

# KROMATOGRÁFUS

kromatográfiai folyóirat

# Vegyen egy mély lélegzetet

Egy pillanatra  
tegye félre  
pipettáját

És hagyja, hogy  
elvigyük a biológiai  
Zen állapotba



Peptid mapping • Peptid kvantifikálás • Intakt-analízis •  
Fragment-analízis • Aggregátum-analízis • Glikán-analízis •  
Hatóanyag-antitest arány

**genlab**

Gen-Lab Általános Laboratóriumi  
Felszereléseket Forgalmazó és Szolgáltató KFT.  
Cím: H-1119 Budapest Hadak útja 41.  
Tel.: (36-1) 206-2455 | Fax: (36-1) 206-2451  
Email: info@gen-lab.hu

**phenomenex**  
...breaking with tradition<sup>SM</sup>

[www.phenomenex.com/bioZen](http://www.phenomenex.com/bioZen)



# Tartalomjegyzék

4. Zebron ZB-624Plus – illékony amin vegyületek elemzése

*Ramkumar Dhandapan, Yuri Belov és Rola El abaji*

*Fordította: Szász-Vadász Tas*

6. Terazosin Gyógyszerkönyvi módszer aktualizálása

*Kormány Róbert, Enesei Dániel*

10. A Strata-X PRO és a hagyományos szilárd fázisú extrakció (SPE) összehasonlítása savak, bázisok és semleges vegyületek plazma mintákból történő elválasztása esetében

*Matthew Brusius és James Turner*

*Fordította: Szabó Géza*

14. Analitikai célú laboratóriumi műszerek kapacitáskihasználásának vizsgálata hazai szervezeteknél

*Tolnay Anita, Dr Koris András*

18. A fehérje-kromatográfia alapvető problémái

*Fekete Szabolcs*

22. Szerves savak és bázisok meghatározása gázkromatográfián

*Göröcs Noémi*

24. Tömegspektrométer-barát mozgófázis alkalmazása terápiás fehérjék ioncserés elválasztásához

*Farsang Evelin, Fekete Szabolcs, Horváth Krisztián*

28. Mintatartó üvegek elővágott- és teli szeptumainak összehasonlítása oldószer veszteség szempontjából

*Bálint Balázs, Imrik Péter*

## Kromatográfus

VI. évfolyam 1. szám

Nyomdai előkészítés:

Mogyorósi Eszter  
mogyorosi.eszter@gen-lab.hu

Nyomdai munka:  
Real Press Nyomda

Szerkesztette:

Fekete Szabolcs  
Horváth Krisztián  
Imrik Péter  
Kormány Róbert

Kiadja:  
Gen-Lab Kft.

ISSN 2415-9042

A szerkesztőség elérhetőségei:

Cím: H-1119 Budapest,  
Hadak útja 41.

Tel.: (36-1) 206-2455

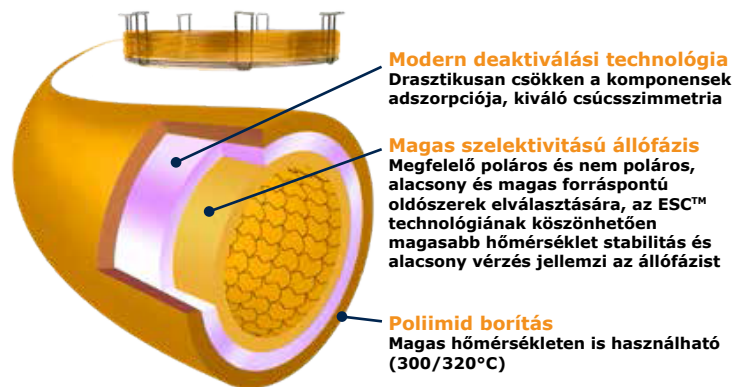
Fax: (36-1) 206-2451

Email: info@gen-lab.hu

Web: www.gen-lab.hu

# Zebtron ZB-624Plus – illékony amin vegyületek elemzése

Ramkumar Dhandapan, Yuri Belov  
és Rola El abaji  
Phenomenex, Inc.  
Fordította: Szász-Vadász Tas  
Gen-lab Kft.

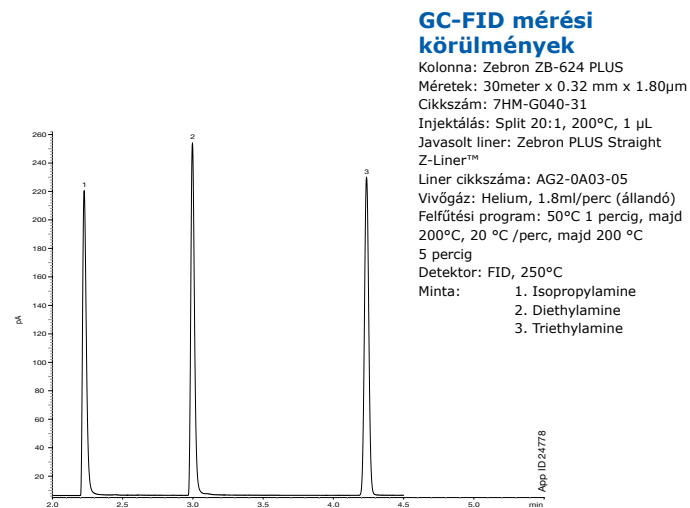


2. ábra Zebtron ZB-624Plus előnyös tulajdonságai

## Bevezetés

A szerves szintézisek során, különösen a gyógyszeriparban, jelentős szerepet játszanak az illékony amin vegyületek (pl. trietilamin). Amennyiben egy gyógyszer hatóanyag szintézise során felhasználásra kerül egy vegyület, legyen az köztitermék, reakciópartner vagy oldószer, a hatóanyagban be kell bizonyítani, hogy a mennyisége a limit szint alatt van. Az illékony vegyületekre vonatkozó limiteket az ICH Q3C(R6) guideline tartalmazza.

Az amin vegyületek aktív funkciós csoportja másodlagos poláros kölcsönhatás eredményeképp adszorbeálódnak a GC fázis felületére, ami kromatográfián kihívást jelent. A tiszta oldószerből történő injektálás, vagy ún. headspace injektálás ellenére elkenődő („tailinges”) csúcsokat kaphatunk. A maradék oldószer vizsgálatokhoz az USP a G43 kolonna típust írja elő, melyen egyaránt elválaszthatóak az alacsony és magas forráspontú, illetve poláros és nem poláros oldószerek. Az ilyen típusú kolonnán az illékony amin vegyületek a másodlagos kölcsönhatások miatt nem szimmetrikus csúcsalakkal elemezhetőek. A Phenomenex új Zebtron ZB-624PLUS GC állófázisa lehetővé teszi, hogy ezen vegyületek megfelelően szimmetrikus csúcsalakat adjanak, ezt mutatjuk be az alábbi ábrákon.

