

Bírálat
SZÉKELY EDIT:

„Oldószer, reagens vagy kicsapószer:

a szuperkritikus szén-dioxid változatos felhasználási lehetőségei”

c. MTA Doktori Értekezéséről

A fázisegyensúlyon alapuló elválasztási módszerek kutatása, fejlesztése előtt új távlatok nyíltak meg, amikor az 1960-as évek elejétől a szokásos gáz, folyadék és szilárd halmazállapotú rendszerek mellett, kezdetben az extrakciós műveletekben, alkalmazásra kerültek az ún. szuperkritikus fluidum fázisok is. Már korán felismerték, hogy a szuperkritikus fluidumok kiváló oldószerek, amelyek oldóképessége, polaritása, a hőmérséklet és a nyomás változtatásával, esetleg módosító oldószer adagolásával is, széles tartományban hangolható az elválasztandó komponensek polaritásához igazodva. Szuperkritikus oldószerként jellemzően a szén-dioxid, kisebb mértékben a víz alkalmazása terjedt el a különböző analitikai (HPLC, CE) és preparatív célokra (növényi hatóanyagok, illóolajok kinyerése, környezetvédelem, polimer kémia, nanotechnológia stb.).

Az elválasztás szelektivitásának, valamint az anyagátbocsátási folyamat sebességének növelésében rejlő lehetőségeket ismerte fel *Simándi Béla* professzor, amikor 1986-ban a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyipari Műveletek majd Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszékén önálló kutatócsoportot hozott létre a scCO_2 sokoldalú technológiai alkalmazásainak fejlesztésére. A növényi hatóanyagok kinyerése mellett munkatársaival (*Fogassy Elemér, Faigl Ferenc, Pálovics Emese*) a világon elsőként valósították meg a farmakológiai szempontból fontos optikailag aktív vegyületek racemát elegyeinek rezolválását szuperkritikus szén-dioxidos extrakcióval. A Tanszék ezen nemzetközileg is elismert kutatásainak szerves része, folytatása *Székely Edit* MTA Doktori Értekezése. A Jelölt célul tűzte ki a scCO_2 széles spektrumot átfogó alkalmazásainak bemutatását és elméleti háttérének felderítését, különös tekintettel azokra az elválasztási módszerekre, ahol a scCO_2 -ot mint oldószert, mint reagenst és mint kicsapószert használják nagy enantiomertisztaságú termékek előállítására. Mivel ezek az alkalmazások a kutatás és innováció új lehetőségét teremtették meg pl. a gyógyszer- és agrokémiai ipar, a környezeti technológia és az anyagtudomány területén, ezért az Értekezés témaválasztását a Bíráló feltétlenül időszerűnek tartja. A témaválasztás egyben egy új fejlesztési szemléletet is képvisel, ami akár vezérfonalként tekinthető további, hatékony szeparációs módszerek fejlesztéséhez.

Formai megjegyzések

Székely Edit kutatási eredményeit 169 oldalas, tetszetős tipográfiával megírt, igényes kiállítású értekezésben foglalta össze. Külön elismerésre méltóak az alkalmazott készülékeket bemutató szép, színes rajzok valamint a felhasznált 33 szerves vegyület képletét, elnevezését és rövidítését tartalmazó 4 oldalas, a dolgozattól függetlenül kezelhető fóliázott melléklet, ami jelentősen megkönnyíti a szöveg folyamatos olvasását. A Jelölt 3 oldalas bevezetés után 13

oldalon irodalmi információk alapján a scCO_2 tulajdonságait tárgyalja, 18 oldalon a kísérleti módszereket, 93 oldal terjedelemben pedig a fentebb említett alkalmazási területelen elért új eredményeinek diszkussziójával foglalkozik. A dolgozatot 3 oldalas összefoglalás, 271 irodalmi és 32 saját (a PhD fokozat megszerzése óta megjelent) közlemény felsorolása zárja. A kutatómunka 5 főbb pontban összefoglalt téziseit a mellékletként csatolt 15 oldalas önálló füzet tartalmazza.

