

HIVATALOS BÍRÁLAT

Dr. Ilisz István, PhD

*„Szerkezet-retenció összefüggések tanulmányozása nagyhatékonyságú
folyadékkromatográfiás rendszerekben királis állófázisok alkalmazásával”*

címmel elkészített akadémiai doktori értekezéséről

Dr. Ilisz István doktori értekezését 178 gépelt oldalon készítette el, és azt 2018-ban nyújtotta be a Magyar Tudományos Akadémia Doktori Tanácsához az akadémiai doktori cím elnyerése érdekében. A dolgozat felépítése: *Tartalomjegyzék* 2 oldal, *Rövidítések jegyzéke* 2 oldal, *Bevezetés* 2 oldal, *Irodalmi áttekintés* 37 oldal, *Célkitűzések* 2 oldal, *Alkalmazott anyagok és módszerek* 6 oldal, *Kísérleti eredmények és értékelésük* 63 oldal, *Összefoglalás* 7 oldal, *Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények (listája)* 3 oldal, *Az értekezés témájához kapcsolódó egyéb saját közlemények (listája)* 3 oldal, *Irodalomjegyzék* 13 oldal, *Függelék (Az értekezésben tárgyalt vegyületek* 14 oldal, *Táblázatok* 21 oldal, *Kromatogramok* 4 oldal). Az értekezés, a függelékben megadottakon kívül 37 ábrát és 9 táblázatot tartalmaz.

A dolgozat formailag fő vonalakban megfelel a doktori értekezéssel szemben támasztott követelményeknek. Az egyes fejezetek aránya jónak mondható, ha a *Kísérleti eredmények és értékelésük*, valamint az *Összefoglalás-t* úgy tekintjük, mint amelyek tartalmazzák az eredmények megbeszélését. Egy olyan, összefoglaló munka, mint amelyet most a kezünkben tartunk, valószínűleg könnyebben forgatható lett volna egy különálló, *Az eredmények megbeszélése* fejezettel, valamint, amire később még szeretnék utalni, időnként hiányzott számomra egy valamilyen „vezérfonal”, amely – ezen dolgozat alapján – segíthetne az újabb és újabb, hasonló célú munkák elindítása és végrehajtása esetében.

A *Bevezetés* megfelelően helyezi bele az olvasót a dolgozat témájába, és megadja az értekezés tartalmi utalását. Az *Irodalmi áttekintés* részletesen bemutatja a királis vegyületek elemzéséhez szükséges elméleti háttérrel, majd az alkalmazható kromatográfiás eljárások szakirodalmát, elsősorban a királis állófázisok összetételének jellemzésével. A termodinamikai paraméterek jellemzésével utal az elemzések,

elsősorban az analitikai elválasztás kinetikai hatékonyságát befolyásoló kérdésekre. Egy fontos, rövid fejezet tartalmazza a királis elválasztási jelenségek esetében is meghatározható, ún. „nem-enantioszelektív” összetevők jelentőségét. S végül egy felosztást találunk az értekezésben leírt eljárásokban használt vegyület-családokról. A *Célkitűzések* öt pontban foglalják össze az elvégzett feladatok terveit. Az *Alkalmazott anyagok és módszerek* fejezet mutatja meg konkrétan annak a három állófázis-csoportnak a rövid jellemzését, amelyek a dolgozat eredményeihez fel lettek használva.

A *Kísérleti eredmények és értékelésük* című fejezetben a jelölt kísérletet tesz arra, hogy a retenciós eredmények és az elválasztandó optikai izomerek szerkezete közötti kapcsolatot megvilágítsa a kísérleti körülmények, elsősorban az eluens-összetétel, és a hőmérséklet, valamint az eredmények alapján számítható „látszólagos” termodinamikai értékek tükrében. A háromféle elválasztó-rendszer közül a legnagyobb hangsúlyt az ioncserélő tulajdonságú állófázisokon végzett kutatások kapták, de részletes kísérleti eredményekről ír a makrociklusos antibiotikum alapú állófázisokon és a poliszacharid alapú állófázisokon végzett mérések esetében is.