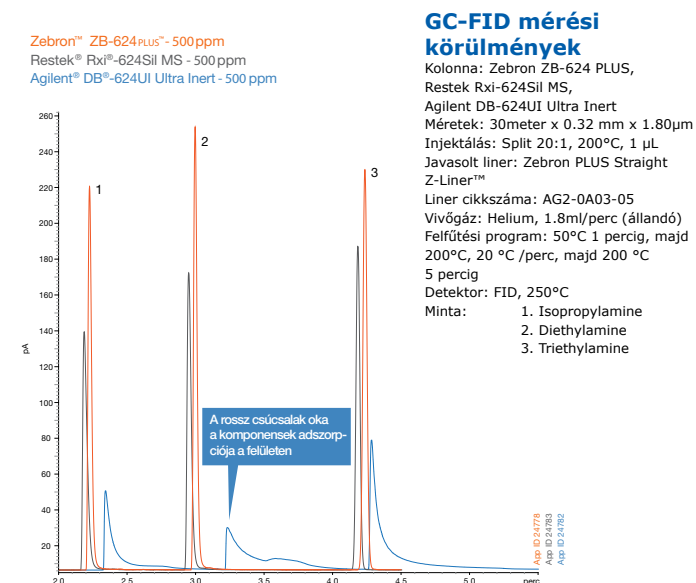


1. ábra Illékony amin vegyületek vizsgálata Zebtron ZB-624Plus kolonnán

## Eredmények és kiértékelés

Az 1. ábrán isopropil-amin, dietilamin és trietilamin analízise látható az új Zebtron ZB-624PLUS kolonnán. A komponensek koncentrációja 500ppm. A modern deaktiválási technológiának köszönhetően (2. ábra) a Zebtron ZB-624PLUS állófázison az illékony amin vegyületekre is szimmetrikus kromatográfiás csúcsokat kapunk. A csúcs asszimmetria érték 0,8 és 1,5 között elfogadható, ahogy az az 1. táblázatban is látható, mindhárom vegyületre teljesül a feltétel a mérés során.

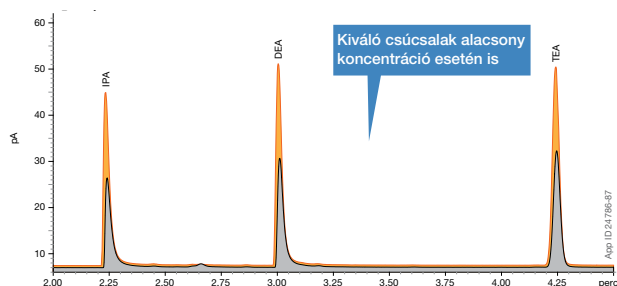
Három modern fázist hasonlítottunk össze (Zebtron ZB-624PLUS, Restek Rxi-624Sil MS, Agilent DB-624-UI) illékony amin vegyületek analízisére, a mérési eredményt a 3. ábrán és a 2. táblázaton mutatjuk be. A kromatogram szerint a Zebtron ZB-624PLUS kolonnán a jobb csúcsszimmetria mellett az oszlop nagyobb érzékenysége is látható. A Zebtron deaktiválási technológiája nagyobb hatékonyságot eredményezett, míg az Agilent DB-624 UI fázison a legnagyobb a csúcsasszimmetria.



3. ábra Illékony amin vegyületek összehasonlító mérése különböző 624 típusú állófázisokon

ZB-624 plus<sup>™</sup> - @ 100 ppm (App ID 24787)

ZB-624 plus<sup>™</sup> - @ 50 ppm (App ID 24786)



**4. ábra** Illékony amin vegyületek vizsgálata 50ppm koncentrációban

**1. táblázat** Illékony amin vegyületek csúcshimmetria értékei Zebron ZB-624Plus kolonnán

Csúcs	Komponens	Csúcshimmetria
1	Isopropylamine	1.3
2	Diethylamine	1.2
3	Triethylamine	1.0

A 4. ábrán a fent nevezett illékony amin vegyületek mérése látható, 50ppm és 100ppm koncentrációban. Általánosságban elmondható, hogy a kis koncentrációban az amin vegyületek csúcsalakja „tailinges”, ugyanakkor látható, hogy a Zebron ZB-624PLUS állófázison ez a hatás

**Kizárólag a LAB-EX-nél!**

Úttörő a GC-k között:

# CALIDUS MIKRO GÁZKROMATOGRÁF

Bizonyára már Ön is eljátszott a gondolattal, hogy milyen jó lenne **mérését 20 perc helyett 5 perc alatt befejezni**. A Calidus mikro GC ebben segítségére lehet!

**Elégedett lesz** ezzel a készülékkel, ha szeretné:

- hogy GC készüléke **tizedakkora helyet** foglaljon
- gázkromatográfjának **fogyasztása tizedére csökkenjen**
- hogy eszköze **pontosabban és sokkal gyorsabban mérjen**, mint egy hagyományos GC

Mindez ma már megvalósulhat az Ön laborjában is a **Teledyne - Falcon mikro GC** segítségével!

Ellenőrzött alkalmazások listájáért kérjük keresse fel a következő honlapot: [falconfast.net](http://falconfast.net)

kevesebb jelentkezik. A deaktiválási folyamat után minden Zebron ZB-624Plus kolonna egyedi minőségbiztosítási folyamaton megy keresztül. Vizsgálják az állófázis savas és bázikus karakterisztikájú vegyületekkel egyaránt, annak érdekében, hogy az Ön laborjában és mérései során a legmegfelelőbb kromatográfias képet, szimmetrikus csúcsokat kapjon.

**2. táblázat** Illékony amin vegyületek csúcshimmetria adatainak összehasonlítása különböző 624 típusú állófázisokon

Csúcs	Komponens (500 ppm)	Csúcshimmetria		
		ZB-624PLUS	Rxi-624SiIMS	DB-624UI
1	Isopropylamine	1.3	1.6	4.1
2	Diethylamine	1.2	1.3	7.9
3	Triethylamine	1.0	1.0	5.1

Összefoglalás

A Zebron ZB-624PLUS oszlopok illékony amin vegyületekre is szimmetrikus kromatográfias csúcsokat adnak már kis koncentrációban is, e mellett a modern deaktiválási technológiának köszönhetően nagy hatékonysággal elemezhetőek. Minden oszlop egyedileg tesztelt, készen arra, hogy a legjobb megoldást nyújtsa Önnek.



