Szabó Pál

„Kvantitatív LC-MS alapú analitikai stratégiák komplex rendszerek vizsgálatára"

című MTA doktori értekezésének bírálata

Bírálatom egy rövid történeti áttekintéssel kezdem, amelynek a Jelölt is szerves részét képezi. Az atmoszférikus nyomású ionforrást alkalmazó HPLC-MS és MS/MS nagyműszerek több gyártó által az 1990-es évek elején történő piaci bevezetése számos tudományterületen - a teljesség igénye nélkül - pl. gyógyszeranalitika, növényvédőszermaradványok, mikotoxinok analitikája, kábítószer analitika, doppingszerek analitikája, peptidek, fehérjék tömegspektrometriás vizsgálata jelentős áttörést eredményezett. Utóbbiért, azaz a fehérjék ESI-MS vizsgálati eljárásának kidolgozásáért J.B. Fenn professzor 2002-ben kémiai Nobel díjat kapott. Magyarországra 1993 végén és 1994 őszén Szegedre érkezett az első két „elektrospray" ionforrással felszerelt HPLC-MS készülék, az első HPLC-MS a Gabonakutatóba, ahol a Bíráló is dolgozott, majd utána egy HPLC-MS/MS az Egyetem Orvosi Vegytani Intézetébe, ahol a Jelölt már a műszer üzembehelyezését követően bekapcsolódott az aminosavak, peptidek, fehérjék HPLC-MS/MS vizsgálatába. Az atmoszférikus nyomású HPLC-MS/MS eljárások fejlesztésével, a különböző vegyületcsoportok kvantitatív mérési eljárásainak kidolgozásával már több mint 30 éve foglalkozik. A Jelölt ennek a szerteágazó kutatómunkának főként az utóbbi 10 évben publikált eredményeit foglalja össze értekezésében. Az értekezés 28 nívós szaklapokban megjelent közleményen alapul, amelyeknél a Jelölt 1 közleményben első ill. 9 közlemény esetében utolsó szerző. A 28 közleményből 27 az utóbbi 10 évben került közlésre. Az előzőekből következik, hogy a Jelölt az egyik legnagyobb tapasztalattal rendelkező tömegspektrometriás szakember az országban. Ezért nem meglepő, hogy számos külső szakmai partner is megtalálta tömegspektrometriás feladatokkal, főként HPLC-MS/MS módszerek kidolgozásával és rutin vizsgálatok elvégzésével, amely vizsgálatok jelentős publikált eredményeket hoztak. A 174 oldalas értekezés felépítése nem hagyományos, nem szerepel benne külön „Irodalmi áttekintés", valamint „Anyag és módszer" fejezet, hanem ezek helyett egy „A kutatási terület háttere" és az „Alkalmazott analitikai műszerek" című fejezetet alkalmazza, valamint az „Eredmények és értékelésük" fejezet is tartalmaz több olyan metodikai részletet, amelyeket a Jelölt dolgozott ki az adott mintákra ill. minta mátrixokra. Az értekezés első kézbe vételét követően ez kicsit furcsának tűnt a Bíráló számára, azonban az értekezés elolvasását követően az

fogalmazódott meg bennem, hogy ez volt a jó megoldás, ilyen szerteágazó minták HPLC-MS/MS vizsgálati eljárásainak kidolgozását és mérési eredményeit tárgyaló értekezésben. A Jelölt is megjegyzi, hogy az alkalmazott módszerek részletes leírása meghaladta volna az értekezés terjedelmi korlátját.

Az értekezés részletes áttanulmányozását követően az alábbi megjegyzéseket szeretném tenni:

