

Válasz opponensi bírálatra

Opponens: Dr. Ilisz István, DSc, intézetvezető egyetemi tanár
 Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszeranalitikai Intézet
 Doktorjelölt: Farsang Evelin
 Disszertáció címe: Álló- és mozgófázisok vizsgálata a monoklonális antitestek kationcsere-kromatográfiájában

Tisztelt Dr. Ilisz István!

Szeretném megköszönni, hogy vállalta doktori disszertációm bírálatát és időt, energiát fektetett munkám véleményezésébe. Köszönöm az építő jellegű megjegyzéseket és a dolgozat aprólékos stilisztikai és helyesírási javítását. A felmerülő néhány kérdés kiváló visszajelzést adott számomra a kutatási eredményeim értelmezhetőségéről és a levont következtetések helyességéről.

Külön köszönöm az előbírálattal során készített korrektúrázott dokumentumot, ami nagy segítséget jelentett a sajtóhibák és a magyartalan mondatok javításában.

A megfogalmazott kérdéseket a bírálatban megfogalmazott sorrendben tárgyalom.

1) A vizsgált rendszereknél mitől függ, hogy mekkora pufferkapacításra és milyen széles pH tartományban alkalmazható pufferre van szükség?

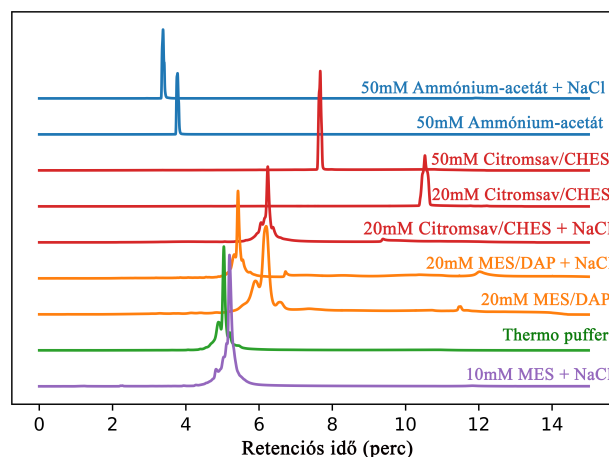
A pufferek pH-tartományának kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgálandó komponensek izoelektromos pontját. Fontos szempont, hogy a mozgófázis kezdeti pH-ja legyen kisebb, mint a legkevésbé visszatartott molekula pI-je, a végső pH pedig legyen nagyobb, mint a legjobban visszatartotté:

$$\underset{\text{állófázis}}{\text{pKa}} < \underset{\substack{\text{mozgófázis} \\ \text{kezdeti}}}{\text{pH}} < \underset{\text{minta}}{\text{pI}} < \underset{\substack{\text{mozgófázis} \\ \text{végső}}}{\text{pH}}$$

A pufferkapacitás tekintetében érdemes olyan rendszereket választani, amik pufferkapacitása az összetétel függvényében egységesen magas. A kis értékeknél kevés hozzáadott sav/bázis is jelentős változást okozhat a pH-ban, ami a pH-válasz függvény meredek emelkedő szakaszaiért felelős.

2) Figyelt-e meg az állófázistól függetlenül összefüggést a puffer anyagi minősége és a jelalak között?

A kezdeti mérések során egységesen a YMC BioPro SP-F oszloot használtam, így ezek a mérések alkalmasak a jelalak összehasonlítására a különböző pufferrendszerek esetében (1. ábra).



1. ábra. Az intakt bevacizumab kationcsere kromatogramjai a különböző pufferrendszerekkel a YMC BioPro SP-F oszlopon.

Az 1. ábrán látható, hogy az alkalmazott puffer anyagi minőségének jelentős hatása van a jelalakra. Az általam fejlesztett eluens rendszerek közül tiszta pH-gradiens módban a MES/DAP jelalakja bizonyult megfelelőnek, míg szimultán pH- és sógradiens módban a citromsav/CHES rendszerrel is szép csúcsalak érhető el.

3) Hogyan határozta meg a holtidőt a vizsgált rendszereknél?

A holtidőt az oszlopok térfogatának és a mozgófázis térkitöltési tényezője (az oszlop porozitása) ismeretében az alábbi egyenlettel határoztam meg:

$$t_0 = \frac{d^2 \pi}{4} L \rho \frac{1}{F}$$

ahol d az oszlop átmérője, L az oszlop hossza, ρ a mozgófázis térkitöltési tényezője (az oszlop porozitás) és F a térfogatáram. Az oszlopok porozitásai a gyártók által nyilvánosságra hozott értékek. Az oszlopok tulajdonságait az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat. Az alkalmazott oszlopok tulajdonságai: oszlophossz (L), belső átmérő (d) és porozitás (ρ)

	L (mm)	d (mm)	ρ
Supelco Antibodix	150	4,6	0,35
Thermo ProPac Elite	150	4	0,38
Thermo ProPac Elite	50	2	0,38
Phenomenex BioZen	100	4,6	0,39
YMC BioPro SP-F	100	4,6	0,35
Waters BioResolve SCX mAb	100	4,6	0,30
Waters Protein-Pak Hi Res SP	100	4,6	0,36

4) Eluensalkotóként nátrium-kloridot alkalmazott, és vizsgálta a só koncentrációjának hatását. Eltérő anyagi minőségű só esetén várható-e a szelektivitás változása?

A különböző ionok különböző erősséggel kötődnek az állófázis funkciós csoportjaihoz. Szulfonátcsoportot tartalmazó tölteten az alkálifém ionok kötődési erőssége az ionok hidratált átmérőjével fordítottan arányos:

Ion:	Li^+	Na^+	K^+
Hidratált ionátmérő (pm):	340	276	232

Ennek értelmében a Na^+ lecserélése az erősebben kötődő K^+ -ra élesebb csúcsokat eredményezhet gradiens elúciós módban, azonban a szakirodalomban nem találni KCl-ot alkalmazó kationcsere kromatográfiás módszereket. A továbbiakban a NaCl-ot KCl-ra cserélve vizsgálni fogom a csúcsalakot és a szelektivitást.

5) Milyen kölcsönhatások lehetnek a 3.3.3. fejezetben említett „a mozgófázis pH-jától független állandó kölcsönhatások”?

A kevésbé protonált mintakomponensek és az állófázis töltete között gyenge van der Waals kölcsönhatás alakulhat ki, ami a retenciós idő növekedését okozhatja.

Veszprém, 2021.08.09.

.....
Doktorjelölt