Az *Összefoglalás* a kísérleti eredményekre való részletes utalások nélkül egybefoglalja a háromféle állófázissal kapott eredményeket.

Az értekezés mellett készített *Tézisfüzetről* is szót kell ejteni. Ebben a tézisfüzetben ugyanis olyan összefoglalása szerepel az eredményeknek, amely hasonló módon nem szerepel az értekezésben. Így a tézis-szerű következtetések, amelyek nagyon jól használhatók egy-egy királis vegyülepár elválasztásának megtervezéséhez, csak itt találhatók.

Az opponens az értekezés áttanulmányozása után elsődlegesen azt tudja megállapítani, hogy nagyon nagyszámú, és a témában felvetett munkához majdhogynem áttekinthetetlen változatosságú körülmények között végzett kísérletek között kellett a jelöltnek „rendet teremtenie” értekezésében. Meg kell még említeni azt is, hogy az értekezés témájával kapcsolatos tudományos munkának csak egy részét tartalmazza az értekezés, amelynek eredményeit széleskörű hazai és nemzetközi együttműködések során kapta.

Az értekezéshez felhasznált kísérletek kiértékelésének fő célja, vagyis a királis vegyületek retenciós tulajdonságai, illetve a vegyületek és az állófázisok szerkezeti

tulajdonságai közötti összefüggések vizsgálata, és a lehetséges általános következtetések levonásához a jelölt három állófázis-típussal (csoporttal) foglalkozott. Bár ezen kiválasztott állófázisok használatának indokoltságát részletesen leírja, talán hasznos lett volna olyan jellegű utalásokat is belefoglalni a kiválasztásról, amely akkor lenne hasznos, ha az adott állófázisok/oszlopok nem állnak a kísérletező rendelkezésére.

A gyógyszeriparban a királis bioaktív vegyületek szintézise folyamatosan igényli az optikailag tiszta és ellenőrzött készítmények előállítását. A jelölt, kutatómunkájában elsősorban ennek a feladatnak megoldásához járult hozzá a kidolgozott eljárásokkal. A hasonló szerkezetű vegyületek esetén az alkalmazott módszerek várhatóan megfelelő analitikai eljárásokat jelentenek, azonban a különböző szerkezetű, de hasonló szerkezeti elemeket tartalmazó vegyületek esetén szükség lehet általánosan kimondható elvek meghatározására. A jelölt ezért célul tűzte ki, hogy a kapott kísérleti eredményeket elemezve ilyen, általánosan is használható elvek mentén lehessen a kísérleti körülményeket meghatározni, a szükséges állófázisokat kiválasztani esetlegesen igen eltérő tulajdonságú modellvegyületek optikai izomerjeinek elválasztására. Kísérleteinek fő vonala a folyadékkromatográfiás királis állófázisok alkalmazási körének bővítéséhez, új típusú állófázisok tervezéséhez járul hozzá, amelyek segítségével a kidolgozott meghatározások alkalmasak optikai izomerek elválasztására, és ennek alapján különböző hatóanyagok királis tisztaságának ellenőrzésére, valamint preparatív elválasztások kidolgozására.

Mindezek alapján a témaválasztás időszerűnek tekintendő, és alkalmas arra, hogy a jelölt az elkészített értekezés sikeres megvédésével bizonyítsa kutatói kvalitásait.

A jelölt az elmúlt tíz-tizenkét év alatt, a kereskedelmi forgalomban is kapható, valamint nemzetközi együttműködés keretében beszerzett állófázisokkal dolgozott. A téma elismert kutatója, amit jelez a közleményekre kapott több mint 1400 független hivatkozás (az ISI adatai alapján). A dolgozatot kétféle szempontból lehet értékelni. A módszerek kiválasztása és továbbfejlesztése szempontjából milyen eredményeket ért el a jelölt, illetve a célkitűzésben feltett kérdésekre megfelelően alkalmazta-e azokat. Meg kell állapítanom, hogy jelölt munkája e két szempontból megfelel a követelményeknek.