Az Értekezés felépítése arányos, a tárgyalás menete logikus. A megfogalmazás rendkívüli tömörsége ellenére mindvégig magyaros, stílusa gördülékeny. Az optikailag aktív vegyületek esetében konzekvensen alkalmazza az IUPAC által ajánlott konvenciót, azaz a királis centrum(ok) abszolút konfigurációjára utaló *Chan – Ingold – Prelog*-féle prioritási szabály alapján megállapított (R), (S) jelölést és a mért forgatás irányára utaló (+) vagy (-) jeleket.

Az Értekezés tudományos eredményeinek méltatása

1. Fejezet: A bevezetésben a Jelölt világosan fogalmazza meg azt a felütést, amellyel az olvasó figyelmét a szerző gondolkodásmódjára, kutatásainak céljára irányítja.

2. Fejezet: Annak ellenére, hogy a szuperkritikus extrakciós technológiát már az 1970/80-as évek óta alkalmazzák, a szuperkritikus állapot fiziko-kémiai értelmezése napjainkban is az elméleti kutatások tárgyát képezi. Elismeréssel kell ezért szólnunk arról a korszerű irodalmi összeállításról, amely, egy nem konvencionális oldószer, a scCO_2 felhasználása szempontjából fontos fázistulajdonságokat foglalja össze. Különös figyelmet szentel az oldhatóság, a polaritás és a fázisok közötti anyagátadási tényező számításának. Az oldhatósági modellek közül a klasszikus *Hildebrand*-féle modellből kiindulva értékeli, a *Giddings*- és a *Hansen*-féle oldhatósági paraméterek alkalmazhatóságát, valamint az oldhatóság becslésére szolgáló empirikus egyenleteket. A Jelölt kritikai szemléletét jól illusztrálja a 2.2. ábra, amelyen saját számítási alapján az említett modell egyenletekkel számított oldhatósági paramétereket hasonlítja össze. A diffúziós műveletek szempontjából fontos szerepet játszó anyagátadási tényező számítására a *Sherwood*-féle számot alkalmazza. Annak ellenére, hogy az anyagtranszportra jellemző *Sherwood*-számban az eredeti változók száma a dimenziómentes *Reynolds*- és a *Schmidt*-számok behelyettesítésével lényegesen csökkenthető a viszkozitás és a diffúziós együttható kísérleti meghatározása vagy becslése azonban a scCO_2 oldószer esetén sem kerülhető meg. Az irodalmi részben ezért a Jelölt e két fontos paraméter mérési és számítási módszereit is áttekinti.

A Bíráló számára meggyőző az a szakmai biztonság, amivel a Jelölt a vonatkozó irodalmi ismereteket kezeli. Megjegyzem, ugyanez a biztos háttértudás nyilvánul meg akkor is, amikor az Értekezés további fejezeteiben az eredmények értékeléséhez használt gyógyszerismereti szakirodalmat idézi, értékeli.

3. Fejezet A dolgozat kísérleti részével kapcsolatban nagy elismeréssel kell szólnunk a Jelölt által végzett készülékfejlesztési munkáról. Berendezéseket tervezett és készített/csináltatott az alábbi célokra: oldhatóság meghatározása statikus és dinamikus technikával, esőtestes viszkozitás mérése, szuperkritikus extrakciós berendezés, autokláv a kristályosítás megfigyelésére, félfolyamatos antiszolvens kristályosító berendezés, kémiai reaktort és hozzá

