

HIVATALOS BÍRÁLAT

Dr. Gáspár Attila

„Elektroforetikus elválasztások fejlesztése kapillárisban és mikrocsipben”

címmel elkészített akadémiai doktori értekezéséről

Dr. Gáspár Attila, doktori értekezését 147 gépelt oldalon készítette el, és azt 2014-ben 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 összefoglaló* 14 oldal, *Célkitűzés* 1 oldal, *Alkalmazott készülékek és módszerek* 2 oldal, *Eredmények és diszkusszió* 99 oldal, *Összefoglalás* 9 oldal, *Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények* (listája) 4 oldal, *További saját közlemények kapilláris elektroforézis témakörben* (listája) 2 oldal, *Az értekezésben felhasznált irodalom* 8 oldal. Az értekezés 84 ábrát és 7 táblázatot tartalmaz.

A dolgozat formailag megfelel a doktori értekezéssel támasztott követelményeknek. Az egyes fejezetek aránya ugyanakkor érdekes tagoltságot tükröz. A *Bevezetés* céltudatosan helyezi bele az olvasót a dolgozat témájába, amelyben a jelölt kijelenti, hogy „legfontosabb feladatnak a mikrofluidika analitikai tárgyú kutatásának hazai megerősítését és továbbvitelét” tartja. Az *Irodalmi összefoglaló* alapvetően megfelelő módon, nagy hozzáértéssel bemutatja a kapilláris elektroforézis, és annak „újkori” formájának, a mikrochip elektroforézisnek azon területeit, amelyben munkáját végezte, azonban ez az összefoglalás többször kiegészül más fejezetek előtt található, az adott témához kapcsolódó rövidebb-hosszabb áttekintéssel. A *Célkitűzés* fejezet hat rövid pontban foglalja össze az elvégzett feladatok terveit. A nagyon tömör *Alkalmazott készülékek és módszerek* fejezet részben utal arra, hogy az értekezés témája egyúttal eszköz- és módszerfejlesztés, amelyek ez esetben az eredményekhez sorolhatók inkább. Az *Eredmények és diszkusszió* az értekezés leghosszabb része, amely szisztematikusan, de eléggé tagoltan összegzi a kísérleti eredményeket, amelyeket helyenként irodalmi és elméleti háttérrel előzetesen kiegészített a jelölt. A kísérleti munka két fő területét, a konvencionális kapilláris elektroforézissel, illetve a mikrochipekkel folytatott tanulmányait két, jól elválasztott alfejezetre bontja, ugyanakkor a két fejezetben bemutatott alkalmazások egymást jól kiegészítik. Meg kell jegyezni, hogy a saját közleményekre történő hivatkozás szövegen belüli hiánya a megértést kissé körülményessé teszi, elsősorban ott, ahol a szöveg és a megadott ábra vagy táblázat nem tartalmazza megfelelő részletességgel az eredmények megvilágításához szükséges összes információt. Az *Összefoglalásban* végül nagyon határozottan, didaktikusan vezeti az olvasót végig az elvégzett munkát egységbe foglaló terveken, az eredményeken, és a levonható következtetéseken.

Az analitikai kémiai kutatások területe folyamatosan a szakmai értékelés és elfogadottság tűzvonalaiban található. Nagyon érdekes azt hallani és megélni, hogy az

analitikai kémia igazából csak egy alkalmazott tudományterület, akár a szakmai alapelvek tekintetében, akár a kapott eredmények tekintetében. Különösen érdekes ez azokban az esetekben, amelyeknél a vizsgált szubsztancia megnevezése, annak jellemzése az analitikai kémia kutatási háttere nélkül lehetetlen lenne. Az elválasztástechnika, mint tudomány ebben a sajátos helyzetben van. A legfontosabb analitikai feladat egy-egy anyag mennyiségi és minőségi meghatározása, jellemzése szempontjából az illető rendszer elválasztástechnikával végrehajtott elemzése. Éppen ezért, ezen a területen dolgozni és kutatni alapvető fontosságú. Nagyon sok szempontból az analitikai kémia új irányt kapott. A környezeti kérdések, az egyre kisebb mennyiségekkel, egyre kisebb térfogatokban végrehajtandó analízisek előtérbe helyezték a miniatürizálással kapcsolatos feladatokat. Mindenezen szempontok alapján megállapítható, hogy a jelölt egy olyan területen kezdett el dolgozni, amelynek fontossága tagadhatatlan, és amelyben az innovatív, új fejlesztési ötletek, és kidolgozott alkalmazások folyamatosan szükségesek.