1. A 3. oldalon a Jelölt a 2002-es kémiai Nobel díj esetében két személyt említ, azonban hárman kapták megosztva (Kurt Wüthrich a harmadik személy, aki a fehérjék háromdimenziós szerkezetének NMR vizsgálati eljárással történő meghatározásáért kapta a Nobel díjat). A díj egyik felét J.B. Fenn és K. Tanaka professzorok, a másik felét K. Wüthrich professzor kapta.
2. Az elektron ionizáció során jó lett volna megemlíteni a 70 eV-os ionizációs energiát, amely alapján készültek az ún. 70 eV-os gyári spektrumkönyvtárak (pl. NIST, Wiley), amelyek eredményesen használhatók gyártótól függetlenül a mintákban lévő ismeretlen komponensek azonosítására, különösen a kis móltömegű illékony, vagy származékképzési reakciókkal illékonnyá tehető komponensek GC-MS vizsgálatai során, ahogy a Jelölt is megemlíti. Ettől eltérően, az atmoszférikus nyomású ionizációt alkalmazó HPLC-MS/MS vizsgálatok során kapott tömegspektrumokat jelentősen befolyásolja a készülék típusa és a mérési körülmények.
3. Az ESI és APCI mellett az atmoszférikus nyomású fotoionizációt (APPI) - még ha a Jelölt nem is alkalmazta a vizsgálatai során - jó lett volna megemlíteni. Az APPI eljárásra egy kérdés erejéig a későbbiekben még visszatérek.
4. A Jelölt említi, hogy „Az elektroporlasztás során az eluens egy kapillárison áramlik át, amelyre nagyfeszültséget (1000-5500 V) kapcsolnak". Ez számos gyártó elektroporlasztásos ionforrásánál így van (a Jelölt által felhasznált Sciex gyártmányú tömegspektrométereknél is), azonban pl. az Agilent és a Bruker tömegspektrométerei nagy részénél a porlasztó és a benne lévő kapilláris föld potenciálon van.
5. A 20. oldalon írt szilárdfázisú extrakcióval kapcsolatban szeretném megjegyezni, hogy az is SPE extrakció, amikor a mérendő komponensek

áthaladnak az SPE oszlopon és a mérést zavaró mátrix komponensek maradnak fent.

6. Az értekezésben számos alkalommal „poláros" és „apoláros" megjegyzés szerepel, többen alkalmazzák így, azonban véleményem és mások véleménye szerint is a poláris és apoláris a helyes.
7. A Jelölt az 5. fejezetben a 43. oldalon írja „Különösen az elektrospray ionizáció jelentett áttörést, mivel nemcsak a kis molekulatömegű, klasszikus szerves vegyületek ionizálását tette lehetővé..." Az elektrospray eljárás ún. preformált ionokat igényel az ionforrásba vezetve, ellentétben az APCI és APPI ionforrásokkal az ESI ionforrásban „csak" a preformált ionoknak folyadékfázisból gázfázisba történő átjutása történik.
8. A 73. oldalon a váltószelep „B" pozíciójában az egyik folyadékút nincs berajzolva.
9. A 110. oldalon az 5.2.1.2 fejezetben az aminosavak elválasztásával kapcsolatban írja a jelölt, hogy „A probléma megoldásának kulcsát az RX-Sil oszlop jelentette, amely HILIC módban alkalmazva mind a 20 fehérjeépítő aminosavat megfelelő visszatartással és egymástól jól elválasztható módon tudta kezelni". Az elválasztás a 63. oldalon a 16-os számú ábrán van bemutatva. Az aminosavak elválasztása az ábrán közel sem tökéletes, 6 esetben is koelúció történt. Az ábrán jól látható, hogy csak a Trp, a Ser, a Gly és a Pro eluálódott jelentős átfedés nélkül. A Jelölt persze helyesen kihasználta a tömegspektrométer általi szelektivitás növelés lehetőségét, melynek felhasználásával az egy kromatográfiás csúcsban koeluálódó komponensek is szelektíven kiértékelhetők. Persze az más kérdés, hogy az esetleges koelúció milyen hatással van az egyes komponensek jelintenzitására a vizsgált biológiai mintákban... A fehérjeeredetű aminosavak esetében alapvonal elválasztást csak ún. oszlop előtti származékképzési reakciók után lehet kapni C18-as RP-HPLC oszlopon (pl. Bartók és mtsai, J. Liquid Chrom. 1994, 17: 4391-4403). Ma már a legtöbb korszerű HPLC rendszer automata mintaadagolója a gyors származékképzési reakciókat automatikusan képes elvégezni.
10. A IUPAC szerint az elem jeleket (pl. N, O) nagy dőlt betűvel kell írni, ha helyzetjelölőként (lokánsként) használjuk azokat. A tömeg/töltést kis dőlt betűvel kell írni (*m/z*). Tudományos szövegekben az in vivo és in vitro kifejezéseket kis dőlt betűvel kell szedni (*in vivo*, *in vitro*). A növények és állatok latin neveit is dőlt betűvel kell írni.

11. A bíráló is gyakran használja a laboratóriumi szlengben a „blank minta, blank oldószer" elnevezést, azonban magyar nyelvű tudományos munkákban a „vak minta, vak oldószer" a helyes.
12. A 169. oldalon az F1 és F2 táblázatok címében elütések vannak.

