

Opponensi vélemény

Ilisz István

"Szerkezet-retenció összefüggések tanulmányozása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás rendszerekben királis állófázisok alkalmazásával"

című akadémiai doktori értekezéséről

A kiralitás az élet egyik nagyon érdekes és sok szempontból fontos jelensége, amelynek vizsgálata nyilvánvalóan izgalmas és fontos területe az analitikai kémiának. Miután a thalidomid szörnyű esete megrendítette a bizalmat az enantiomerkeverék hatóanyagot tartalmazó gyógyszerek iránt, az enantiomerek meghatározása a gyógyszeriparban fontos prioritást kapott és mára a hatóságok csak a hatásos enantiomer hatóanyagot tartalmazó készítmények forgalmazását engedélyezik. A királis nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia az elmúlt 3 évtizedben az egyik legfontosabb, leggyakrabban alkalmazott eszköz a királis vegyületek minőségi, mennyiség meghatározásában. Jelentősége a különböző gyógyszer- és élelmiszeripari, környezeti, klinikai vagy éppen kutatási területeken végzett analitikai vizsgálatok során megkérdőjelezhetetlen. Az analitikusok célja továbbra is egyértelmű: új, még nagyobb elválasztási hatékonyságú, még gyorsabb és robusztusabb királis folyadékkromatográfiás módszereket kell kidolgoznunk és ezeket alkalmaznunk.

A jelölt 13 éve kapcsolódott be a Péter Antal professzor által vezetett kutatócsoport kromatográfiás elválasztásokkal kapcsolatos kutatásaiba. A már akkor is jelentős szakmai elismertséggel és értékes nemzetközi együttműködésekkel bíró csoportban Ilisz István új lendületet és új lehetőségeket hozott. Bár a jelölt valamennyi közleményében társszerzőként jelen van a korábbi kutatócsoportvezető, közös munkájukban világosan kivehető, hogy a jelölt meghatározó és fontos szerepet játszott ezen tudományos eredmények megszületésében. A korábbi kutatócsoportvezető és a jelölt kiváló együttműködése és szorgalmas munkája vezetett oda, hogy mára a kutatócsoport a megjelent közlemények, a meghívott előadások, a kialakított nemzetközi kooperációk alapján a folyadékkromatográfiás módszerrel történő királis elválasztások területén nemzetközi szinten is meghatározó és elismert. Ritka és elismerésre méltó az, hogy a királis állófázisok kutatásának, fejlesztőjének két legnagyobb alakjával, Wolfgang Lindner (Bécsi Egyetem) és Daniel W. Armstrong (University of Texas) professzorokkal hosszú és rendkívül intenzív, folyamatos együttműködést folytatott. A jelölt ezekben a tudományos kooperációkban meghatározó szerepet töltött be, hiszen a közlemények több mint a felében ő az első vagy levelező szerző, a maradék közleményekben pedig a második szerző.

Az értekezésben a jelölt három különböző állófázis típust, az ioncserélő, a makrociklusos glikopeptid és a poliszacharid alapú állófázisokat tanulmányozta. Vizsgálta a királis felismerés folyamatára hatással bíró paramétereket (eluensösszetétel, különböző adalékok, hőmérséklet), illetve a kémiai szerkezet és a retenciós tulajdonságok közötti kapcsolatot, az elválasztások lehetséges mechanizmusát. Mindezek alapján a téma aktuális, komoly érdeklődésre tart számot a világban, kapcsolódik az elválasztástechnika kutatásának és alkalmazásainak jelenlegi legfontosabb trendjeihez.

Ilisz István értekezését 36 közleménye alapján írta és e munkák jelentős része az egyik legnagyobb hatású analitikai, és a legfontosabb kromatográfiás folyóiratban (J. Chromatogr. A) jelentek meg. Az értekezés témájához további 34 közlemény kapcsolódik, és ezekről is az előbbi jellemzés mondható el (nagy részükben meghatározó szerző, sokszor nemzetközi együttműködésben született, nagy hatástényezőjú folyóiratokban megjelent közlemények). Közleményei nagyrésze Q1 és kb. egyharmada D1 minősítésű, független hivatkozásai meghaladták az 1300-at. Mivel e magas színvonalú közlemények szigorú szakmai bírálatnak voltak kitéve, a munka tudományos színvonala aligha megkérdőjelezhető, a közleményekbe foglalt eredmények feletti ismételt aprólékos ítékezés pedig szükségtelen.

