

## **Opponensi vélemény Páll Boglárka Zsuzsa „Gyógyszerhatóanyagok és -szennyezők retenciós tulajdonságainak vizsgálata nagyhatékonyságú ionkromatográfiás rendszerekben” című doktori (PhD) értekezéséhez**

Páll Boglárka Zsuzsa „*Gyógyszerhatóanyagok és -szennyezők retenciós tulajdonságainak vizsgálata nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás rendszerekben -Fókuszban az ionkromatográfia alkalmazási lehetőségei*” című tervezett doktori (PhD) értekezését egy 2025. március 10-én kelt előbírálathoz az opponens már értékelte (lásd 1. melléklet). Az elővétel során kapott válaszok és a vita alapján a munkabizottság úgy döntött, hogy az értekezés benyújtható a Pannon Egyetem Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskolája részére fokozatszerzés céljából.

A előbírálathoz készült értekezés bár címében teljes egészében nem, de tartalmilag megegyezik a Doktori Iskolához benyújtott „*Gyógyszerhatóanyagok és -szennyezők retenciós tulajdonságainak vizsgálata nagyhatékonyságú ionkromatográfiás rendszerekben*” című értekezéssel.

A most beadott munka értékelése kapcsán kapott bírálati szempontok olyan elemekre is felhívták a figyelmet, amikre a korábbi előbírálathoz a bíráló nem tért ki. A bírálat a továbbiakban kiegészült néhány ilyen értékesnek vélt szempont figyelembe vételével, viszont az előbírálathoz szakmai fejezetei továbbra is relevánsak maradtak az opponensi vélemény alapján.

A munka jól szerkesztett, egységes műnek tekinthető, amiben minden olyan fejezet képviselteti magát, ami egy ilyen típusú tudományos munka esetében kötelező. A fejezetek aránya is megfelelő. Külön köszönet jár a szerzőnek azért, hogy egy a rövidítéseket tartalmazó összefoglalóval gazdagította a munkát a tervezethez képest. A számozási rendszer és a tartalomjegyzék egyértelműen segíti az olvasót a szövegben való eligazodásban, a hivatkozások megtalálásában. Az előbírálathoz kapott kézirat stilisztikailag jelentős fejlődésen ment át, döntő többségében eltűntek azok a nyelvhelyességi hibák, elírások és magyartalan szerkezetek, amik akkor kissé árnyalták a tervezett értekezés értékét.

A témaválasztás -az előbírálathoz taglaltak szerint- újszerű: a jelölt olyan kromatográfiás megoldásokat mutat be, amik szorosan kapcsolódnak a gyógyszeriparhoz, a hatósági elvárásokhoz, nyomnyi mennyiségű szennyező analíziséhez. Másrészt: a választott technika önmaga sem hétköznapi, hiszen ionkromatográfiával alig-alig merészkedünk túl az egyszerű szeretlen ionok analízisének.

A mellékletben csatolt értékelés („Előbírálathoz”) 1-12 pontjai a disszertációhoz kapcsolódó tartalmi/szakmai megjegyzéseket és javaslatokat taglalják, így az a jelen bírálat elválaszthatatlan részét képezi. Ezen kérdésekre a Jelölt az előbírálathoz eljárás során kimerítő válaszokat adott. Ezen túlmenően a Doktori Iskolához benyújtott disszertáció egyes fejezeteiben tetten érhető az a törekvés is, hogy kiegészítse, egy-egy magyarázó mondattal megtoldja a szövegezést a konkretizálás, a jobb érthetőség kedvéért. Ennek megfelelően a dolgozat mind szakmai, mind stilisztikai szempontból egyértelmű fejlődést mutat az előző változathoz képest.

Az előbírálathoz ismétlésnek tűnik, de a dolgozat elméleti szempontból talán legérdekesebb és legértékesebb része annak a komplex hatásmechanizmusnak a feltérképezése, amely során az egymással kezdetben koelválódó szervetlen és szerves kationok (nátrium- és trisz ionok) elválaszthatóvá válnak egymástól a mátrix-terhelt rendszerben. Gyakorlati szempontok alapján a maradék N-brom-szulcinimid meghatározása jelenthet alternatívát az eddigi mindennapokhoz képest, ahol is származékképzés során -lúgos hidrolízis és tioszulfátos redukció után- bromid ionként határozza meg a Szerző annak maradékát két hatóanyagban is.

