

Válasz Dr. Kilár Ferenc egyetemi tanár opponensi véleményére

Öszintén köszönöm Dr. Kilár Ferenc egyetemi tanárnak, hogy opponensi véleményében feltárta dolgozatom hiányosságait, elismerte eredményeim, összességében értekezésemről pozitív véleményt fogalmazott meg. Megjegyzéseire, kérdéseire az alábbi válaszokat adom.

A bírálói vélemény bevezetőjében megfogalmazott általános kritikai észrevételeket elfogadom. Jómagam bármilyen terjedelmű tudományos műnél jobban kedvelem, ha az eredmények bemutatását rögtön követi azoknak az értelmezése, de elismerem a másik, bíráló által preferált megoldás előnyeit is. Az írást megelőzően sokat gondolkoztam a nagyszámú kísérleti adat összerendezése kapcsán a bíráló által is említett erősen szerteágazó kísérleti körülmények egységes kezelésének megoldásáról. Vezérfonálnak az értekezés egységes szerkezeti elrendezését szántam, amelytől a bemutatott kísérleti adatok értelmezésének megkönnyítését és a könnyebb összevethetőséget, átfogóbb tendenciák és összefüggések feltárásának lehetőségét reméltem. Egyetértek a bíráló felvetésével, hasznos lett volna, ha az állófázisok alkalmazásának részletes indoklása mellett, további, az egyes állófázisok kiválasztását segítő tárgyalás is bekerült volna a dolgozatba.

A formai, tartalmi megjegyzésekre adott válaszok:

1. Tökéletesen igazat adok a bírálónak, a „hidrofóbbabb karakter” valóban nem igazán szerencsés kifejezés.
2. Az eredményeket taglaló szövegrészben azt gondolom minden esetben megadtam azokat a hivatkozásokat, melyekből kísérleti adatokat mutattam be, de elfogadom a kritikai észrevételt, mely szerint az ábráknál hasznos lett volna a konkrét hivatkozást megadni, én is úgy gondolom, hogy ezzel könnyebben követhetővé vált volna az eredmények értelmezése. Köszönöm az észrevételt.
3. A dolgozatban tárgyalt mintegy 220 vegyület többsége enantiomerpárokat takar, de amint azt a bírálói is említi, több esetben diasztereomerekre vonatkozó adatokat is szerepeltettem a dolgozatban. Kétségtelenül könnyebben követhető lett volna a gondolatmenetem, ha minden esetben megadom, hogy az adott vegyületek konkrétan milyen viszonyban állnak egymással, ehelyett azt a megoldást választottam, hogy a függelékben adtam meg a pontos konfigurációt. Ez sajnos azzal a következménnyel jár, hogy a sztereokémiai viszony megismeréséhez fel kell lapozni a függelék, ez kétségtelenül megtörheti az olvasó figyelmét.
4. Tökéletesen egyetértek a bírálói észrevétellel, bármilyen kísérleti adat csak akkor értékelhető, ha tisztában vagyunk a szórás nagyságával. A dolgozatban bemutatott adatsorok többnyire valamilyen tendenciát, vagy éppen annak a hiányát mutatják be. Ennek kapcsán fogalmaztam értekezésemben úgy, hogy ilyen esetben normális hibaeloszlást feltételezve az egyes adatpontok szórása „kevésbé releváns”. Mindemellett igazat adok a bírálói felvetésnek, lokális minimum vagy maximum értékek értelmezése megkívánta volna a szórás adatok megadását. Mentségemre az szolgálhat, hogy ezeket a minimum vagy maximum értékeket nem hasonlítottam össze, ilyen adatokra épülő kvantitatív következtetést nem vontam le.

A bírálói kérdésekre adott válaszok:

1. A mozgófázis alkotóinak hatása és az elválasztandó izomerek szerkezeti tulajdonságai között fennálló esetleges összefüggések kapcsán kijelenthető, hogy alapvetően különböző királis állófázisokra egyaránt igaz, általános érvényű megállapítás nem tehető. Értekezésemben az egyes állófázis-családokra külön-külön megfogalmaztam ilyen összefüggéseket, ezek korlátolt alkalmazhatóságára Szökő Éva Professzor Asszonynak adott válaszütemben is kitértem. Az értekezésemben tárgyalt három állófázis-család közül a poliszacharid alapú kolonnák kiválóan alkalmazhatók semleges, többnyire aromás rendszerek analízisére. Elválasztási mechanizmusuknak megfelelően jellemzően normál fázisban vagy poláris-szerves módban alkalmazhatók. Ezekben a rendszerekben a mozgófázis poláris összetevőjének aránya és az elválasztandó vegyületek szerkezete közötti összefüggések valamelyest általánosíthatók, ilyen összefüggéseket tárgyaltam én is értekezésemben. A poliszacharid alapú állófázisok ionos vagy ionizálható vegyületek elválasztására legfeljebb erős π - π kölcsönhatást kialakítani képes vegyületek esetén jöhetnek szóba.