# Terazosin Gyógyszerkönyvi módszer aktualizálása

Kormány Róbert, Enesei Dániel  
Egis Gyógyszergyár Zrt.

## Bevezetés

Az Európai Gyógyszerkönyv (Ph. Eur.) terazosin gyógyszerhatóanyag esetében 15 terazosin szennyezőt határoz meg, melyből 10 specifikált (1. ábra). A terazosin szennyezésprofil vizsgálatát a monográfia szerint két különböző folyadékromatográfiás módszerrel kell elvégezni, melyek mérési ideje 40 perc és 45 perc [1]. A kétféle módszert a vizsgálandó komponensek közötti nagy szerkezetbeli eltérés indokolja (általános elúciós probléma). A módszerek hátránya a hosszú elemzési idő mellett, hogy egy módszerrel nem oldható meg az összes szennyező elválasztása, ezért vagy két készüléket kell párhuzamosan üzemeltetni, vagy a méréseket egymás után ugyanazon a készüléken kell elvégezni, ami az elemzés időszükségletét még jobban megnövelné.

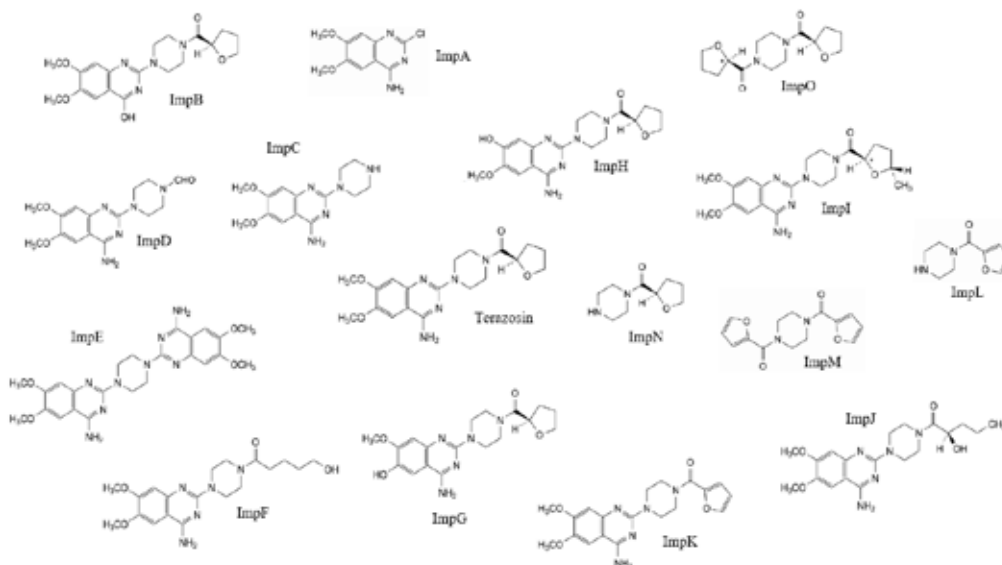
Európai Gyógyszerminőségi Igazgatóság (European Directorate for the Quality of Medicines, EDQM) ezen okok miatt új módszert szeretne a Ph. Eur. monográfiába, melyben egy módszerrel vizsgálható a hatóanyag mellett a az összes szennyező komponens (az elválasztás hatékony és szelektív), valamint a mai kor igényeinek megfelelően kellően rövid.

Munkánk során célunk egy olyan módszer kidolgozása volt, amely megfelel az EDQM által megfogalmazott kritériumoknak.

## Előkísérletek

A módszerfejlesztés során számos korlátot kellett figyelembe vennünk. Ahhoz, hogy magas pH tartományban, az oszlop élettartamának jelentős csökkenése nélkül tudjunk mérni, pH tűrő, fordított fázisú hibrid töltetet kell alkalmazni. Mivel az Imp N és Imp L poláris jellegűek, ezért fordított fázisú körülmények között nincs megfelelő visszatartásuk, így nagy víztartalmú kiindulási mozgófázis összetételt kell alkalmazni (5% MeOH). Az összes komponens nem oldódik kellően „gyenge”, nagy víztartalmú oldószerben, ezért a gradiens elúció végén magas szerves oldószertartalom szükséges az összes komponens eluálásához. A magas szerves oldószer tartalom miatt azonban kis térfogatú injektálást kell alkalmazni, hogy ne torzuljon a korán eluálódó komponensek csúcsalakja. Az Imp N-nek és az Imp O-nak nincs megfelelő UV aktivitása, ezért alacsony detektálási hullámhosszt kell választani, ami szűkíti a pH-tompító anyagok alkalmazhatóságát. Az elválasztandó komponensek között található szerkezetileg nagyon hasonló (pl. Imp I és Imp K) és nagyon eltérő (pl. Imp L és Imp E) is, ezért a megfelelő szelektivitás eléréséhez alternatív mozgófázis és/vagy alternatív állófázis szükséges. Szem előtt kell tartani, hogy a módszer széleskörű felhasználásra készül, mivel a felhasználók vélhetően széleskörű készülékparkokkal rendelkeznek.

Korábbi munkánk során a terazosin és specifikált szennyezőinek elválasztását vizsgáltuk, új megközelítésben, 5 perc alatti elemzési idővel [2]. Ennek alapján, illetve a módszerrel szembeni korlátoknak és elvárásoknak megfelelően detektálási hullám-



**1. ábra** Terazosin és Ph. Eur. szennyezőinek szerkezeti képlete, specifikált szennyezők: ImpA, ImpB, ImpC, ImpE, ImpJ, ImpK, ImpL, ImpM, ImpN, ImpO [1]

hossznak 220 nm-t, kiindulási szerves oldószertartalomnak 5 % MeOH-t, injektálási térfogatnak pedig 1  $\mu$ L-t állítottunk be. Állófázisnak a Kinetex EVO C18-as töltetet választottuk, mely ötvözi a C18-as állófázisok tulajdonságait a hibrid állófázisok előnyeivel. Továbbá a széleskörű felhasználás, valamint az eltérő készülékparkok miatt a 100 mm hosszú, 3,0 mm átmérőjű és 2,6  $\mu$ m szemcseátmérőjű kolonnadimenzió mellett döntöttünk.