Az értekezés címe szerencsés módon nem túl általános, és elég jól lefedi az értekezésben tanulmányozott királis állófázisokon végzett kutatásokat. Az értekezés jól szerkesztett, átgondolt, szépen illusztrált, gondos munka. Elütések, nyelvtani hibák szinte egyáltalán nem találhatók benne (csupán a 13. oldal utolsó és a 118. oldal két utolsó bekezdésében találtam egy-egy betűelírást). Az értekezés a szokásos felépítést követi, felosztása az egyes főfejezetek között arányos: a rövid *Bevezetőt* követően egy kellően részletes, 36 oldalas, 174 hivatkozást tárgyaló irodalmi áttekintés és a célkitűzések megfogalmazása következik. Az *Irodalmi áttekintés* rész egyértelműen tükrözi, hogy a jelölt nagyon jól ismeri a szakterületét. Szerencsés helyzetben volt, hiszen az irodalmi áttekintésben jórészt együttműködő partnereinek (Pl. Péter, Scriba, Armstrong, Lindner professzorok) munkásságát kellett, hogy bemutassa. Az Alkalmazott anyagok és módszerek fejezet viszonylag rövid, jelezvén azt, hogy a kísérleti munka a műszerezettséget tekintve kizárólag HPLC rendszereket kívánt meg. A Kísérleti eredmények és értékelésük rész 3 alponthban, a 3 különböző királis állófázisokon végzett kutatás eredményeit foglalja össze, és ami egy jól megírt, tömören, szabatosan fogalmazott, alaposan összezsírozott, egyszerű, de jól áttekinthető ábrákkal illusztrált munka. Az Összefoglalás rész, követve az értekezés felosztását 7 oldalban összegzi az elvégzett munka tanulságait.

Néhány apróbb megjegyzésem:

- 8. o.: A jelölt a mozgófázisban oldott szelektort alkalmazó közvetlen folyadékkromatográfiás királis módszereknél nem lát gyakorlati jelentőséget a szelektor költsége és detektálási problémák miatt. Ugyanakkor, mivel a folyadékkromatográfiában is fontos trendnek számít az elválasztóegység méretének csökkentése (pl. UHPLC, vagy HPLC chip), ezek a problémák kevésbé látszódnak súlyosaknak.
- 19. o.: A jelölt megállapítja, hogy a szintetikus polimer alapú királis állófázisok esetén csak kevés irodalmi alkalmazás ismeretes, bár az ilyen állófázisok az akirális folyadékkromatográfiában alapvető fontosságúak. Mi lehet ennek az oka?
- 23. o.: A makrociklusos glikopeptid antibiotikum alapú állófázisok szelektorairól azt írja, hogy többségüknek nincs számottevő elnyelése UV/Vis tartományban. Ugyanakkor a 2. táblázatból látható, hogy valamennyi ilyen antibiotikumnak van aromás gyűrűje, a legtöbbnek több, akár 7 is. Ugyanitt arról is ír, hogy a királis kapilláris elektroforézisnél fontos szempont, hogy csekély UV elnyelést mutató antibiotikumot alkalmazzanak királis szelektorként. Ez az állítás két szempontból finomítandó: (i) ezek az antibiotikumok direkt UV detektálásnál is jól használhatók megfelelően származékolt izomerek elválasztásához (pl. D.W. Armstrong és mtsai, Chirality, 1994, 6, 496-509), illetve (ii) ezek az antibiotikumok jól használhatók indirekt UV detektálásnál, amikor a vankomicin nem

- csupán a királis szelektor, de a fényelnyelő háttér elektrolit összetevő szerepét is betölti (pl. S.Fanali: Electrophoresis. 2001, 222, 129-135 vagy D.W. Armstrong: Anal. Chem. 1994, 66, 1690-1695).
- 25. o.: A Chirobiotic oszlopok kapcsán tett állítás, hogy „amennyiben az egyik oszloppal részleges elválasztást sikerül elérni, jó esély van rá, hogy egy másik Chirobiotic oszlopon biztosítható lesz az alapvonalra történő elválasztás” túlzottan leegyszerűsítőnek tűnik (gondolom arra is van esély, hogy a másik oszlopon a felbontás romlik).
 - 31. o.: A királis állófázisok kritikai összehasonlításakor a molekuláris lenyomatú polimer alapú állófázisok alkalmazási körét „meglehetősen korlátozott”-nak ítéli meg és úgy látja, hogy „ezek az állófázisok sokat veszítettek jelentőségükből”. Meg kell jegyeznem, hogy a mikrofluidikai eszközök (LOC) területén a királis MIP-ek fejlesztése éppen a kutatások intenzív szakaszában van (pl. Wu és mtsai, Electrophoresis, 2018, 39, 356-362, vagy Qu és mtsai, Anal. Chem., 2009, 81, 9651–9656).
 - 38. o.: A vizsgált vegyületek biológiai jelentőségét tárgyaló fejezetben a ciklusos szekunder α -aminosavak alfejezetből nem tűnik ki ezen komponensek biológiai jelentősége.
 - 45. o.: Meglepő, hogy az acetonban oldott metanolt 280 nm-en detektálta.
 - 49. o.: A szavak nem megfelelő sorrendje hibás megállapításhoz vezetett, amikor azt olvashatjuk, hogy a „Poláris szerves oldószerek eluensként történő alkalmazása a legelterjedtebb a QN és QD alapú ioncserélő királis állófázisok esetén.” A jelölt gondolom azt szeretne volna megállapítani, hogy a QN és QD alapú ioncserélő királis állófázisok esetén legelterjedtebben poláris szerves oldószereket alkalmaznak eluensként.
 - 50. o.: A 11. ábrán a MeOH/MeCN arány változtatásának hatását vizsgálva a 25, 50 és 75% MeOH tartalomnál kívül 4. vagy 5. pontként a 0 és 100% MeOH tartalmat is felvehetné volna. Ráadásul a 11. B, C és F esetekre nem igaz az, hogy a MeCN arányának növelésével a retenciós idők nagyon megnövekednének (legalábbis a **46.** komponens esetén).
 - Bár a 4.4 fejezetben megadja, hogy a II. HPLC rendszerben 20 μ L-es mintainjektort használt, de a többi rendszerben nem ismerjük ezt a paramétert, ahogyan azt sem, hogy egyes kísérletekhez melyik rendszert használja. Emiatt a 6. táblázatban pikomolban megadott kimutatási határokat sem tudjuk átszámolni koncentrációegységbe. (Az - egyébként kevésbé informatív - abszolút mennyiségben megadott kimutatási határokokban egyébként a kapilláris elektroforézis, mint konkurens technika sokkal jobb, hiszen ott csak nanoliternyi minta elemzése történik.)
 - Az irodalomjegyzékben a hivatkozások paraméterei nagyon gondosan vannak feltüntetve, ezért is szűrnak szemet a 172 és 173 hivatkozások, ahol nem adja meg a közlemények címeit.
 - Az F2-F7 kromatogramok függőleges tengelyének neve, skálázása hiányzik.