kapcsolt folyamatos extraktort tartalmazó nyomás alatt üzemelő reaktorrendszer. Ilyen berendezések a kereskedelmi forgalomban nem kaphatók. A szén-dioxid szuperkritikus nyomása és hőmérsékleti körülményei között (31°C, 74 bar) működő egyedi készülékek építése időigényes munka, tervezéséhez komoly elméleti tudás és gyártási tapasztalat szükséges. Ezt a feladatot a Jelölt kiválóan oldotta meg, amivel jelentősen hozzájárult a tanszék „know how” ismereteinek gyarapításához, valamint a munkahely laboratóriumi infrastruktúrájának fejlesztéséhez. Megjegyzem, annak ellenére, hogy a berendezések működését legtöbb esetben számítógép vezérli, a rendszer kezelése az operátor részéről komoly manuális rutint is igényel. Mivel a kísérletek és az analitikai kémiai módszerek részletes leírása jelentősen megnövelte volna az Értekezés terjedelmét, ezért a Bíráló egyetért a Jelölt azon döntésével, miszerint a metodikai részleteket illetően megjelent közleményeire hivatkozik.

4. Fejezet Az eredmények értékelésével foglalkozó fejezetben a szerző, a fentebb említett három csoportba sorolva, a scCO_2 mintegy 19 új felhasználási lehetőségét mutatja be. Ilyen sokrétű munka esetén talán nem szükséges minden egyes alkalmazásról külön-külön értékelést adni, főképpen azért, mert az eredményeket a Jelölt a szakma mértékadó folyóirataiban már publikálta. A Bíráló ezért elsősorban a nagy enantiomertisztaságú gyógyszer-előállítás témakörébe tartozó munkák tudományos eredményei közül szeretne néhány érdekes alkalmazást kiemelni.

Már az 1980-as évek óta egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy a szintetikus (racém) gyógyszerek két enantiomerjének nem szükségképpen, de általában, jelentősen eltérő farmakológiai hatása van. A gyógyszerkutatás területén ezért, egyre fokozódó figyelmet fordítanak a hatóanyagok enantiomertisztaságának növelésére (eleget téve ezzel az amerikai FDA gyógyszer forgalmazási előírásainak). A Jelölt tehát, nem véletlenül, mindenekelőtt ezen a kutatási területeken igyekezett hasznosítani a scCO_2 alkalmazásában rejlő lehetőségeket. Vizsgálatai kiterjedtek egyrészt a rezolválási reakció, másrészt az extrakció műveleti körülményeinek vizsgálatára. A rezolválást illetően ezek jellemzően alábbiak: a racemát szempontjából legalkalmasabb oldószer és rezolváló reagens kiválasztása, a molarány hatásának vizsgálata, a diasztereomer megbontása stb. A scCO_2 extrakciót illetően pedig a nyomás, hőmérséklet, extrakciós idő, fokozatok száma stb. A műveleti körülmények (p és T) optimalizására a Jelölt a kemometria kísérlettervezési módszerét használta. A célfüggvény a (4.1) egyenlettel definiált ún. *Fogassy-féle F* paraméter volt (minél jobb extraktum és raffinátum hozammal, minél tisztább enantiomerek előállítása). Az alábbiakban az Értekezés néhány önkényesen kiválasztott rezolválási módszerét méltatom.

1. *Racém trans-ciklohexán-1,2-diol (CHD) rezolválása enantioszelektív borkősavas (BS) komplexképzéssel.* Savas vagy bázisos csoportokat tartalmazó racemátok elválasztására széles körben elterjedt a diasztereomer sópár képzésen alapuló rezolválás. A CHD esetén azonban, alkalmas funkciós csoport hiányában, ez a módszer nem alkalmazható. A Jelölt bizonyította azonban, hogy a CHD és a borkősav rezolválószer között enantioszelektív komplexképződés játszódik le. A képződő polárisabb diasztereomer az (*R,R*)-CHD – (*R,R*)-BS komplex inert hordozón megköthető és mellőle az el nem reagált apolárisabb enantiomer keverék scCO_2 -dal hatékonyan eltávolítható. Az enantiomer keverék (extraktum) a nyomás csökkentése után a