Az értekezés sokágú, tartalmas munka eredményeit közli, de néhány megjegyzésem van mind formai, mind tartalmi vonatkozásban. Ezeken kívül kérdéseim lesznek a kísérletes kutatómunka eredményeivel kapcsolatban.

Néhány formai megjegyzés.

A gépelt értekezés gyakorlatilag betűhiba-mentes, csak néhány ilyen jellegű megjegyzésem lehet (*1,2,3,4-Tetrahydroizokinolinok, nemcsak ... hanem ... is, végbemegy*). Néhány érdekes szó-formázás is előfordul, pl. „hidrofóbbabb karakter”. Az ábrákhoz írt szövegekkel kapcsolatban csak az a megjegyzésem, hogy az ábrák teljes aláírása a korábbi közlések során a közleményekben megjelenik, de éppen ezért hasznos lett volna itt megadni a hivatkozást, miután a kísérleti körülményeket csak a közleményekben lehet megtalálni.

A tartalommal kapcsolatos észrevételek.

A szövegben legtöbbször enantiomerekről szól a jelölt, de nem mindig egyértelmű, hogy valóban csak az enantiomerekről van-e szó. A két (vagy több) aszimmetria-centrummal rendelkező vegyületeknek ugyanis nem mindegyik párja enantiomer-pár, és a bemutatott kísérleteknél ez néha csak utánajárással állapítható meg, még akkor is, ha az értekezésben szereplő, mintegy 220, több királis izomerrel rendelkező vegyület szerkezetéről a függelékben táblázat szerepel.

Bár a jelölt a szórás fel nem tüntetéséről részletesen ír (véleménye szerint a szórás a kapott különbségek értelmezésében „kevésbé releváns”), mégis hasznos lett volna, ha ezzel kapcsolatosan valamilyen értékelést leír. Gondolok itt arra, hogy a szórás-adatok nélkül nem egyértelmű az adatpontokra történő illesztés értelmezése, vagy a lokális maximum vagy minimum értékek megjelenésének magyarázata egy kísérletsorozatban, amelyben egy paraméter (pl. eluens-összetétel) változtatása történik.

Számomra ugyanakkor nagyon impresszív volt a különböző körülmények között végzett elválasztások hátterének magyarázata. Azt gondolom, hogy egy ilyen összefoglaló jellegű munka, részleteiben átfogó értekezés esetében nem kell, és nem is szabad minden egyes kis részletre kiterjedő kérdés-sorozatot feltenni. Ezért én azt az utat választottam, hogy néhány, számomra és valószínűleg a szakmai közösség számára

is érdekesnek, és így fontosabbnak ítéltető eredménnyel kapcsolatban szeretnék kérdéseket feltenni a jelöltnek.