A módszer ugyan kiküszöböli az említett hátrányokat, de nem alkalmazható szennyezésprofil vizsgálatra, mert a magas mozgófázis *pH* miatt bomlik a hatóanyag (*pH* > 10). A bázikus vegyületek elválasztásának következő lehetősége, hogy azokat protonált formájukba hozzuk. Ekkor a mozgófázis *pH*-nak az adott összetételű mozgófázisban mért legnagyobb *pKa* értékű bázishoz viszonyítva 2 egységgel kisebbnek kell lenni. Az elválasztások ebben az esetben olyan *pH* értékeken történnek, ahol a nem reagált, de a vizsgált vegyület számára hozzáférhető szilanolok ionizációja visszaszorított. Ezen körülmények biztosításához kiindulási mozgófázisnak *pH* = 2-es, 0,1 V/V %-os vizes HClO<sub>4</sub>-oldatot alkalmaztunk. Ebben az esetben a komponensek ugyan szelektíven elvááltak egymástól, de az Imp N és Imp L komponensek visszatartása nem volt megfelelő.

#### Módszeroptimalizálás

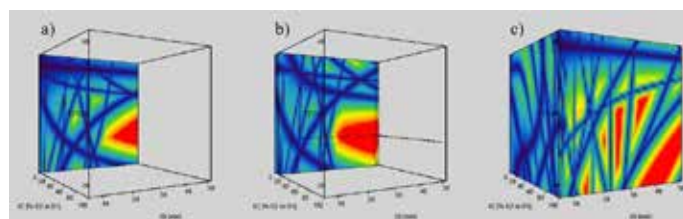
Kis visszatartású komponensek esetén a retenció növelhető, ha alternatív állófázist alkalmazunk az elválasztás során. Erre egy speciális felületmódosítású, pentafluorozott-fenil (PFP) állófázist, a Kinetex F5-öt választottuk. Ebben az esetben már megfelelő a visszatartása minden komponensnek, szelektíven elválasztható az összes szennyező, valamint az elemzési idő viszonylag rövid, 20 percen belüli. Ugyanakkor a nagy MeOH-tartalmú mozgófázis miatt viszonylag szélesek a zónák, nem egyenes az alapvonal, valamint nagy a rendszer nyomásesése. Ezen hátrányok kiküszöbölésére megvizsgáltuk, hogyan viselkedik a rendszer, ha terner mozgófázis összetételt alkalmazunk az elválasztás során.

A terner mozgófázis elválasztásra gyakorolt hatását DryLab háromdimenziós modellezéssel végeztük el, olyan módon, hogy – állandó, *pH* = 2-es érték mellett – harmadik dimenzióként a terner mozgófázis összetételt választottuk. Az alkalmazott rendszerben a mozgófázis „A” komponense 0,1 V/V %-ban HClO<sub>4</sub>-at tartalmazó, *pH* = 2-es vizes oldat, míg a mozgófázis „B” komponense tiszta ACN, tiszta MeOH, illetve ezek különböző arányú elegyei voltak. A kísérletek megkezdése előtt első lépésben ki kell jelölni a vizsgált faktorokat, és fel kell építeni a kísérlettervet. A faktorok a gradiens idő (*t<sub>g</sub>*), a hőmérséklet (*T*) és a terner mozgófázis összetétel (*t<sub>c</sub>*). A háromdimenziós modell felépítéséhez az összes komponenst tartalmazó mintaoldatot injektáltuk, 12 különböző faktorszint beállítással. Az egyes kísérleti pontokban a mozgófázis térfogati áramlási sebessége

0,5 ml/perc, az injektálási térfogat 0,5  $\mu$ L, a detektálás hullámhossza pedig 220 nm volt. Ezt követően a 12 alapkísérletből kapott kromatogramok segítségével fel lehet építeni a háromdimenziós DryLab „kockát” [3], melynek segítségével egy olyan tervezési teret (Design Space, DS) kapunk, ahol az  $R_{S, krit.} > 1,5$  feltétel teljesül. Az említett piros színű területen belül jelöltük ki a munkapontot, melynek koordinátái a következők: *T* = 25 °C, *t<sub>g</sub>* = 50 perc és *t<sub>c</sub>* = ? ACN/MeOH = 90/10. A gradiens meredekség 1,5 %B/perc, míg az utoljára eluálódó komponens retenciósideje 17,5 perc, vagyis ezzel a lépésközzel 5-35 % szerves oldószertartalomig eljutva, az elemzési idő 20 perc alá csökkenthető. Háromdimenziós Drylab modell és a végleges módszer

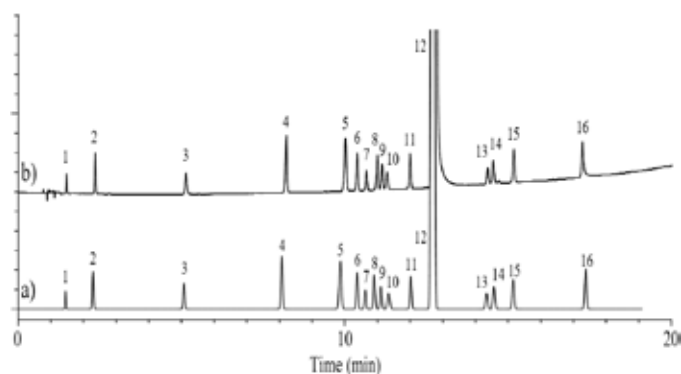
A kromatográfias modellezés, beleértve szimulált kromatogramok kiszámításának lehetőségét, megköveteli a megfelelő csúcsazonosítást, illetve csúcskövetést. Ezt azt jelenti, hogy a különböző kísérleti beállításokhoz tartozó futtatások során tudnunk kell, hol eluálódnak az egyes komponensek a kromatogramon. Ez könnyen kivitelezhető a csúcsterületek összehasonlításával, mivel a csúcsterületek várhatóan állandóak maradnak egy *t<sub>g</sub>* – *T*-modellben, így a minta, az injektált minta mennyisége, az áramlási sebesség és a detektálási hullámhossz is állandó marad. Ezen megállapításokat felhasználva tudjuk felépíteni a háromdimenziós „kockát”, amivel az elválasztást modellezzük.

A 2. ábrán az optimális, ACN/MeOH = 90/10 értéknél lévő *t<sub>g</sub>* – *T* sík mellett (2. b), a modell két tisztán szerves oldószert tartalmazó (ACN vagy MeOH) tartalmú *t<sub>g</sub>* – *T* síkjait ábrázoltuk. Látható, hogy ugyan az a) esetben is található megfelelő munkapontot, viszont ennél a piros színnel jelzett, robusztus tartomány (DS) jóval kisebb, mint a b) esetben. Ha a munkapont a 100 % ACN-hez tartozó síkban lenne kijelölve, akkor sokkal nagyobb lenne a koelúció esélye, mivel a beállítások kismértékű megváltozásával könnyen a módszeralkalmazhatósági határhoz (Method Operable Design Region, MODR), vagy azon kívül kerülünk. Az ábrán továbbá látható, hogy a c) esetben egyértelműen romlik az elválasztás. Tiszta MeOH-t tartalmazó kockában a piros színű tartományok szűkebbek, valamint a korábban említett hátrányok (alapvonal emelkedés, zónaszélesedés, nagy nyomáskülönbség) is közrejátszanak. Következésképpen elmondható, hogy a *t<sub>c</sub>* alkalmazása (2. b) ábra) kedvez az elválasztásnak, vagyis a kockában kiterjedtebb a DS.