szeparátor oszlopban szilárd terméként válik ki. Az adszorbensen megkötött (R,R)-CHD – (R,R)-BS komplexből (raffinátum) leoldás és megbontás után az (R,R)-CHD enantiomer megkapható. Az adott kísérleti körülmények között a raffinátum enantiomertisztasága 80%, a racémra vonatkoztatott termelés pedig 40-50% körül volt. A Jelölt a sztereoszelektív reakcióban képződő (R,R)-CHD – (R,R)-BS komplexet kipreparálta, szerkezetét egykristályon végzett röntgendiffrakciós vizsgálattal meghatározta. Érdekes azonban, hogy a másik enantiomerben dús termék az (S,S)-CHD – (R,R)-BS diasztereomer képződését a diffrakciós mérések nem igazolták. Bár a rezolválás során elvben mindkét diasztereomer képződhet, rendszerint eltérő stabilitással, a BS azonban, valószínűleg szterikus okok miatt, csak az egyik CHD izomerrel képez komplexet. A diasztereomer rezolválásával kapott termékek 80-80%-os enantiomertisztasága tovább növelhető a 7. fejezetben bemutatott újrarezolválással. Ennek lényege az, hogy az enantiomerkeverék, a racém esetében alkalmazott rezolválószerrel, tovább tisztítható. Ennek értelmében az (R,R)-CHD-ben dús elegyet (R,R)-BS-el, az (S,S)-CHD tartalmú elegyet pedig (S,S)-BS-el reagáltatva 99%-os tisztágú CHD enantiomereket sikerült előállítani.

2. *Rezolválás $scCO_2$ -ban in situ lejátszódó diasztereomer sóképzéssel.* A $scCO_2$ -os extrakció feltalálóinak eredeti elképzelése szerint a szuperkritikus fluidum szerepe csupán az oldhatatlan diasztereomer só és az el nem reagált enantiomerkeverék elválasztására korlátozódik. Az a tapasztalat azonban, hogy az extrakció műveleti paraméterei befolyásolják a rezolválás eredményességét, a Jelöltet annak felismerésére vezette, hogy a rezolválási reakció nem csak a szokásos szerves oldószerekben, hanem magában a $scCO_2$ -ban is lejátszódhat. Kimutatta, hogy az *in situ* diasztereomer sópár képzése legjobb konverzióval akkor megy végbe, ha mindkét reagens jól oldódik a $scCO_2$ -ban. Kielégítően működik azonban még akkor is, ha legalább az egyik reagens jól oldódik, a másik reagens pedig csak éppen kimutatható mértékben oldódik. Rezolválószerként (R)-feniletán-1-amint alkalmazva az *in situ* technikával sikeresen rezolválta az Advil és az Algoflex gyulladáscsökkentő gyógyszerek hatóanyagát az (S)-ibuprofént. Hasonlóképpen sikeresnek bizonyult *in situ* eljárásban az optikailag aktív (S)-2-benzilaminó-1-butanol reagens alkalmazása is a *cis*-permetrinsav továbbá a *cis*-krizantémsav rezolválására (az optikai tisztaság elérte a 99%-ot, szemben a hagyományos extrakcióval elért 28%-os optikai tisztasággal).

3. *Enzimkatalizált kinetikus rezolválás $scCO_2$ -ban.* Ismeretes, hogy az enzimkatalizált reakciókkal kiváló enantiomertisztaságú termékek állíthatók elő. Problémát jelent azonban egyrészt az enzim működéséhez szükséges optimális körülmények (oldószer, hőmérséklet, pH, ionerősség stb.) biztosítása, másrészt pedig, a folyamat végén, a reakcióelegyből a termék kinyerése. Mivel az ipari folyamatokban már régóta bevált, széles körben alkalmazott, lipáz enzimek $scCO_2$ -ban is megőrzik biokatalitikus aktivitásukat, ezért a Jelölt a $scCO_2$ -os extrakció lehetőségét elsősorban a lipáz-katalizált rezolválási reakciók körében vizsgálta. Ismeretes volt, hogy a *Candida antarctica* lipáz B (CALB) enzim segítségével a racém 4-fenilazetidín-2-on (LAK)-ból a β -laktám gyűrű felhasításával és víz addíciójával (R)- β -fenilalanin, (R)-Phe, állítható elő. Az aromás oldalláncot tartalmazó fenilalanin előállításának gyakorlati jelentőségét illetően, kitekintésképpen, érdemes itt rámutatni arra, hogy a β -aminosavak fontos intermedierei a β -laktám antibiotikumoknak (penicillinek, kefalosporinok