1. A jelölt részletesen tanulmányozta a kérdést az általa választott állófázisok alkalmazása esetén, én mégis megkérdezem, hogy lehet-e valamilyen általános érvényű kijelentést tenni a királis felismerés befolyásolásáról, ha a mozgófázis alkotóinak hatását és az elválasztandó izomerek szerkezeti tulajdonságait vetjük össze?
2. Nem teljesen világos, hogy az eluens metanol-tartalma esetén bizonyos körülmények között „minimum-görbe” szerinti változást láthatunk, amelynek a magyarázatául a hidrofób, illetve az elektrosztatikus kölcsönhatások „megjelenését” hozza fel a jelölt. Nem világos, hogy ezen „elektrosztatikus kölcsönhatások” ténylegesen hogyan magyarázzák éppen a koncentráció növekedésének következtében bekövetkező nem egyirányú változásokat (azaz pl. a *minimumok* kialakulását)?
3. Nagyon elegáns a kinin és kinidin bázisú állófázisok használata, amelyekkel az *N*-Fmoc-védett aminosavak enantiomerjeinek vándorlási sorrendjét lehetett egymáshoz képest „megcserélni”. Mi lehet a szerkezettel összefüggő oka annak, hogy a legtöbb aminosav esetében az elválasztás hatékonysága nagy (ld. a *R*-felbontás értékeket), ugyanakkor az Fmoc-védett prolin esetében a kinin alapú (QN-AX) állófázison alig történik elválasztás, míg a kinidin alapú (QD-AX) állófázis is a többi aminosavhoz képest csak kisebb mértékben eredményezi a (fordított elúciós sorrendben) megjelenő enantiomerek elválasztását?
4. A kapott eredmények között számomra különösen érdekes volt, amikor egy egyszerű kettős kötés lényeges hatással volt az enantiomerek retenciós tulajdonságaira. Ezt a jelenséget mutatta be a jelölt az általa 86a és 86b és 87a és 87b vegyületek, illetve a 118a és 118b és a 119c és 119d vegyületek esetén. Mindkét esetben természetesen meg kell jegyezni, hogy több királis centrum található a molekulákban de éppen ezért csak azok a szerkezetek érdekesek, amelyekben a térszerkezet csak a kettős kötés megjelenése szempontjából különbözik. Bár erre a kérdésre a jelölt a poláris

kölcsönhatások szerepével utal, mégis kérdésem, hogy éppen az adott esetekben a kettős kötés jelenlétének hatását az adott állófázisokon történő elválasztásokat tekintve lehet-e a retenciós tulajdonságokra általánosságban is megfogalmazható következtetéseket levonni?

5. A többféle oszlop használata és összehasonlítása során felmerül a kérdés, hogy tudott-e a jelölt esetleg olyan, akár folyamatára jellegű összefüggéseket megállapítani, amelyeket a szerkezet-retenciós tulajdonságok változásai, illetve összefüggései alapján mintegy vezérfonalként lehetne alkalmazni? Gondolok itt arra, hogy az elválasztandó molekulák főbb szerkezeti tulajdonságainak felsorolásával, *igen-nem* választási lehetőségeken keresztül végig lehetne vezetni azt, hogy milyen állófázisokat érdemes alkalmazni, illetve milyen kísérleti körülményeket javasol használni az adott állófázisok esetén?
6. A kísérletek során nagyon fontos hatással is foglalkozott a jelölt, nevezetesen, az enantiomer-párok sorrendjének cserélődése függött az állófázis funkciós csoportjainak konfigurációtól. Lehet-e megfogalmazni valamilyen általánosítható összefüggést az optikai izomerek elúciós sorrendjének cserélődése során az állófázisok tulajdonságait illetően?
7. A 23. és a 37. ábrákon két-két „cisz”-konfigurációjú vegyületpár (a 103a és 103b, illetve a 218a és 218b azonosítójú vegyületpárok) esetén tapasztalta azt, hogy a hőmérséklet növelésének hatása (5°C, 15°C és 20°C, illetve 10°C, 20°C és 40°C-on végzett kísérletek) az egyik izomer retenciójában lényegesebb változást okoz a másikhoz képest, aminek az eredménye a hőmérséklettől függő elúciós sorrendbeli cserélődés. A ZWIX(-) állófázison elsősorban a 103a molekula retenciója lényegesen csökken, míg a hőmérséklet növelésének hatása a 103b vegyület esetében gyakorlatilag nem változtatja lényegesen a retenciót. A poliszacharid alapú állófázison (37. ábra) tapasztalt hőmérsékletnövelés erősebben csökkentette mindkét izomer retencióját, (a kromatográfiás elemzések esetén ez részben természetes is) de a két izomernél tapasztalható különböző mértékű változás sorrendbeli cserét is eredményezett a magasabb hőmérsékletek esetén. Kérdésem, hogy lehet-e az optikai

izomerek szétválását éppen nem okozó (mondhatjuk „nem engedélyező”) hőmérsékleteket a különböző királis elválasztási körülmények esetén egymással összevetni, illetve az adott körülmények esetén a termodinamikai paramétereket összehasonlítani?

