

Válasz Dr. Szabovik Gabriella Ildikó opponensi bírálatára

Elsősorban szeretném megköszönni átfogó és alapos bírálatát. A válaszaimat dőlt betűvel jelölöm.

- Megítélése szerint, – amennyiben az elsődleges kitűzött cél egy, „a szoftveres fejlesztést szemléltető tanulmány” bemutatása –, elegendő volna-e a kiválasztott hatóanyag mellett csupán azokra a kritikusnak ítélt szennyezőkre összpontosítani (pl. itt az ImpH, ImpG és ImpB), amelyeket az elővizsgálatok és egyéb prediktáló szoftverek (pl. Marvin Sketch) is alátámasztanak? Tehát a „kísérleti modell”, és mindezzel az értékelések, valamint az eredmények feldolgozása egyszerűsíthető-e?
- Véleményem szerint ebben az esetben elegendő lenne az ImpH, ImpG, ImpB és amlodipin vegyületekre összpontosítani. Viszont egy másik kromatográfiás problémánál, ahol nincs információnk a szennyezők, valamint hatóanyag kromatográfiás viselkedéséről (visszatartás változása a kromatográfiás paraméterek függvényében) mindenképp célszerű elővizsgálatokat (kromatográfiás méréseket) elvégezni, mert egyedül a szerkezeti képlet alapján prediktáló szoftverek nem minden esetben tudják megadni az elválasztás szempontjából kritikus vegyületeket [1]. Az előkísérletek, kromatográfiás mérések számát megfelelően meg kell ahhoz határozni, hogy azonosítani lehessen az összes kritikus vegyületet, ez véleményem szerint több időt vehet el, mint az összes szennyező egyidejű beépítése a kísérleti modellbe. Ráadásul amennyiben csak a kritikus komponensek találhatók meg a mintában, úgy előfordulhat, hogy az optimálás során olyan kromatográfiás körülmények kerülnek meghatározásra, amelyek alkalmazásával a nem kritikusnak tekintett komponensek is koelúciót szenvedhetnek valamelyik más komponenssel. Erre természetesen akkor van esély, ha az előkísérletek során nem minden kritikus szennyezőt azonosítottunk.

Az eredmények feldolgozásának egyszerűsítésére az alábbi módszert javaslom: ha megfelelően megválasztjuk a szennyezők koncentrációját (ezáltal csúcsterületét) az összekevert oldatban, melyet a kísérleti modellhez használunk (tartalmazza az összes komponenst) vagy tömegspektrometriás detektálást alkalmazunk, akkor megkönnyíthető, egyszerűsíthető az eredmények feldolgozása, mivel a csúcsterületek szignifikáns eltérése/molekulaion-tömegek megkönnyíti, mind az egyes szennyezők külön-külön, mind a koelúciós esetek értékelését is.

- Véleménye szerint a versenyszférát (az ipari környezetet) tekintve milyen esetben éri meg ilyen gigantikus mennyiségű befektetett munka a célkísérletek elvégzését megelőzően?
- *A „gigantikus mennyiségű” kísérletet azért végeztem el, mert ha az egyes vizsgált paramétereknél (t_G , T , pH) nem lehetett volna kiterjeszteni a kísérleti teret a maximális eltérés használatával, akkor kisebb mértékű kiterjesztéséhez ugyanúgy álljanak rendelkezésre megfelelő kísérletek.*

Az ipari környezetben a most bemutatott (Δt_G max 5X, $\Delta T \leq 60^\circ\text{C}$, $\Delta pH \leq 1,2$) maximális kiterjesztést alkalmaznám egy ellenőrző kísérlettel, melyet összehasonlítva a DryLab szoftver által jóslt kromatogrammal elfogadható pontosságot kapok, akkor elfogadom a szoftver által számított kísérleti teret; ha nem elfogadható, akkor szűkítem a teret további kísérletek segítségével.

- Véleménye szerint ez a megállapítás mennyire tekinthető általános érvényűnek?
- *Véleményem szerint ez a fordított fázisú kromatográfiával vizsgálható molekulákra többnyire igaz [2-8], más körülmények között, például HILIC módban történő elválasztásnál nem minden esetben alkalmazható [9-11].*
- Azaz az itt meghatározott „maximális kiterjesztett kísérleti tér”, melyet az itt kipróbált konkrét állófázison (Acquity BEH C18) mutatott be, sikeresen átvihető-e, alkalmazható-e másik, azonban azonos USP 621 kolonna besorolású (pl. L1-es; C-18) oszlopra is?
- *Az L1-es besorolású oszlopok a besorolásuk ellenére különböző fizikai-kémiai adottságokkal, pl.: borítottsággal, szilanol csoport aktivitással rendelkeznek, ezért mindenképpen szükségesnek tartom a módszer ellenőrzését a rutin mérések elkezdése előtt. Rosszabb esetben, amennyiben nem megfelelő a megválasztott munkapont (pl.: eltérő csúcssorrend, koelúció), az új oszlopra is érdemes elkészíteni a kísérleti tervet és így a közös metszet segítségével (akár a ColumnMatch modul használatával) kijelölni azt a kísérleti körülményt, ahol mindkét állófázison azonos csúcssorrenddel, megfelelő felbontással elválaszthatóak a vizsgált vegyületek.*
- Mit ért itt Jelölt a „végső minősítésen”?
- *Végső minősítés alatt az API (active pharmaceutical ingredient) vagyis a hatóanyag folyadékkromatográfiás rokonszenyező profiljának meghatározását fejeztem ki.*