stb.) és monomerjei olyan biológiailag aktív vegyületnek, mint például a daganatellenes taxánok. Az α -peptidekbe történő beépítésük pedig módosítja azok szerkezetét, biológiai hatását és növeli a peptid proteolitikus bontással szembeni stabilitását.

A Jelölt az általa konstruált fázisegyensúly-mérő cella segítségével, az ún. opálosodási pont ismeretében, meghatározta a LAK és az (R)-Phe oldhatóságát a scCO_2 -ban; LAK: $>0,40\text{mg/mL}$, (R)-Phe: $<0,015\text{ mg/L}$. Mivel a szubsztrát és a termék oldhatósága közel egy nagyságrenddel különbözik egymástól, így az el nem reagált LAK a reaktorból scCO_2 -al eltávolítható, az (R)-Phe pedig az enzimmészítmény felületére tapadva visszamarad. A felületről a termék meleg vízzel lemosható és ee $>98\%$ -os enantiomertisztasággal kinyerhető. Pufferoldattal való mosás után, az enzimmészítmény újrafelhasználáskor eredeti aktivitásának 80-85%-át visszanyerte. Az Értekezés részletesen foglalkozik az enzimreakcióban elért konverzió hőmérséklet- és nyomás függésének vizsgálatával. Azt a tényt, hogy a konverzió maximuma az alkalmazott nyomástól függetlenül minden vizsgált esetben $70\text{ }^\circ\text{C}$ -on van egyrészt az anyagátbocsátási folyamatok jellemző paramétereinek (diffúziós együttható, viszkozitás, Schmidt-szám), másrészt a többféle okra visszavezethető denaturálódás enzimaktivitásra gyakorolt hatásával értelmezi.

4. *Diasztereomer sóképzésen alapuló rezolválás szén-dioxid kicsapószerrel.* A diasztereomer sópár képzésen alapuló rezolválás során a már nem racém (ún. szkalemikus) elegy enantiomerdúsítását általában többszörös átkristályosítással végzik. Az eljárás oldószer felhasználása valamint a kapott kristályos termék enantiomertisztasága és morfológiája kedvezően befolyásolható azonban az ún. antiszolvens diasztereomer só kicsapásán alapuló rezolválási technikával. A diasztereomer só kicsapódása a rezolváláshoz használt poláris szerves oldószerből azért következik be, mert scCO_2 bediffundál az oldószerbe és jelentősen csökkenti annak polaritását. Ennek következtében az oldatban megindul a gócképződés és a kristályok növekedése. A nyomás csökkentés hatására az oldószer és az antiszolvens szerepét betöltő scCO_2 eltávozik, a kristályos diasztereomer só pedig a reaktorban marad.