Összefoglalóan megállapítom, hogy jelölt az értekezésben leírt munkát magas színvonalon, a kitűzött céloknak megfelelően, és következetesen hajtotta végre. Munkájával bemutatta és alátámasztotta, hogy a királis elválasztások esetén lehetőség van a kísérleti körülmények és a szerkezeti tulajdonságok összefüggéseinek megvilágítására.

A jelölt főbb tudományos eredményeinek ismerem el a következőket.

1. Ioncserélő kromatográfiás állófázisokon az eluens acetonitril-tartalom növelésének hatására csökkenő retenció a szelektorok eltérő solvatációjával, valamint az ikerionos állófázisokon a kisebb retenció az állófázis kationcserélő funkciók csoportjainak taszító hatásával értelmezhető.
2. Az alifás illetve aromás szubsztituens tartalmazó vegyületek esetén a nagyobb retenció az ikerionos állófázis a szelektor és az aromás rendszerek között kialakuló n-n kölcsönhatásokkal értelmezhető, amelyhez a makrociklusos antibiotikum alapú állófázisoknál nagyobb enantioszelektivitás és felbontás is társul további szférikus hatások kialakulása miatt.
3. Az aromás gyűrűn elhelyezkedő elektronküldő és elektronvonzó szubsztituensek hatása a retencióra és az enantioszelektivitásra a H-híd kölcsönhatásoktól függhet. Az elektronküldő metilcsoport általában nem okoz számottevő változást a retencióban, de csökkentheti az enantioszelektivitást. A metoxycsoport jelenléte növeli a retenciót, de csökkenti az állófázisok enantiomerfelismerő-képességét, és a savas karaktert eredményező nitrocsoport jelenléte erősen megnövelte a visszatartást és csökkenti az enantioszelektivitást.

4. Az elúciós sorrend megállapításának kiemelkedő fontossága van a sztereoizomerek elválasztásában, mind a minőségi azonosítás, mind a mennyiségi meghatározás megbízhatósága szempontjából. Kimutatta, hogy az állófázis szerkezeti tulajdonságai befolyásolhatják az elúciós sorrendet. A makrociklusos antibiotikum, illetve a poliszacharid alapú állófázisokon az elúciós sorrend nem jósolható, ellentétben a pszeudoenantimer viszonyban álló kinin és kinidin alapú ioncserélő tulajdonságú állófázisokkal, amelyeknél az elúciós sorrend egymással ellentétes.

5. Megállapította, hogy az ioncserén alapuló retenciós viselkedés jellemzésére alkalmas sztoichiometrikus helyettesítési modell esetében a $\lg k$ - $\lg C$ függvények meredeksége a szelektor monoionos, vagy ikerionos állapotától függ.

6. Az elválasztást befolyásoló hőmérséklet hatásával kapcsolatban négyféle, elméletileg lehetséges viselkedést írt le, és eredményesen állapította meg több optikai izomer entrópiavezérelt elválasztását.

Összességében megállapításaim a következők.

A jelölt témaválasztása korszerű. A tudományos eredmények újak, és ezekről a jelölt a nemzetközi folyóiratokban közölt publikációkban részletesen beszámolt. Az értekezés elfogadható, mint a pályázó magas szintű, tudományos kutatásra való alkalmasságát bizonyító munka. Ezért a Doktori Tanácsnak javasolom, hogy az értekezést nyilvános vitára bocsássa, és sikeres védelem esetén a tudomány doktora címet a jelöltnek megadja.

Pécs, 2018. szeptember 25.



Dr. Kilar Ferenc

a biológiai tudomány doktora