**2. ábra** 3 dimenziós DryLab modellek különböző *t<sub>c</sub>* értékeknél Kinetex F5 állófázist alkalmazva: a) 100 % ACN, b) ACN/MeOH = 90/10, c) 100 % MeOH

Az ilyen körülmények között elvégzett szimuláció és a kísérleti kromatogram jó egyezést mutatnak (3. ábra). A szimulált és mért felbontás értékek is nagyon hasonlóak. Az  $R_{S, krit.}$  értéke Imp I és Imp J közötti kritikus csúcspárra szimulált kromatogram esetén 1,65-nek, míg a mért kromatogram esetén 1,61-nek adódott, ami azt jelenti, hogy a módszerrel mind a 16 komponensre alapvonalas elválasztást kapunk.



**3. ábra** Terazosin és szennyezőinek szimulált a) és mért b) kromatogramja.

Számozás: 1: Imp N, 2: Imp L, 3: Imp O, 4: Imp C, 5: Imp A, 6: Imp B, 7: Imp G, 8: Imp D, 9: Imp H, 10: Imp M, 11: Imp F, 12: Terazosin, 13: Imp I, 14: Imp J, 15: Imp K, 16: Imp E

A végleges módszer paramétereit a 1. táblázat tartalmazza. Az UHPLC készülékek kialakításbéli különbségeinek köszönhetően a gradiens táblázatban számolni kell a késleltetési idővel ( $t_D$ ), ami az egyes készülékek gradiens késleltetési térfogatától ( $V_D$ ), valamint a beállított áramlási sebességtől ( $F$ ) függ.

#### 1. táblázat A végleges módszer körülményei

Készülék	UHPLC rendszer		
Kolonna	Kinetex 2,6 $\mu$ F5, 100 x 3,0 mm		
Oldószer	MeOH/H <sub>2</sub> O = 70:30 (V/V %)		
Minta koncentráció	2,0 mg/ml		
Mozgófázis			
“Eluens A”	0,1 V/V %-os HClO <sub>4</sub> -oldat		
	HClO <sub>4</sub> -oldat készítése: 1,0 ml cc. HClO <sub>4</sub> / 1,0 L H <sub>2</sub> O		
“Eluens B”	ACN/MeOH = 90/10 (V/V %)		
Módszer	Gradiens elúció		
Gradiens táblázat	t (perc)	Eluens A (%)	Eluens B (%)
	0	95	5
	1- $t_D$ *	95	5
	20 + (1- $t_D$ *)	65	35
Ekvibrálási idő	4 perc		
Áramlási sebesség	0,5 ml/perc		
Kolonna hőmérséklet	25 °C		
Minta hőmérséklet	20 °C		
Detektálás	220 nm		
Injektált térfogat	0,5 $\mu$ L		

$$*t_D = V_D / F$$

#### Késleltetési térfogat hatása

Kromatográfias módszerek átadásakor sokszor okoz gondot a különböző rendszerek és kolonnák közötti módszertranszfer. Gyakori probléma, hogy régebbi, meglévő konvencionális HPLC módszereket transzferálunk UHPLC módszerre vagy éppen az ellenkezője, hogy az UHPLC módszereket kell hagyományos oszlopra/készülékre átdolgozni, mert az átvevő laboratóriumban csak az áll a rendelkezésre. Gyakorlati szempontból fontos, hogy az eltérő típusú készülékeknél és kolonnáknál a módszertranszfer hogyan oldható meg.

A készülékek közötti átjárhatóság vizsgálatára három különböző UHPLC rendszert használtunk (Acquity UPLC I-Class, Acquity UPLC H-Class és Agilent 1290 Infinity II). Kialakításukat tekintve az I-Class bináris az H-Class és Infinity II kvaterner pumparendszerrel rendelkezik.

A bináris pumparendszerrel felszerelt készülékek kisebb, míg a kvaterner pumparendszerű készülékek nagyobb késleltetési térfogattal ( $V_D$ ) rendelkeznek. A kialakításbéli különbségeknek köszönhetően a folyadékkromatográfias módszerek jellemzően előírnak egy izokratikus szakaszt, amely megelőzi a gradiens program indítását; ezáltal úgy módosíthatjuk a gradiens program időpontjait, hogy figyelembe tudjuk venni a módszer kidolgozására alkalmazott rendszer és az általunk használt rendszer  $V_D$ -jeinek különbségét. Ebből kifolyólag ahhoz, hogy transzferálható módszert kapjunk, minimális  $V_D$ -re szükség van. A kifejlesztett módszernek tartalmaznia kell 0,5 ml  $V_D$ -t, a 0,5 ml/perc térfogat áramlási sebesség ( $F$ ) mellett. Ez úgy oldható meg, ha  $t_D = 1$  perc hosszú izokratikus szakaszt iktatunk be a gradiens program elé. A beiktatott  $V_D$  nagysága készülékfüggő. Abban az esetben, ha  $V_D = 0,1$  ml (Acquity UPLC I-Class), akkor 0,4 ml plusz térfogat szükséges. Ha  $V_D = 0,4$  ml (Acquity UPLC H-Class), akkor 0,1 ml plusz térfogat szükséges. Ha pedig  $V_D = 0,5$  ml (Agilent 1290 Infinity II), akkor nincs szükség plusz térfogatra.