A Jelölt a gáz antiszolvens módszerrel végzett rezolválás hatékonyságát vizsgálta az alábbi racém sav – amin rezolválószer tartalmazó rendszerekben: a gyulladáscsökkentő ibuprofén – (S)-2-fenil-glicinol, a permetrinsav növényvédőszer-család szintézisében szerepet játszó cis-permetrinsav – (R)-feniletilamin valamint a kozmetikai iparban alkalmazott mandulasav – (R)-feniletilamin, a 4-klórmandulasav – (R)-feniletilamin és a metoxi-mandulasav – (R)-ciklohexán-1-amin. A rezolválást célszerűen az ún. módosított Pope és Peachey-féle eljárás szerint végezte, minden esetben fél ekvivalens mennyiségű rezolválószer alkalmazásával (az eredményeket a 6.1 táblázat részletesen szemlélteti). Mivel a vizsgált rendszerben itt a scCO_2 mellett szerves oldószer is jelen van, ezért a Jelölt részletesen vizsgálta a két oldószer molarányának (R) a diasztereomertisztaságra és a hozamra gyakorolt hatását. A különböző nyomásokon végzett kísérletsorozatot másfajta szerves alkoholok alkalmazásával is elvégezte. Megállapította pl., hogy az ibuprofén – (R)-feniletilamin rendszer esetén a diasztereomertisztaság alapvetően a szerves oldószer minőségétől függ és legalkalmasabb oldószernek az etanol bizonyult. A diasztereomer só hozama a 6.8 ábra szerint $R = 8$ molarányig 0, majd 11-ig folyamatosan nő, ezután pedig széles molarány tartományban 70-80 százalék körül állandósul.

Kérdések

1. Minden racém elegyhez „testreszabott” speciális rezolválószerre van szükség. Létezik-e olyan tapasztalati adatbázis vagy molekulamodellező szoftver, amely a még nem vizsgált racém elegyek estén segítheti a kutatót az alkalmas reagens kiválasztásában? Foglalkoztak-e már ezzel kapcsolatban a diasztereomer képzés termodinamikai (főleg oldatkalorimetriás) vizsgálatával?
2. Az enzimek aktivitásának és főleg szelektivitásának fenntartásában fontos szerepet játszik a rendszerben a víz termodinamikai aktivitása. Foglalkozott-e a Jelölt azzal a kérdéssel, hogy scCO_2 oldószer esetében a víz hiánya milyen mértékben hat az immobilizált enzim aktivitására?
3. Előfordult-e a munka során az a helyzet, hogy a rezolváló reagens tömegegységre vonatkoztatott ára nagyobb volt, mint a vele előállítani kívánt enantiomer ára?
4. A vizsgált scCO_2 -os technológiákhoz alkalmas-e a Répcelakon kitermelt szén-dioxid vagy a Jelöltnek ezekhez speciális minőségű gázra volt szüksége, pl. Linde, Messer stb.?
5. Az evolúcióbiológia kutatóit régóta foglalkoztatja az a kérdés, hogy az első szerves molekulák abiotikus szintézise során képződő racém elegyben miért kerülhetett túlsúlyba aminosavak esetében az L-, a cukroknál pedig a D-enantiomer, ami végső soron homokirális biopolimerek (fehérjék, nukleinsavak) létrejöttét eredményezte? Mivel ez a kérdés nem kapcsolódik szorosan az Értekezés kitűzött céljához, ezért a Bíráló *erre a kérdésre nem vár választ*, legfeljebb amennyiben van, akkor a Jelölt véleménye érdekelné.

Állásfoglalás

A fentiek alapján megállapítom, hogy a Székely Edit kutatómunkájáról szóló Értekezés a vegyészmérnöki tudomány, a szintetikus gyógyszer kémia, a kísérlettervezés és a műszeres analitika kémia területén megszerzett figyelemreméltóan magas szintű tudásról tesz tanúságot. Az írás tartalmi és formai szempontból, továbbá a publikációs tevékenységet illetően is, eleget tesz az MTA doktori fokozat megadásához szükséges feltételeknek. Az Értekezés Téziseit elfogadom. Javaslom, az MTA Doktori Tanácsának az Értekezés nyilvános vitára bocsájtását, és sikeres védelem esetén ezúton is támogatom az MTA doktori fokozat odaítélését.

Veszprém, 2020. április 21.

Dr. Marton Aurél

egyetemi tanár