Gáspár Attila értekezésével, és kutatómunkájával igazolta, hogy a kapilláris elektroforézis, olyan terület, amelyben dolgozva sikeresen lehet új célokat megfogalmazni, és amelyen belül az alkalmazások kidolgozása szükségszerűen új eredményekhez vezet.

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

A jelölt az – általa is megfogalmazott – tizennégy év alatt, a mikrofluidikai, elsősorban elválasztástechnikai kutatások hazai és nemzetközi szempontból is elismert kutatójává vált. Ezt jelzi a több mint 490 független hivatkozás ezidő alatt, és az összesen kapott több mint 840 független hivatkozás (az ISI adatai alapján). Az értekezést kétféle szempontból lehet értékelni. A módszerek kiválasztása, és alkalmazásának továbbfejlesztése szempontjából milyen eredményeket ért el a jelölt, illetve a kifejlesztett módszerekkel, eszközökkel sikeresen tudott-e felelni a feltett tudományos kérdésekre. Meg kell állapítanom, hogy jelölt munkája e két szempontból megfelel a követelményeknek.

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

Néhány formai megjegyzés.

A gépelt értekezés gyakorlatilag hibamentes, összesen talán csak 4 vagy 5 betű- vagy vesszőhiba ütötte meg a szememet, s remélem, nem vet az opponensre árnyékot, hogy többet nem talált (8. o. „... segítségével egyfajta ...”, 29. o. „... legalább ...”, 39. o. „... eltérést ...”, 129. o. „... áramlás ...”). Az ábrákkal kapcsolatban ugyanakkor bizonyos következtetéseket találtam, amelyek elsősorban abból adódhattak, hogy a magyar szöveget nem egységesen használta, valamint nem ragaszkodott egységes logikához. Több esetben az ábraalírások nem tartalmaztak korrekt kísérleti körülményeket, vagy hiányoztak, amely miatt az adott ábra esetleg nem is volt értelmezhető. Ezekben az esetekben az adott fejezethez megadott saját hivatkozásokban (közleményekben) megtalált ábra segítette a pontos értelmezést. Az ábrákon található jelölések is esetenként (pl. 20. ábra) csak a hozzá tartozó közlemény alapján volt egyértelműsíthetők. A bíráló elkészítése közben az egyik

legérdekesebb, s talán nem is egyszerűen eldönthető formai kérdés az volt, hogy a jelölt milyen szakkifejezéseket használ. Ellentmondásosnak tűnik, hogy a chip – csip írásmód „erőltetésével” szemben – legalábbis az opponens ezt érzi – bizonyos angol szakkifejezéseket azok magyarított változatában használja a ténylegesen magyarul is használható fogalmak helyett. Így a két, témához tartozó legfontosabb kifejezést: *szeparáció* és *migráció*, sokkal jobb lett volna az *elválasztás* és *vándorlás* szavakkal helyettesíteni. A „dugó” kifejezés használata kétféle formában is előfordul az értekezésben. Egyrészt az EOF „dugószerű” profiljával kapcsolatban (amely esetben a „dugattyúszerű” profil pontosabb lenne), másrészt, és ezt alapvetően cseréltem volna, a kapillárisba, illetve mikrochip csatornába bejuttatott mintazóna helyett használt „mintadugó” kifejezésben. Amennyiben egy *dugó* front- és zárófelülete síknak inkább tekintett, mint görbült felületnek, akkor a jelölt által is bemutatott mintazónák (pl. 38. és 45. ábrákon) semmiképpen sem „mintadugó”-nak írhatók le. Ez a hidrodinamikai áramlásokkal kapcsolatos kísérletek esetén egyértelműen jobb lett volna.

A tartalommal kapcsolatos észrevételek.