Az előbírálathoz tett opponensi véleményemet fenntartom, az értekezést továbbra is

**elfogadásra javaslom.**



Nádasi Levente

TEVA Gyógyszergyár Zrt

Debrecen, 2025. június 2.

**Előbírálát Páll Boglárka Zsuzsa „Gyógyszerhatóanyagok és -szennyezők retenciós tulajdonságainak vizsgálata nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiai rendszerekben -Fókuszban az ionkromatográfia alkalmazási lehetőségei” című doktori (PhD) értekezéséhez**

Páll Boglárka doktori értekezésében egy speciális tématerületet dolgoz fel, ami a gyógyszeripari analitikában merőben szokatlan: olyan ionkromatográfiai megoldásokat javasol jól ismert komponensek analízisére, amikre általában „hagyományos” folyadékkromatográfiai rutin megoldások már léteznek, és hősiesen bevallva a bírálónak sem ezek a megoldások jutnának elsőként eszébe, ha ilyen feladatot kapna.

A dolgozat terjedelmét, felosztását, az egyes fejezetek egymáshoz viszonyított arányát tekintve egységes, jól átgondolt és megszerkesztett műnek tekinthető. Talán egy olyan összefoglaló tenné még kerekébbé a disszertációt, ahol a dolgozatban alkalmazott rövidítések tételesen föl lennének sorolva megkönnyítendő az olvasó dolgát, hogy ne kelljen visszalapoznia, és a szövegben keresgélnie egy-egy betűszó kapcsán.

A **Kivonat** fejezet röviden összefoglalja a disszertációban elért eredményeket. Bizonyos mértékben az egész dolgozatot végigvonul, de talán itt tűnnek leginkább szembe azok a nyelvhelyességi és stilisztikai hibák, elírások, terjengős, magyartalan szerkezetek (pl. meghatározásra kerül, bemutatásra kerül), amik az érthetőséget nem befolyásolják, de az élvezeti értéket rontják. Ezen hibák javítását feltétlenül javaslom, hogy a tudományos érték maradéktalanul élvezhető legyen minden olvasó számára.

A **Bevezetésben** a Szerző kitér a legfontosabb kromatográfiai alapösszefüggések ismertetésére, az ionkromatográfiai elválasztást leíró modellekre, a műszerezettség fejlődésére, az ionkromatográfiai technika alkalmazhatóságára különös tekintettel az egyes szennyezők közvetlen és közvetett vizsgálhatóságára. Állításait irodalmi példákkal támasztja alá.

1. Aminoglikozid antibiotikumok esetében UV/látható detektort nem, csak egzotikus detektorokat használhatunk, kromofor hiányában származékot képezhetünk, illetve –amint a szerző is írja az 1.2.2. fejezetben– számos alkalmazást találhatunk az irodalomban pulzáló amperometriás detektálással egybekötött ionkromatográfiai elválasztásra. Vajon miért nem terjedtek el ezek a módszerek a rutin gyógyszeripari analitikában? Ha van ilyen tapasztalata a szerzőnek, mennyire mondható „egyszerűnek” egy ilyen analitikai módszer rutin alkalmazása és validálása?
2. Szintén az 1.2.2. fejezetben, az 1.11. ábrán a második sorban nitrozóniumionnak nevezi a Szerző a  $\text{O-N=O}$  iont, holott az nitrition.

Az **Eredmények fejezet 3.1.** pontjában egy maradék ecetsav meghatározására szolgáló ionkromatográfiai módszer ismertetésére kerül sor. A módszer teljesítmény jellemzőit egy

ugyan ilyen célra fejlesztett gázkromatográfiás módszer validálási eredményeivel hasonlítja össze. Az **1. tézispont állításait teljesen alátámasztják a kapott eredmények**, miszerint az ionkromatográfiás eljárás precízebb, és az analízis idő rövidebb.