Velük ellentétben az ioncserélő tulajdonságú kolonnák ionos vagy ionizálható vegyületek elválasztását teszik lehetővé. Ezek az állófázisok leginkább poláris-ionos módban alkalmazhatók, ahol mozgófázisként elsősorban metanolt és acetonitrilt szokás használni, adalékként savat és bázist juttatunk az eluensbe. A retenció illetve a felismerés kialakulásáért felelős kölcsönhatások részben ugyanazok lehetnek, mint a poliszacharid alapú állófázisoknál (pl. H-híd, π - π kölcsönhatás, szterikus hatások), de az ezekre az állófázisokra jellemző ionos kölcsönhatás az előbb említett poliszacharid alapú állófázisoknál nincsen jelen. Ezen két állófázis-család között a bíráló által említett általánosítható összefüggések nem adhatók meg.

A makrociklusos antibiotikum alapú állófázisok ionos kölcsönható helyekkel is rendelkeznek, ezek az állófázisok már alkalmasak ionos vagy ionizálható vegyületek elválasztására, így összevethetők az ioncserélő kolonnákkal. Ilyen vizsgálat eredményét szerepeltettem dolgozatomban, melyből az az általánosítható következtetés volt levonható, hogy az ellenionok koncentrációjának növelésével csökkenthető a retenció.

2. Makrociklusos antibiotikum alapú kolonnákon az eluensösszetétel hatásának tárgyalásánál mutattam be lokális minimummal rendelkező görbét (pl. 28. ábra). Sajnos nem fogalmaztam teljesen egyértelműen az értelmezés során. Fordított fázisú illetve hidro-organikus rendszerben tárgyaltam a hidrofób-hidrofób és az elektrosztatikus kölcsönhatások szerepét, említettem, hogy a retenció MeOH-tartalomtól való függése a görbe növekvő, illetve csökkenő tartományában mely kölcsönhatásokkal értelmezhető, de nem kapcsoltam össze a két gondolatmenetet. Az U alakú görbe kialakulása arra vezethető vissza, hogy a vizsgált rendszerben a MeOH-tartalom változásával a két domináns, jellegében eltérő kölcsönhatás (hidrofób-hidrofób és elektrosztatikus) együttesen határozza meg a retenciós viselkedést. A MeOH-tartalom változásával a két kölcsönhatás retencióhoz való hozzájárulása változik, így jön létre a lokális minimummal rendelkező görbe.
3. Az általunk vizsgált kinin és kinidin alapú állófázisok fontos jellemzője a pszeudoenantimer jelleg, ennek a roppant hasznos tulajdonságnak a kiaknázására több példát is bemutattam a dolgozatban, köszönöm a bíráló elismerő szavait. Az Fmoc védőcsoport jelenlétében a kettős ionpároképzés lehetőségének visszaszorulásával az aminosav karboxilátcsoportja és a szelektor anioncserélő funkciós csoportja között

kialakuló kölcsönhatásra helyeződik át a hangsúly. Azonos körülmények között nem várható, hogy számottevő különbség legyen az egyes Fmoc-aminosavak deprotonálódási állandói között, így véleményem szerint az észlelt különbségek a szelektor–szelektand (Fmoc-aminosav) részvételével átmenetileg kialakuló diasztreomerek térszerkezetére vezethetők vissza. A prolin esetén a gyűrűs, de elektrongazdag régiót nem tartalmazó szerkezet okozhatja az észlelt viselkedést. Ez azonban csak hipotézis, semmilyen kísérleti adattal nem tudom alátámasztani.

4. A kettős kötés szerepének tárgyalásakor különösen igaz az, hogy a molekulában jelenlevő szerkezeti elemek (pl. gyűrű, delokalizált elektronok, szubsztituens minősége és helyzete, stb.) együttesen határozzák meg a retenciós tulajdonságokat. Ennek megfelelően, ahogy a bíráló is kiemeli, az értekezésben csak olyan esetben vontam le következtetést, ahol a kettős kötésen kívül az összes szerkezeti elem megegyezett az összehasonlított vegyületekben. Ikerionos oszlopokon a **86/87** és **118/119** vegyületepárok mellett további példaként említettem a β -aminosavak közül a **88/89** és a **106/107** vegyületepárokat. Ezekben az esetekben a kettős kötést tartalmazó származékok jellemzően kisebb retenciós idővel eluálódtak, mint a telített változataik, de ez alól is találtunk kivételt (**89ab**).