A jelölt egyik fő kutatási területe a mintainjektálással kapcsolatos problémák vizsgálata volt. Részletezi az EOF, valamint a minták mozgékonyságában jelentkező különbségek miatt az elektrokinetikus injektálás során bevitt anyagmennyiség meghatározhatóságát. Hasznos lett volna ugyanakkor a jelenséget a pH függésében, illetve EOF hiányában is tárgyalni, hiszen a kapilláris elektroforézis során nagyon sokszor éppen fedett kapillárisban, vagy akár gélben dolgozunk, ahol nincs endozmózis.

Mi lehet a magyarázata a 10. ábrán látható vándorlási sorrendnek, amelyben a ciszteinnel képzett higany-II komplexek részben más relatív mozgékonyssággal jelentkeztek, mint a többi komplexképző esetén, az adott pH-n (pH=9.2)?

A 14. ábrán bemutatott micelláris elektrokinetikus kísérlettel bemutatott Gd-komplexek esetén nem teljesen tudok egyetérteni azzal, hogy a $[Gd(BOPTA)]^{2-}$, és a $[Gd(DTPA)]^{2-}$ komplexek átlagos vándorlási sebessége nem különbözik egymástól SDS jelenlétében és anélkül, még akkor sem, ha a két komplex sorrendje azonos is marad.

A mintaelőkészítés nélküli mintabevitel, bár nagyon előnyös lenne, csak nagyon ritkán valósítható meg. Ezért ezt a kérdést én csak óvatosan közelíteném meg, hiszen mintaelőkészítésnek vehető már egy egyszerű hígítás is, nem szólva arról, ha bármilyen (akár egy „egyszerű” belső standard) komponenst adagolunk a valós mintához. Esetenként egyenesen szükségesnek érzem a mintaelőkészítést, így például hasznos lett volna az emberi testfolyadékokban történő nitrát meghatározás esetén valamilyen baktérium-működést gátló (a nitrát-redukciót megakadályozó) körülmény biztosítása, ezzel elősegítve a mennyiségi meghatározás pontosságát, és vizsgálat tényleges végrehajtásának idejétől való függetlenséget.

A kefalosprinokkal kapcsolatos vizsgálatokban a 270 nm-en valóban relatíve nagy ezen molekulák abszorpciós együtthatója, de épp a fehérjékre jellemző, hasonló hullámhosszon található elnyelési maximum esetenként zavaró lehet.

A 23. és 33. ábrák aláírásában egy-egy korábbi ábrán megadott kísérleti körülményekre hivatkozik. Ezen körülmények pontosítása szükséges, miután a vándorlási idők, ugyanazon vegyületekre sokkal kisebbek (23. ábra), illetve nagyobbak (33. ábra), mint a hivatkozott körülmények között. Ugyanakkor a bemutatott elválasztások hatékonyságát és

használhatóságát, vagyis következtetések levonását ezek a különbségek természetesen nem befolyásolják.

A 27. ábra különböző pH-kon történő kísérletsorozata nyilvánvalóan nem történhetett csak egyféle (a jelzett szöveg alapján: foszfát) puffer alkalmazásával.

A mintaelőkészítés szükségtelenségét elegánsan mutatta be a cefalexin (az egyik kefalosporin) pK-jának meghatározása során. Ez a módszer ennek alapján lényeges kitekintést nyújthat más anyagok vizsgálatára is.

A mikrochipekben történő injektálással kapcsolatosan a jelölt sikeresen alkalmazta a *split* injektálást. Bemutatta, hogy a sikeresen lehet, akár 10 mm-es elválasztási hosszon megfelelő felbontást elérni. Kérdésem ugyanakkor, a 48. ábrán bemutatott elválasztások esetén, hogy hogyan magyarázza az elválasztás detektálási távolságának hossz-növekedése esetén azt, hogy az elválasztott komponensek csúcshossza kisebb, mint rövidebb detektálási távolság esetén.

Elegáns, és hatékony miniaturizált kapilláris elektroforézis rendszerben sikeresen bemutatta a kefalosporinok elválasztását, mely kísérletek továbbfejlesztése szükséges úgy a detektálás, mint az elektrooszmózist befolyásoló felületkezelés területén.