#### Kolonna felcserélhetőség

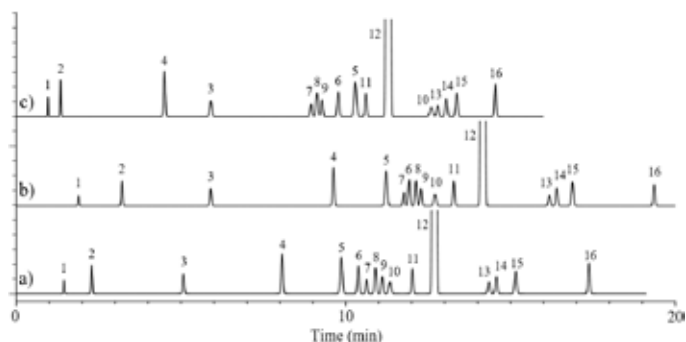
Napjainkban minden kolonna forgalmazó cég számtalan eltérő típusú állófázist kínál a különböző analitikai feladatok megoldására. Ezen töltetek eltérő szelektivitásából következik, hogy egy kifejlesztett módszert nem mindig lehet egyik oszlopról a másikra változtatlanul átvinni. Külön kiemelendő, hogy az eltérő gyártási helyről származó, de a hivatalos besorolás alapján azonos kategóriába tartozó állófázisoknál is problémát jelent a kolonnáról-kolonnára történő adaptálás. Ennek oka, hogy a folyadékkromatográfiában az elválasztás sok paramétertől függ. A szelektivitást, amely döntően befolyásolja az elválasztást, megszabják az állófázis felületi fizikai-kémiai tulajdonságai. Az ICH guideline-ok javasolják, hogy a robusztusság vizsgálat során ne csak az azonos gyártótól származó, eltérő



gyártási számú állófázissal végezzünk méréseket, hanem keressünk ún. alternatív állófázist (másik gyártó hasonló besorolású kolonnája) [4, 5].

Munkánk során három PFP-állófázist (Kinetex F5, SpeedCore PFP, Poroshell 120 PFP) hasonlítottunk össze. A referencia oszlop a Kinetex F5 volt, és célként azt tűztük ki, hogy megtaláljuk a megfelelő helyettesítő oszlopot. Mind a három oszloppal elkészítettük az 3. pontban leírt DryLab modellt.

A 4. ábrán látható, hogy mindhárom állófázis esetén sikerült megoldani az alapvonalas elválasztást az összes komponense nézve, de más mérési körülmények között. A Kinetex F5 kolonnán beállított mérési paramétereken (1. táblázat) kapott kromatogramok láthatók az 5. ábrán. A komponensek retenciós sorrendje mindhárom kolonna esetén különbözik, tehát eltérő a szelektivitás. Ugyanakkor az EDQM szerint a validálás során csak a specifikált szennyezőket (Imp A, Imp B, Imp C, Imp E, Imp J, Imp K, Imp L, Imp M, Imp N, Imp O) kell figyelembe venni. Ezen komponensek retenciós sorrendje a Kinetex F5 és a SpeedCore PFP kolonnák esetén megegyezik, míg a Poroshell 120 PFP oszlop esetén különböző. Emellett az utóbbinál az Imp N és az Imp L komponenseknek nincs megfelelő visszatartása sem. Következésképpen ebben az esetben a SpeedCore PFP alkalmazható alternatív állófázisként a specifikált szennyezők vizsgálatára.



**4. ábra** 0,1 %-os szinten szpájkolt terazosin oldatról felvett kromatogramok a legjobb munkapontokon: a) Kinetex F5, b) SpeedCore PFP, c) Poroshell 120 PFP.

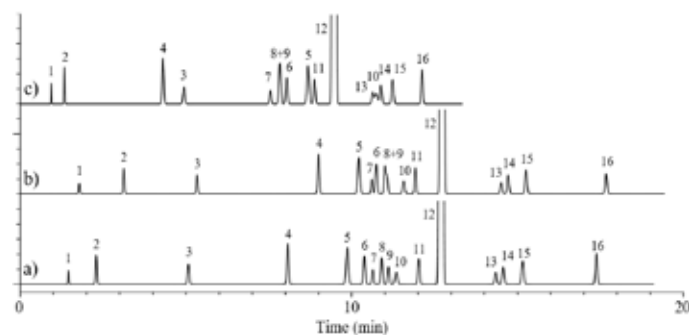
Számozás: 1: Imp N, 2: Imp L, 3: Imp O, 4: Imp C, 5: Imp A, 6: Imp B, 7: Imp G, 8: Imp D, 9: Imp H, 10: Imp M, 11: Imp F, 12: Terazosin, 13: Imp I, 14: Imp J, 15: Imp K, 16: Imp E

#### Összefoglalás

A 12 kísérleten alapuló folyadékkromatográfias módszeroptimalizálás (DryLab) megbízható eljárás az optimális elemzési idő, felbontás és munkapont meghatározására, illetve összehasonlítására. Alapvetően a 100 x 3 mm-es dimenziójú oszlopok alkalmazásával kb. 5-6 órányi kísérleti munka szükséges egy adott

állófázishoz tartozó munkapont meghatározásához, de ezzel a megközelítéssel egy kolonna - adott alkalmazáshoz való - alkalmasságát, illetve felcserélhetőségét a módszerfejlesztés nagyon korai szakaszában lehet értékelni. Elmondható, hogy ez a megközelítés egy ígéretes módszerfejlesztési stratégia is egyben, mivel tartalmazza a kezdeti futások végrehajtását, és a háromdimenziós modellek különböző oszlopokkal történő felépítését a módszerfejlesztés korai szakaszában. A legmegfelelőbb alternatív oszlop kiválasztásához az optimalizáló szoftver új verziója (DryLab4 v.4.3.1) lehetővé teszi, hogy a felhasználó összehasonlítsa a háromdimenziós felbontási térképek azon részeit, ahol az alapvonalas elválasztás ( $R_{S, krit.} > 1,5$ ) kritériuma teljesül.

Az optimalizálási stratégiának köszönhetően, a terazosin szennyezésprofil vizsgálatára sikerült a ~85 perc időtartamú, eredeti két módszer helyett egyetlen, 20 perc alatti elemzési idejű módszert fejlesztenünk, melyhez két külön gyártó pentafluorozott-fenil (PFP) kolonnáit egyaránt lehet alkalmazni.



**5. ábra** 0,1 %-os szinten szpájkolt terazosin oldatról felvett kromatogramok a Kinetex F5 munkapontján: a) Kinetex F5, b) SpeedCore PFP, c) Poroshell 120 PFP.

Számozás: 1: Imp N, 2: Imp L, 3: Imp O, 4: Imp C, 5: Imp A, 6: Imp B, 7: Imp G, 8: Imp D, 9: Imp H, 10: Imp M, 11: Imp F, 12: Terazosin, 13: Imp I, 14: Imp J, 15: Imp K, 16: Imp E

#### Irodalomjegyzék

- [1] European Pharmacopeia (Ph. Eur.) 10.0, Terazosin Hydrochloride Dihydrate 01/2017:2021, 3976-3978.
- [2] R. Kormány, I. Molnár, J. Fekete, Renewal of an old European Pharmacopoeia method for Terazosin using modeling with mass spectrometric peak tracking, J. Pharm. Biomed. Anal., 135 (2017) 8-15.
- [3] J. Fekete, R. Kormány, Sz. Fekete, A folyadékkromatográfia fejlesztési irányjai, Gyors folyadékkromatográfia, Merck Kft. (2014).
- [4] ICH Q2 (R1) / Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.
- [5] ICH Q8 (R2) / Guidance for industry. Pharmaceutical Development, 2009.