3. Az okokra a két technika eltérése és területi korlátok miatt nem térhetett ki a Szerző, de éppen ezért vetődik fel a kérdés, hogy az ecetsav meghatározására számos fordított fázisú nem-ionkromatográfiás módszer létezik, ahol UV/látható detektálást alkalmaznak: mi az oka annak, hogy nem egy ilyen technikával kapott eredményesorozattal mutatott rá az ionkromatográfia előnyeire? Másrészt, az összehasonlításhoz (3.3. táblázat) érdekes lett volna feltüntetni az abszolút koncentrációkat is, hiszen az érzékenységet igazából ezek alapján ítélnék meg.
4. A 3.1.1. fejezetben a szerző az ecetsav gázkromatográfiás és ionkromatográfiás meghatározása során nyert validálási eredményeket hasonlítja össze. A gázkromatográfia esetében a standard oldattal meghatározott rendszerprecizitás relatív szórás értéke (10,7%) jóval nagyobb, mint a mátrixterhelt addíciózott mintaoldat injektálása során nyert koncentráció értékek relatív szórása (6,2%), elvileg ez utóbbi esetben egy mintaelőkészítési lépés is növel(het)ti a bizonytalanságot. A követelményeket mindkét esetben maximum 20,0%-os szinten határozza meg. Összhangban van-e a limit a nemzetközi szabályozásokkal, ha nem, mivel tudja az eltérést igazolni, illetve mi lehet az oka a rendszerpontosság nagy szórásának?

Az **Eredmények fejezet 3.2.** pontjában maradék nátrium-azid szennyező citostazolból történő meghatározásáról értekeznek a szerzők. Az oldhatóságbeli eltérések miatt extrakciós mintaelőkészítést dolgozott ki. A módszert validálta, és az az adott specifikáció szintjén precíz és pontos. A **2. tézispontban leírtaknak megfelelően** a hidroxidion és az azidion termodinamikai viselkedése az adott rendszerben azonos, pont ezért az azidion retenciója független a hőmérséklettől.

5. Viszont, a különböző hőmérsékleteken felvett retenció tényezők van't Hoff ábrázolással kapott pontseregére illesztett egyenes (3.8. ábra) korrelációs együtthatójának négyzete ( $r^2$ ) csupán 0,617, ami azt sugallja, hogy közel 40% a véletlen hiba a rendszerben. Mivel magyarázható ez annak ellenére, hogy a retenció idők szórása nem több, mint 0,18%? A megértéshez érdemes lenne a grafikon függőleges tengelyét az érdemi változás nagyságához igazítani.
6. A szerző az azid-ionok meghatározására kifejlesztett módszer validálásában bemutatja, hogy az limit (QL) szinten alkalmazható. A validálás során az egyes paraméterekre nyert kromatográfiás és statisztikai értékek kiválóan bizonyítják a módszer teljesítő képességét, de nem közöl linearitási és torzítatlansági adatokat. A limit módszer áthordási vizsgálatok estében elfogadott, de termék felszabadításhoz a hatóságok a fenti kiegészítő adatokat is kéri/kérhetik. Voltak-e ilyen irányú mérések, és ha igen, megfelelő volt-e a linearitás?

7. A 3.2.2. fejezetben a Szerző az optimális áramlási sebesség meghatározásához felvette a rendszerre jellemző van Deemter görbét (3.7. ábra), és azt az 1.3 ábra B görbéjéhez hasonlítja. A görbe alakját ugyan nem befolyásolja, de szerencsésebb lenne, ha mindkét esetben térfogat/idő dimenzióban fejezné ki a sebességet, hiszen a szövegben a műszer ebben az egységben megadott korlátaira hivatkozik (0,1 mL/perc reprodukálható sebesség).

Az **Eredmények** fejezet 3.3. pontjában a mátrix hatását vizsgálja a Szerző a trisz-(hidroximetilamin) (trisz) és a nátriumion közötti felbontára. A **3. tézispontban bravúrosan megfogalmazottak szerint** az elválasztás hatékonysága több folyamat kombinációjából eredeztethető, így az alkalmazott gyanta ioncserélő kapacitásából; az eluens, a mátrix és a trisz sav-bázis karakteréből, amelyek egymással szoros kölcsönhatásban vannak, az alkalmazott koncentrációs viszonyoktól, a pillanatnyi koncentrációk lokális hatásától.