A kromatográfiás, illetve elektrokromatográfiás töltetek alkalmazásához, oszlop-töltéshez kifejlesztett, illetve tanulmányozott jelenségek fontosak a homogén elválasztó-rendszerek hatékonysága szempontjából. Ugyanakkor a jelölt által megadott utalás a „kemény falú” kapillárisokban (csatornáknál) ún. „üres tér”, véleményem szerint nem pontos. Nem valószínű, hogy ténylegesen „üres” tér jönne létre azokban az esetekben, esetleg csak nagyobb, az elválasztás szempontjából csak háttélektrolitot (eluent) tartalmazó térfogatokat lehet tapasztalni a „puha falú” PDMS csatornákkal szemben.

A több csatornát tartalmazó mikrochipek esetén a jelölt megfelelően alkalmazta, illetve részletesen (elméleti számításokkal is alátámasztva) bemutatta, hogy egy többcsatornás elválasztás során egy kísérlettel meghatározható a kromatográfiás töltetet jellemző *van Deemter* összefüggés. Kérdésem ezzel kapcsolatban, milyen okokra vezeti vissza a zónák vándorlása során tapasztalható, viszonylag erős diszperziós hatást?

S idetartozik egy, az opponensnek korábbi tapasztalatai alapján is előkerült fogalmi tisztázás. A kromatográfiás elválasztásoknál elő-előkerül a „kromatográfiás kölcsönhatás”, mint fogalom. A valóságban ez a fogalom, annak ellenére, hogy – sajnálatosan – használatban van, definiálhatatlan. A kémiai kölcsönhatások valóban fontosak a kromatográfiában, de ezek attól nem lesznek „kromatográfiás kölcsönhatások”.

Az értekezésben felsorolt hivatkozásokkal kapcsolatban javasolható lett volna, hogy kevesebb review-szerű, esetleg tankönyvi referenciát adjon meg a jelölt, valamint az internetes honlapok helyett, amelyek könnyen változnak, szakmailag hitelesíthető referenciák (közlemények) legyenek megadva. Hiányoltam néhány alapvető hivatkozást, amelyek a tartalomhoz szükségesek lehettek volna, mint például az EOF kiküszöbölésének alapvető módszerére történő hivatkozást, vagy a „*monolit*”-ok leírásánál az elsőként leírt elválasztórendszerre történő hivatkozást.

A jelölt, kutatásai során szerteágazó, de mégis egységes képet mutatott be az elválasztástechnikák során alkalmazható modern, hatékony és miniaturizálásra alkalmas módszerekkel kapott munkájáról. Bemutatta a technika három legfontosabb területén, a mintabevitel (mintainjektálás), az elválasztás megvalósítása, valamint a detektálási módszerek használata során új, elméleti alapokkal alátámasztott eredményeit. Részletesen tárgyalta az elektrokinetikus és a hidrodinamikus injektálás során felmerülő problémákat, és azokra megoldásokat dolgozott ki. A mikrochipekben végrehajtható injektálás során sikeresen ötvözötte a mechanikai zárás lehetőségét. Olyan új kísérleti körülményeket dolgozott ki, amelyek alkalmasak voltak szervetlen és szerves vegyületek, egyúttal standard és valós mintákban található anyagok elektroforetikus és kromatográfiás elemzésére. Ezek a kísérleti körülmények felhasználhatók további anyagok elemzésére alkalmas körülmények kidolgozására. A jelölt bemutatta, hogy az általuk kifejlesztett miniaturizált készülék, kombinálva megfelelő detektálással alkalmas felületi adszorpciós vizsgálatokra.