A dolgozattal kapcsolatos kérdéseim a következők:

1.

A **62** és **70** komponensek csupán egy fenil-csoportban különböznek. A két vegyület enantiomereinek ioncserélő tulajdonságú állófázison való elválasztásakor különböző bázisokat használva a **62** komponensnél gyakorlatilag nincs eltérés a kapott felbontás adatokban, míg a

fenilcsoportot tartalmazó **70** komponensnél jelentősen nagyobb és a bázis anyagi minőségétől jelentősen függő felbontás értékeket kapott (15. ábra). Hogyan magyarázza mindezeket?

2.

Az injektálási térfogatnak mintha nem tulajdonítana túl nagy szerepet a királis elválasztásokban, bár a különböző elválasztási módszereknél a különösen hatékony elválasztás eléréséhez alapvető fontosságú a kis mintatérfogó (sokszor egyfajta fókuszálása a mintakomponensek egy szűk sávba az elválasztóegység elején). Mennyire látja lényegesnek a mintatérfogó nagyságát a királis elválasztásokban? Van-e itt értelme a kiindulási mintadugó szűkítésén fáradozni?

3.

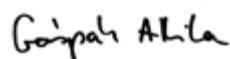
A 30. ábrán azt mutatja be, hogy az ellenion koncentrációjának logaritmusa és az elsőként eluálódó enantiomer retenciós tényezőjének logaritmusa között lineáris a kapcsolat. Míg azonban a **97** vegyület 3 formájánál az egyenesek meredeksége szinte tökéletesen megegyezett, addig a **97a** komponens meredeksége jelentősen eltért. Mivel magyarázza az egyezéseket és az eltéréseket?

4.

A sav és bázis anyagi minőségének hatását vizsgálva a királis elválasztásra, azt állapítja meg, hogy jelenleg még nem tudjuk elméleti úton megjósolni, hogy adott rendszer esetén melyik funkciós csoport tölt be meghatározó szerepet a királis felismerésben. Máshol is megemlíti, hogy a sztereoszelektív kölcsönhatások kialakulása nem teljesen tisztázott, így az elúciós sorrend nem jósolható, az elválasztás inkább csak korábbi tapasztalatok alapján végezhető el. Érdekes, hogy kapilláris elektroforézisnél, ahol többnyire hasonló királis szelektorokat használnak, a királis elválasztások optimalálásánál léteznek az optimalást segítő protokollok (Elphodextrin starter kit, Cyclolab). A doktori munka során végzett sokrétű kutatásai alapján lát-e arra lehetőséget, hogy HPLC-nél is hasonló protokoll legyen kifejleszthető, mellyel lépésről lépésre, adott szelektorokat megfelelő sorrendben és körülmények között tesztelve akár egy ismeretlen vegyület enantiomerei is biztonsággal elválaszthatók legyenek?

Összefoglalva az értekezésről kialakított véleményemet megállapítom, hogy Dr. Ilisz István eredményesen tanulmányozta a különböző vegyülettípusok szerkezete és három eltérő királis állófázis típuson történő retenció összefüggéseit. Az értekezésben összefoglalt munka értékét jelzi, hogy a bemutatott eredményeket nagyszámú és nagy hatástényezőjű nemzetközi folyóiratokban publikálta. A doktori munka eredményeit az MTA doktora cím megszerzéséhez egyértelműen elegendőnek tartom. A tézispontokban megfogalmazott megállapításokat új tudományos eredményeknek ismerem el. A nyilvános védés kitűzését és annak sikeressége esetén az MTA doktora cím odaítélését javaslom.

Debrecen, 2018. július 3.



Dr. Gáspár Attila
egyetemi tanár