8. A kölcsönhatásban részvevő komponensek protonáltsági viszonyait nagyszerűen összefoglalja a 3.26-os ábra, sajnos, a függőleges tengely feliratozása lemaradt.
9. A 3.3.1. fejezetben a szerző külön kitér a nátriumion csúcs jellemző kromatográfiai paramétereinek a változására is. Vizsgálja a tányérszám és a szimmetria faktor változását az ammónia és az eluens koncentráció függvényében: a szimmetriára nincs hatással egyik paraméter sem, míg a tányérszám jelentősen csökken az ammónia koncentráció emelésével. Ugyanakkor az is elmondható, hogy a tányérszám egy adott ammónia koncentráció mellett az eluens koncentrációjának növelésével optimum görbe szerint változik. Van-e erre valamilyen magyarázat?
10. A 3.3.2. fejezet 3.20 ábrán a lítiumion és a trisz közötti felbontások láthatók az ammónia koncentráció függvényében különböző hőmérsékleteken. A szöveges értékelés szerint az alacsonyabb hőmérséklet kedvez az elválásnak, de a grafikon ezt nem támasztja alá, hiszen az optimum 30 °C-on van, 25 °C-on az elválás ennél rosszabb. Ha ez nem véletlen adatcsere, van-e erre valamiféle magyarázat?

A 3.4. fejezetben a Szerző sort kerít azoknak az eredményeknek a bemutatására, amiket maradék N-bróm szukcinimid hatóanyagból történő kimutatása során kapott. A **4. tézispontban megfelelően összegezettek** szerint a maradék N-bróm-szukcinimid sztöchiometrikus elbontása után nyert bromidiont szelektíven detektálta, a szukcinimidből képződő 3-karbamoil-propánsavat ortogonális módszerekkel azonosította. Prasugrel és Favipiravir hatóanyagból extrakciós-hidrolitikus-redukciós mintaelőkészítés után a maradék N-bróm szukcinimid bromid ion formájában detektálható, mindkét módszer specifikus, pontos és precíz a vizsgált tartományban.

11. A 3.4. fejezetben leírtak szerint az ICH M7(R2) előírja, hogy élethosszig tartó terápia esetén a genotoxikus szennyezők napi dózisa 1,5 mg/nap. Ez csak abban az esetben igaz, ha nem áll rendelkezésre a szennyezőre vonatkozó egyedi toxikológiai adat: ha ilyen létezik, akkor azzal kell számolnunk még akkor is, ha az szigorúbb az általános limitnél.


Végzett-e a Szerző ebben az irányban kutatást, és kizárható-e a saját limit az N-bróm-szukcinimid esetében?

12. A 3.33. ábrán Prasugrel hatóanyag maradék N-bróm szukcinimid meghatározása során nyert tipikus kromatogramok láthatók. A mintaelőkészítésen még nem átesett Prasugrel is tartalmazhat bromidiont (például az n-bróm-szukcinimid szintézisútjából visszamaradva), ami hozzáadódhat a meghatározandó komponens bontásából származó bromid-ionokhoz. Ennek megfelelően -különösen beszállító váltások kiértékelése kapcsán érdemes lehet egy kezeletlen minta injektálása is a rendszerbe.

A disszertációt egy megfelelően összeállított **Összefoglalás** zárja.

A dolgozat, mint a legtöbb akadémiai értekezés, az eredményeket tálcán nyújtja az olvasónak, de a legtöbb esetben terjedelmi okokból nem térnek ki arra, hogy milyen módon kerültek a tálcára ezek az eredmények. A kromatográfias módszerfejlesztésben első lépésként a detektálási technikát fixáljuk le, majd következhet a megfelelő állófázis megtalálása, illetve az eluensek összetételének optimálása. Pont ez a legizgalmasabb rész, és itt érheti el a kutató a legszebb eredményeket: a dolgozat olvasói pedig pont ebből az izgalmas fejezettől maradnak ki, már csak a készre csiszolt végeredményt láthatják. Amennyiben mód van rá, néhány mondatban érdemes megemlíteni azokat a lépéseket, amikkel ahhoz a bizonyos végső módszerhez eljutott a Szerző, de ennek hiánya sem von le semmit a dolgozat értékéből.

Összefoglalva: Páll Boglárka Zsuzsa „Gyógyszerhatóanyagok és -szennyezők retenciós tulajdonságainak vizsgálata nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias rendszerekben - Fókuszban az ionkromatográfia alkalmazási lehetőségei” című doktori (PhD) értekezése egyértelműen tükrözi a Szerző szakértelmét, a kromatográfiában való jártasságát, a lényeglátását, a kitartását a kísérleti munkában. Eredményeit számos hazai és nemzetközi előadáson, konferencián csillogtatta meg, illetve azokat rangos folyóiratokban publikálta. A dolgozat sikeres munkahelyi vitája esetén javasolom annak a bíráló bizottság elé történő felterjesztését.

  
Nádásdi Levente

TEVA Gyógyszergyár Zrt

Debrecen, 2025. március 10.