Kérdéseim a következők:

1. A Jelölt eljárást dolgozott ki 480 szermaradvány HPLC-MS/MS vizsgálatára, amely eljárást a Bálint Analitika Kft. és az SGS Kft. is sikeresen alkalmaz. A módszer kidolgozása során és a gyakorlatban milye belső standardokat alkalmaztak/alkalmaznak? Ezen sokmintás napi rutin vizsgálatok során a belső standardok alkalmazás igen fontos, mert a műszer érzékenysége, mint tudjuk napon belül változhat.
2. A Sciex tömegspektrométerekhez vásárolható APPI ionforrás (PhotoSpray néven). Rendelkeztek-e ilyen ionforrással és ha igen végeztek-e összehasonlító vizsgálatokat a származékképzetlen szteroidok ESI, a származékképzett szteroidok ESI (az értekezésben alkalmazott eljárás) és a származékképzetlen szteroidok APPI ionforrások felhasználásával kapott HPLC-MS/MS módszerek között? Ha végeztek ilyen vizsgálatokat mi volt a végső konklúzió. Ezen kérdésemet azon kíváncsiság okán teszem fel, hogy lehetségesnek tartja-e, hogy APPI ionforrást alkalmazva hasonló vagy jobb jel/zaj viszonyt érjünk el a származékképzetlen szteroidok esetén, mint ugyanazon szteroidok származékképzést követő HPLC-ESIMS/MS vizsgálatával.
3. A Jelölt a 97. oldalon a favipiravir HRMS vizsgálatával kapcsolatban említi, hogy dimerek sorozata volt megfigyelhető a mintákban és a teljes anyagmérleg pontos meghatározása azonban csak akkor lehetséges, „ha az azonosított szennyezőket izolálják vagy kereskedelmi forgalomból beszerzik, és valódi kalibrációs módszerrel határozzák meg azok abszolút koncentrációját". Megoldás lehetne a problémára, qNMR eljárással meghatározni a főkomponens melletti szennyezőket, ha az NMR-es szakember meggyőződött arról, hogy az 1D és 2D NMR spektrumokban nincs jel átfedés?
4. A 111. oldalon a fermentációs mintákból történő aminosav meghatározással kapcsolatban kérdezem, hogy nem lett volna-e megoldás az is, ha izotópjelzett belső standardokat alkalmaznak? Bár gondolom, ez nem egy költséghatékony megoldás 20 aminosav esetén...

5. A Jelölt sikeresen alkalmazta a mérésen belüli többszöri polaritásváltást is. A gyakori, gyors polaritásváltás nem okoz/okozhat problémát a tömegspektrométer elektronikájában? Bár növeli az egy mintára eső analízis időt, nem célszerű-e a mintákat, ha szükséges, pozitív és negatív ion módban külön megmérni?

A 6 tézispontból 4-et változtatás nélkül elfogadok, az I-es és III-as tézispontokat csak részben. Az I.1-es tézispont első felében említett 480 peszticid egy injektálásból történő HPLC-MS/MS meghatározására kifejlesztett sMRM módszert már több közleményben is leírták, akár több mint 480 komponens esetén is. Visszautalok a kérdéseim egyikére, amennyiben a Jelölt mutatta ki először, hogy a prediktív MRM vizsgálatok során a szerkezeti interferenciák által okozott megtévesztő eredmények nagyfelbontású tömegspektrometriával feloldhatók, akkor elfogadom új eredményként. Ugyanakkor megjegyzem, hogy a Jelölt téziseiben szereplő közlemények között nincs ezzel kapcsolatos publikáció, amely ezen módszerfejlesztés újdonságát jelezné. A III-as tézispontból a 2-es alpontot nem fogadom el új eredményként, mert mind a mintaoldó erőssége csökkentésének és így a nagyobb injektálható mintatérfogatnak, valamint a mikro- és kapilláris LC technikák érzékenységnövelő hatása ismert jelenségek.

Véleményemet összefoglalva megállapítom, hogy a Jelölt több mint 30 év alatt jelentős tudásra tett szert a HPLC-MS/MS technika terén is, számos eljárást dolgozott ki különböző szerves vegyületek kvalitatív és kvantitatív meghatározására, amelyeket eredményesen alkalmaztak mind a biológiai és orvosi alap- és alkalmazott kutatásban, valamint az iparban is. Szakmai tevékenysége jelentősen hozzájárult a HPLC-MS és MS/MS technika hazai elterjedésében. Ezek alapján javaslom az MTA Doktori Tanácsának a nyilvános védés kitűzését és sikeres védés esetén az MTA Doktora cím odaítélését.

Szeged, 2026. október 15.

Bartók Tibor
az MTA doktora