- Mérhető-e megbízhatóan a kitüntetett vegyület ezzel a módszerrel, amennyiben rutinalkalmazásban kívánják felhasználni?
- *A rutinalkalmazásban a büntetőjogi eljárás során a legfőbb kérdés, hogy a lefoglalt anyag birtoklása törvényben tiltott-e, tehát inkább kvalitatív meghatározásokat végeznek, mint kvantitatív meghatározásokat. Ahogy a Bíráló írja a 4-es pozícióban levő metil-naftil származék a JWH-122 molekula, melyet kvalitatívan azonosítani szeretnének a laboratóriumban. Ez a vegyület kellő felbontással ($R_s \geq 2,0$) elválasztható a többi metil-naftil izomerjétől, így tömegdetektor segítségével, nagy biztonsággal azonosítható.*
- Végezetül a dolgozat kitekintéseként, véleménye szerint, az időnként horribilis mennyiségű előkísérlet elvégzésével járó munkát lehet-e könnyíteni a DryLab Optimalizáló szoftver további fejlesztésével? Hogyan lehetne még több időt, energiát megtakarítani a módszerfejlesztések során? Történtek-e ilyen irányú fejlesztések az elmúlt időszakban?
- *A dolgozatban bemutatott kiterjesztett kísérleti tér segítségével könnyebben fel lehet térképezni, hogy egy állófázis alkalmazható-e az adott elválasztáshoz, így a módszerfejlesztési fázist meggyorsíthatja. Ha tömegspektrometriás detektálást is alkalmazunk azzal a csúcsazonosítási fázissal („PeakTracking”) tudjuk megkönnyíteni, mivel a nagy kísérleti tér hátránya, hogy ez a rész sokkal időigényesebb, illetve ha hasonló csúcsterülettel rendelkeznek a szennyezők, szinte kivitelezhetetlen. Így a tömegspektrométer használatával azokat az előkísérleteket „spórolhatjuk” meg, ahol pontosan beállítjuk az egyes szennyezők koncentrációját. A DryLab szoftverfejlesztők kidolgozták az automatikus csúcsazonosítást, amennyiben a komponensek el vannak nevezve minden egyes kromatográfiás futásnál. Ha a tömegspektrométer segítségével elnevezzük az egyes vegyületeket, akkor így nagymértékben gyorsítható ez a folyamat. Azoknál az elválasztásoknál, ahol a fordított fázis nem vezet célra, érdemes bevezetni más modellegyenleteket, amik pontosabban leírják a vegyületek retenciós tényezőjének függését a vizsgált paraméterektől. Ebben az irányban még nem történt fejlesztés, hogy manuálisan bevihetőek legyenek ilyen egyenletek.*

Gödöllő, 2023.01.27.



Rác Norbert

Jelölt

- [1] N. Rácz, *Quality by Design alkalmazása folyadékkromatográfiás elválasztás tervezésében*. BME Diplomamunka, 2015.
- [2] J. W. Dolan, D. C. Lommen, L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 1990, 535, 55–74.
- [3] L. R. Snyder, J. W. Dolan, D. C. Lommen, *J. Chromatogr.*, 1990, 535, 75–92.
- [4] L. R. Snyder, J. W. Dolan, D. C. Lommen, *J. Chromatogr. A*, 1989, 485, 65–89.
- [5] J. W. Dolan, D. C. Lommen, L. R. Snyder, *J. Chromatogr. A*, 1989, 485, 91–112.
- [6] J. W. Dolan, *J. Chromatogr. A*, 2002, 965, 195–205.
- [7] P. J. Schoenmakers, H. A. H. Biliot, L. De Galan, *J. Chromatogr.*, 1981, 218, 261–284.
- [8] M. A. Stadalius, H. S. Gold, L. R. Snyder, L. R., *J. Chromatogr. A*, 1984, 296, 31–59.
- [9] V. Kumar, S. Leweke, W. Heymann, E. Lieres, F. Schlegel, K. Westerberg, A. M. Lenhoff, *J. Chromatogr. A*, 2021, 1660, 462669.
- [10] N. Rácz, J. Nagy, W. Jiang, T. Veress, *J. Chromatogr. Sci.*, 2018, 57, 230–237.
- [11] B. Bobály, A. Beck, J.-L. Veuthey, D. Guilleme, Sz. Fekete, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2016, 131, 124–132.