# A Strata-X PRO és a hagyományos szilárd fázisú extrakció (SPE) összehasonlítása savak, bázisok és semleges vegyületek plazma mintákból történő elválasztása esetében

Matthew Brusius és James Turner  
Phenomenex, Inc.  
Fordította: Szabó Géza  
Gen-Lab Kft.

## Áttekintés

A szilárd fázisú extrakció (SPE) egy széleskörűen használt mintaelőkészítési módszer, melyet előszeretettel használnak kromatográfias elemzések előtt is. Ezt az eljárást legtöbbször összetett minta mátrixok esetén alkalmazzák, segítségével eltávolíthatjuk azon komponenseket, amelyek jelenléte később jelentős problémákat okozhat a kromatográfias mérésnél. Gyakran használják kismolekulás gyógyszerek biológiai mintákból történő tisztításához, úgymint sérumból, plazából, vizeletből, vagy gerincvelői folyadékból. A mintáink tisztításán kívül az SPE alkalmas még dúsításra, valamint oldószer cserét (pl. NP - RP) is el lehet rajta végezni.

Az SPE nagyon előnyös lehet az analitikusok számára, mégis gyakran bonyolultnak és időigényesnek tartják, ami miatt sajnos sokan tartózkodnak a technika alkalmazásától.

Hagyományosan minimum 5 lépésből áll az SPE mintaelőkészítés:

- szilárd fázis kondicionálása
- szilárd fázis ekvilibrálása
- minta felvitele
- mosás, melynek során eltávolítjuk a kevésbé kötődő szennyezőket
- szárítás (ettől néhány módszer esetében el lehet tekinteni)
- mérendő frakció eluálása

Jelen cikkben egy gyors és hatékony SPE állófázissal, a Strata-X PRO segítségével választottunk el különböző savas, bázikus és semleges vegyületeket plazma mintákból. A Strata-X PRO egy mátrix eltávolító adalékkal kombinált fordított fázisú SPE állófázis, melynek használatával több lépést is átugorhatunk, mégis nagy visszanyerést, jó reprodukálhatóságot és tisztább mintákat kaphatunk, ezzel együtt elkerülhetjük a hagyományos SPE módszereknél megszokott hosszas, bonyolult fejlesztést, kiküszöbölhetjük a mátrixhatást, és jelentős visszanyerést érhetünk el nagyon poláros vegyületek esetében is.

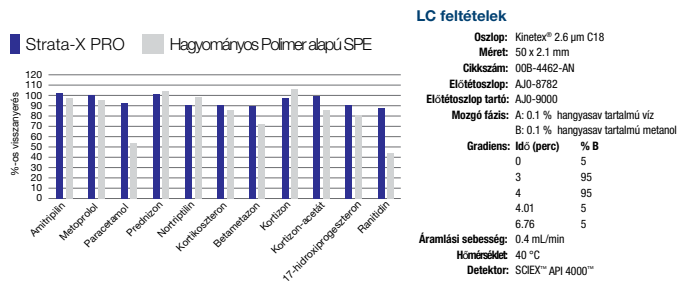
## Strata-X PRO protokoll

96-Well Plate: Strata-X PRO, 30 mg  
Cikkszám.: 8E-S536-TGA  
Mintafelvitel: 400 µL plazma / víz + 0,1% HCOOH = 1 / 1 (V/V%)  
Mosás: 1 ml 5 % metanol tartalmú víz  
Szárítás: 1 perc  
Eluálás: 1 ml ACN / MeOH = 90 / 10 (V/V%) + 0,1% HCOOH  
Szárítás: 1 perc  
Regenerálás: 200 µL 5 % metanol tartalmú víz

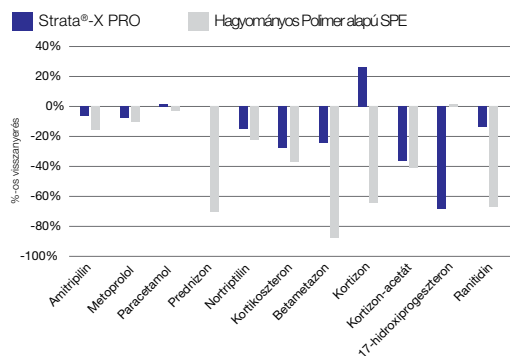
## Polimer alapú SPE protokoll

Kondicionálás: 1 ml metanol  
Ekvilibrálás: 1 ml víz  
Mintafelvitel: 400 µL plazma / víz + 0,1% HCOOH = 1 / 1 (V/V%)  
Mosás: 1 ml víz / MeOH = 95 / 5 (V/V%)  
Szárítás: 1 perc  
Eluálás: 1 ml ACN / MeOH = 90 / 10 (V/V%) + 0,1% HCOOH  
Szárítás: 1 perc  
Regenerálás: 200 µL 5 % metanol tartalmú víz





**1. ábra** Savak, bázisok és semleges vegyületek visszanyerése Strata X- PRO, illetve hagyományos Polimer alapú SPE oszlopon



**2. ábra** A mátrixhatás Strata-X PRO, illetve Polimer alapú SPE oszloponon

## Eredmények

Amíg a hagyományos SPE töltetek esetében szükségük van egy kiindulási kondicionálási és egy ekvilibrálási lépésre, addig a Strata-X PRO használata esetében ezektől eltekinthetünk. Az előkészített mintákat akár azonnal felvihetjük az SPE oszlopra. Ezen két lépés kihagyásával nemcsak, hogy egyszerűsíthetjük és rövidíthetjük módszerünket, hanem még oldószer felhasználásunkat is csökkenthetjük. Az 1. táblázatban látható, hogy a visszanyerést nem befolyásolja az eljárás, sőt metoprolol, paracetamol és ranitidin esetében, amelyek a mintasorozat legpolárisabb vegyületei, még javul is.

A mosó eluens meghatározó lehet a visszanyerés és a tisztaság szempontjából, az ideális kondíciók megtalálása magas visszanyerési értéket biztosíthat. Strata-X PRO esetében az általános 5% metanol tartalmú vizes mosás jobb mátrixhatás-értékeket eredményezett a legtöbb általunk vizsgált minta esetében, vagyis ugyanazon módszert alkalmazva a plazma minták

tisztábbak lettek, mint a hagyományos polimer alapú SPE oszlopok használatával (2. ábra). Ezen kívül az 5% metanol tartalmú vizes mosó eluens nem befolyásolta a visszanyerést, sőt javította is azt egyes esetekben.