Makrociklusos antibiotikum alapú oszlopokon γ -aminosavak közül a **139/140** vegyületepárt vizsgálva az ikerionos állófázisokhoz hasonlóan elmondható, hogy a kettős kötés jelenléte általában kisebb visszatartást eredményezett, de fontos megemlíteni, hogy az alkalmazott kromatográfiás mód és az adott szelektor szerkezete is beleszól a retenciós viselkedésbe.

Poliszacharid alapú állófázisoknál β -laktámok vizsgálatánál a megegyező tagszámú gyűrűk esetén a kettős kötés (**121/122** és **123**; **125/126**; **130/131**) megjelenése –a másik két oszlop-családdal ellentétesen– általában nagyobb visszatartáshoz vezetett, de itt is találtunk kivételt, AmyCoat oszlopon a **130/131** vegyületepár ellentétesen viselkedett. Ciklusos β -aminosav származékok képviselői közül a **114ab/116cd** és **115ab/117gh** vegyületek esetében valamennyi vizsgált cellulóz alapú királis állófázison nagyobb visszatartást kaptunk a kettős kötést tartalmazó vegyületekre. A felsorolt példák is érzékeltetik azt a bírálók által többször kifogásolt tényt, hogy miért nem foglalmaztam meg teljesen általánosítható következtetéseket. Mivel az egyes szerkezeti elemektől függő kölcsönhatások eredője eredményezi az észlelt retenciós viselkedést, így egyetlen szerkezeti elem, jelen esetben a kettős kötés hatása a többi, retencióra ható elemtől függetlenül széleskörűen nem általánosítható.

5. Értekezésemben külön fejezetet szenteltem a királis állófázisok kritikai összehasonlításának, illetve a három részletesen tárgyalt állófázis-család esetén az eredmények bemutatását követően összefoglaltam az állófázisok alkalmazás szempontjából legfontosabb jellemzőit, ezekkel próbáltam a disszertációm esetlegesen gyakorlati szempontból kézbevevő olvasónak segítséget nyújtani. Bírálóm által felvetett gondolat Dr. Gáspár Attila bírálatában is megfogalmazódik. Amint ott is leírtam, jelenleg nem tudunk még ennyire részletes információkra épülő, megbízhatóan alkalmazható folyamatábrát felírni, aminek a végigkövetésével bárki tapasztalat, hozzáértés nélkül, kevés próbálkozással egyszerűen és gyorsan eljuthatna az adott elválasztástechnikai probléma megoldásáig. Hadd említsem meg azt is, hogy disszertációmban az enantioselektivitás értelmezésére helyeztem a hangsúlyt, de egy gyakorló kromatográfusnál emellett sokszor a diasztereomerek vagy éppen az akirális összetevők elválasztása is fontos lehet. Ilyen részlet gazdag használati útmutatóra még jó ideig

várnunk kell, a fordított fázisú elválasztások optimálásához használt Drylab szoftverhez hasonló tudású program elkészítése a közeli jövőben még nem várható. Annak érdekében viszont, hogy ilyen program elkészülhessen, alapvető fontosságú az adatgyűjtő mérések mellett a retenciós adatok szerkezeti jellemzőkön keresztüli értelmezése.

6. Az enantiomerek elúciós sorrendjének meghatározása fontos feladat. Szerencsémre a vegyületeket előállító együttműködő kutatócsoportok sok esetben rendelkezésünkre bocsátották mindkét enantiomert, így lehetőségünk nyílt az elúciós sorrend meghatározására. A poliszacharid alapú állófázisoknál az enantiomerefelismerő-képességet három, különböző szinten megjelenő kiralitásra vezetik vissza: a glükózegységekben jelenlevő királis szénatomokra, az egyedi polimerláncok szerkezetére és a számos polimerlánc alkotta rendezett szerkezetre. Az elúciós sorrend kialakulása tehát ezeken a szinteken dől el, az elúciós sorrendet jóslani nem tudjuk, a sorrend különböző kísérleti paraméterek változásának hatására történő cseréjének értelmezése még várat magára. Bezhan Chankvetadze kutatásai szerint poliszacharid alapú fázisokon hexán/alkohol eluensrendszerben néhány esetben az alkohol anyagi minőségének változása, illetve adott anyagi minőségű alkohol esetén az alkohol arányának megváltoztatása vagy éppen a hőmérsékletben bekövetkező változás is az elúciós sorrend cseréjét eredményezheti. (Kutatócsoportunk eddig csak a hőmérséklet megváltozásának hatására bekövetkező elúciós sorrend cserére talált példát.)