A tudományos vitában az alábbi kérdéseket teszem fel a jelöltnek

1. Lehetséges-e használni a 21-es egyenletet amfoter vegyületekre, amelyek ugyanakkor esetleg még méretükben is lényegesen különböznek?
2. Lehet-e a *split* injektálást kombinálni az elektrokinetikus injektálással? Elképzelhető-e az, hogy egy ilyen módszerrel azonos csatornaméret arányok, és azonos mintatérfogat mellett is lehet különböző méretű mintazonát bejuttatni az elválasztó térbe? Természetesen az EOF-nek a hatását az elektrokinetikus injektálásnál figyelembe kellene venni, vagy ki kellene küszöbölni.
3. A monolitok alkalmazása (melyeket az első, ilyen elválasztási rendszert elkészítő Stellan Hjertén „*continuous bed*”-ként határozott meg) kiküszöböli a különböző méretű és geometriájú kromatográfiás részecskék (gyöngyök) oszlopba való töltésekor előálló problémákat. Milyen jelentőségűnek látja a jelölt azt, hogy az általa is használt kromatográfiás részecskék alkalmazása helyett a mikrochipben *continuous bed*-et, azaz monolitokat alkalmazzon?
4. Már megjelentek az első, 3D-nyomtatóval készített mikrochipek. Látja-e a jelölt annak lehetőségét, hogy az elektroforetikus, vagy kromatográfiás mikrochipek készítése a 3D nyomtatással felválthatja-e a jelenleg bonyolult chip-készítési technikát? Szélsőséges esetben akár a csatornában található, nem folyadék komponensek 3D nyomtatással történő elkészítése is lehetséges-e?
5. Milyen mintaelőkészítési módszereket tud javasolni, illetve mely előkészítési lépéseket látja „elfogadhatónak”, amelyek még nem nehezítik meg lényegesen a kapilláris elektroforézis során a „direkt mintainjektálás”-t?

Megállapítom, hogy jelölt az értekezésben leírt munkát magas színvonalon, a kitűzött céloknak megfelelően, és következetesen hajtotta végre. Munkájával alátámasztotta, hogy a kapilláris elektroforézis módszerek alkalmazása során elméleti és gyakorlati módon sikeresen kifejleszthetők új analitikai rendszerek.

A jelölt tudományos eredményeinek ismerem el a következőket.

1. Elektrokinetikusan injektált különböző vezetőképességű minták esetén megállapította, hogy a mért áramerősség értékek megfelelő korrekciós tényezőket szolgáltatnak *külső kalibrációs eljárás*hoz, valamint egy *belső univerzális kalibrációs eljárást* dolgozott ki.
2. Különböző szervesetlen vegyületek, elemek különböző specieszeinek, valamint komplexeinek meghatározására kapilláris zónaelektroforetikus (CZE) és micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfiás (MEKC) módszereket fejlesztett ki.
3. Biológiai minták vizsgálata során kefalosporin antibiotikumok elválasztására nagy pontosságú és alacsony kimutatási határt elérő CZE módszert fejlesztett ki, valamint gyorsan bomló hatóanyagok (*temozolomid*) elemzésére gyors MEKC módszert fejlesztett ki.
4. Új, folyadékmegosztás elvén (*split*) alapuló, hidrodinamikus injektálást dolgozott ki a meghatározott geometriájú csatornák alkalmazásával mikrochipeken, nl-es térfogatú mintabevitelre. A módszert alkalmazta zónaelektroforetikus elválasztásokra.
5. Megoldotta a kapilláris elektroforézis és a felületi plazmon rezonancia spektroszkópiát (SPR) mikrochip alapú kapcsolását, és így nl térfogatú minták elemzését.
6. Mikrofluidikai csipekben alkalmazható mágneses szelepet fejlesztett ki.
7. Kromatográfiás és elektrokromatográfiás elemzéseket dolgozott ki egy és többcsatornás mikrochipekben, amellyel szerves komponensek elválasztását, dúsítását és tisztítását végezte.
8. Bemutatta, a mikrochipek, különösen a több, párhuzamos elválasztásra lehetőséget adó rendszerek esetén lehetőség van az elektroforetikus elválasztás alatt is sorozatos mintainjektálásra. Ez a konvencionális kapilláris elektroforézis készülékekkel nem lehetséges.

Összefoglalva, megállapításaim a következők.

A jelölt témaválasztása korszerű. A tudományos eredmények újak, ezeket nemzetközi foyóiratokban közölt publikációiban jelölt részletesen bizonyította. A jelölt értekezése elfogadható, mint a pályázó, magas szintű, tudományos kutatásra való alkalmasságát bizonyító munka. Mindezek alapján a Doktori Tanácsnak javasolom, hogy az értekezést nyilvános vitára bocsássa, a nyilvános vita időpontját tűzze ki.

Javasolom, hogy sikeres védelem esetén a Magyar Tudományos Akadémia Doktori Tanácsa jelöltnek az MTA doktora címet ítélje oda.

Pécs, 2015. augusztus 20.

Dr. Kilár Ferenc