Daniel W. Armstrong a makrociklusos antibiotikum alapú állófázisok tervezésekor azt tényt használta ki, mely szerint egyes antibiotikumok baktériumölő tulajdonsága abban rejlik, hogy a Gram-pozitív baktériumok falának D-alanil-D-alanin terminális részéhez kötődve gátolják a falépítő folyamatokat. A mechanizmus ismeretében Armstrong és munkatársai arra gondoltak, hogy az antibiotikumok királisan irányított kötődése aminosav enantiomerek elválasztására nyújthat kiváló lehetőséget. A makrociklusos antibiotikum alapú állófázisokon kialakuló elúciós sorrend kapcsán korábban közölt kísérleti adatok alapján elmondható, hogy a fehérjealkotó (D.W. Armstrong és munkatársai közleményei; pl.: J. Chromatogr. A 731 (1996) 123; Anal. Chem. 72 (2000) 1767) és a nem fehérjealkotó (Péter Antal és munkatársai közleményei; pl.: J. Chromatogr. A 828 (1998) 177; J. Chromatogr. A 958 (2002) 89; Chirality 17 (2005) 193) primer és szekunder α -aminosavak túlnyomórészt követik az L<D ($S<R$) elúciós sorrendet. Ez igaz a két kiralitás centrumot tartalmazó β -szubsztituált α -aminosavak és a mono- és dihidroxil-aminociklopentán- és aminociklohexán-karbonsavak (β^3 -aminosavak) esetén is, ha a karboxilcsoport melletti szénatom konfigurációját vesszük figyelembe. Az alkil-, illetve arilszubsztituált nyíltláncú és mono- és biciklusos β^2 - és β^3 -aminosavak esetén nem találtunk ilyen általánosan érvényes tendenciát. Mind az $S<R$, mind az $R<S$ sorrend előfordul, az elúciós sorrend nem köthető az elválasztandó enantiomerek meghatározott szerkezeti jellemzőjéhez, valamelyik funkciós csoportjának konfigurációjához.

Amint azt válaszom 3. pontjában említettem az ioncserélő tulajdonságú anionos, illetve ikerionos szelektorok esetén a kinin és a kinidin pszeudoenantiomer jellege miatt ezek az állófázisok alkalmasak lehetnek az enantiomerek elúciós sorrendjének megfordítására, erre számos példát mutattam be értekezésemben. Azonban hadd emlékeztessék arra, hogy a pszeudoenantiomer fogalom a valóságban diasztereomer viszonyt takar, tehát lehet (és van is) kivétel az enantiomerek elúciós sorrendjének megváltozása alól. Az elúciós sorrend és a konkrét konfiguráció között fennálló kapcsolatot az értekezés 5.1.3. fejezetében tárgyaltam, négy egymással diasztereomer viszonyban álló szelektor esetén.

Megállapítottam, hogy a kialakuló elúciós sorrend az irányító csoportok együttes hatásán keresztül jön létre. Mivel a kromatográfiás körülmények változtatása nem feltétlenül egyenlő mértékben érinti a felismerés szempontjából meghatározó csoportokat, így a felismerés folyamatában betöltött szerepük változhat az alkalmazott körülményekkel. Azt gondolom, hogy ezen a területen további összefüggéseket akkor tudnánk feltárni, ha a másik négy diaszteromert előállítva, azokat hordozón rögzítve vizsgálni tudnánk mind a nyolc izomer viselkedését.

7. Az enantiomerek elválasztására az alkalmazott hőmérsékletnek is jelentős hatása lehet, az egyes enantiomerek visszatartása eltérőképpen változhat a hőmérséklettel. Ennek az érdekes ténynek a következményeképpen létezik egy olyan hőmérséklet, az ún. „izoelutróp” hőmérséklet, ahol a két enantiomer együtt eluálódik. Az izoelutróp hőmérséklet általában kívül esik a HPLC elválasztásoknál alkalmazott hőmérséklettartományon, de néhány esetben sikerült nekünk is kimutatni, hogy a szobahőmérséklet közelében tapasztalt együttes elúció alacsonyabb és magasabb hőmérsékleten megszűnik, az elúciós sorrend megváltozik és az enantiomerek elválaszthatók lesznek. A van't Hoff egyenlet segítségével meghatározott izoelutróp hőmérsékletek ugyanannál az elválasztó rendszerrel egymással összevethetők, de különösebb gyakorlati haszna az összevetésnek nincsen. Amint azt értekezésemben megfogalmaztam véleményem szerint termodinamikai adatok összevetésének akkor van értelme, ha azokat ugyanolyan körülmények (adott állófázis, állandó összetételű mozgófázis) mellett nyert kromatográfiás jellemzők alapján számolták. A jelentős szerkezeti analógiát mutató modellvegyületeknél ebben az esetben az összevetés a mechanizmus jobb megértése szempontjából hasznos információkat szolgáltat.

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

Szeged, 2018. december 4.



Ilisz István

egyetemi docens

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszeranalitikai Intézet