## 1. táblázat Visszanyerési eredmények

Vegyület	visszanyerés Strata-X PRO-n (%)	visszanyerés polimer SPE-n (%)
Amitripiлин	102	97
Metoprolol	100	94
Paracetamol	92	54
Prednizon	101	104
Nortriptilin	90	98
Kortikoszteron	91	86
Betametazon	90	73
Kortizon	97	106
Kortizon-acetát	99	85
17-hidroxi-progeszteron	90	81
Ranitidin	88	44

A visszanyerésben mutatott különbség (1. táblázat) a paracetamol és a ranitidin esetében volt a leglátványosabb. Hagyományos SPE töltetről Strata-X PRO-ra történő váltást követően jelentősen nőtt a visszanyerés. Ez a két vegyület volt a legpolárisabb a mért komponensek között, vagyis ezek jelentik a legnagyobb kihívást a fordított fázisú elválasztás során. Ez azt bizonyítja, hogy a polárisabb anyagok erősebben kötődnek mintafelvitel és mosási lépés alatt, ahol korábban a hagyományos SPE töltetek használatánál a legnagyobb volt a veszteség. A paracetamol a leggyengébb sav, a ranitidin pedig egy gyengébb bázis a vizsgált vegyületek között. Mindkettő visszatartása esetében a Strata-x PRO hatékonyabbnak bizonyult ugyanazon mintafelviteli kondíciók mellett és a 0,1 % hangyasavas ACN/MeOH (90:10) eluáló oldószer használata is elegendőnek bizonyult a leoldáshoz.

A 2. ábra adatai szerint a legtöbb vizsgált anyag esetében a mátrixhatás kevésbé volt befolyással a Strata-X PRO használatakor, ami azt jelenti, hogy több mátrix távolítható el a mosási lépésnél, vagy szeletívebben tarthatjuk vissza azt az elúciós lépésnél. A Strata-X PRO továbbfejlesztett mátrix eltávolító technológiájának köszönhetően a mátrix hatás nagyban csökkenthető, használatával a foszfolipidek is hatékonyabban eltávolíthatók és jóval érzékenyebb analízist végeztünk.

## Konklúzió

A hagyományos SPE töltethez képest a Strata-X PRO segítségével egyszerűsíthetjük és lerövidíthetjük a minta előkészítésünk folyamatát, ezzel együtt növelhetjük a visszanyerést, ráadásul csökkenthetjük a mátrix hatást is.

# Kedves Kollégák!

**2020. április 15–29. között** harmadik alkalommal kerül megrendezésre a KromKorm Kft. és a Gen-Lab Kft. kromatográfias tanfolyama (LC/GC tanfolyam), melynek tematikáján az előző tanfolyamok tapasztalatait és a felmerülő igényeket figyelembe véve némileg változtattunk.

Ezúttal is gyakorlatorientált elméleti képzést tervezünk, de a tanfolyam résztvevői a képzést követően jelentkezhetnek két napos laboratóriumi gyakorlatra (a gyakorlatról további információ kérhető a [info@kromkorm.hu](mailto:info@kromkorm.hu) e-mail címen).

**Az elméleti képzés közel 50 óra (33 x 90perc) tematikusan felépített előadásból és 11 óra (11 x 60perc) diszkuszióból áll, ehhez választható modulonként kétnapos laborgyakorlat.**

Időbeosztás: GC – 3 nap/ LC – 5 nap/ MS – 3 nap

A tanfolyam nem tartozik a 2013. évi LXXVII. felnőttképzési törvény hatálya alá, de a részvételről igazolást állítunk ki.

A tanfolyam minden résztvevője megkapja az általa hallgatott előadások diárait nyomtatott formában, továbbá a legalább öt képzési napra regisztrálók kapnak egy példányt a

**„Fekete J., Kormány R., Fekete Sz. (szerk.): Modern folyadékkromatográfia” című könyvből.**

## Kinek ajánljuk?

- A tanfolyamot ajánljuk mindazoknak, akik napi munkájuk során folyadék- vagy gázkromatográfiával foglalkoznak, legyenek kezdő vagy haladó szinten. Az előadások tematikája úgy lett megszerkesztve, hogy a kezdők számára is érthető/követhető legyen, de egy nagyobb gyakorlattal rendelkező kromatográfus is találjon benne újdonságot.

- Emellett ajánljuk azoknak is, akik csak a kromatográfia eredményeit használják munkájuk során (pl. szerves preparatív vegyészek, minőségirányítási szakemberek...), hogy nagyobb rálátásuk legyen a kapott adatok valóság tartalmának megítélésére.

A tanfolyam oktatói:

**Dr. Drahos László (MS)**

**Dr. Fekete Szabolcs (LC)**

**Dr. Göröcs Noémi (GC)**

**Dr. Horváth Krisztián (LC)**

**Dr. Kormány Róbert (LC)**

**Helyszín:** Budapest XIII.kerület,  
Radnóti Miklós utca 2.  
VI.emelet MKVKOK Oktatási bázisa (Vizsgaterem)

A tanfolyam díja (ÁFA-mentes):

Teljes tanfolyam (LC–GC–MS)	11 nap	<b>280 000Ft</b>
Folyadékkromatográfia–gázkromatográfia (LC–GC)	8 nap	<b>225 000Ft</b>
Folyadékkromatográfia–tömegspektrometria (LC–MS)	8 nap	<b>225 000Ft</b>
Gázkromatográfia–tömegspektrometria (GC–MS)	6 nap	<b>180 000Ft</b>
Folyadékkromatográfia (LC)	5 nap	<b>160 000Ft</b>
Gázkromatográfia (GC)	3 nap	<b>110 000Ft</b>
Tömegspektrometria (MS)	3 nap	<b>110 000Ft</b>

Jelentkezni az [info@kromkorm.hu](mailto:info@kromkorm.hu) e-mail címen lehet 2020.04.14-ig, a kitöltött jelentkezési lap visszaküldésével.

**A 2020. március 15-ig jelentkezők 10% engedményt kapnak a részvételi díjból!**

## Jelentkezési feltételek:

- A tanfolyamokat minimum 10 fő/nap jelentkezés esetén indítjuk, maximális létszám 25 fő/nap (a jelentkezéseket a jelentkezési lapok beérkezési sorrendjében fogadjuk).

- Amennyiben a létszám a jelentkezési határidőig nem éri el a minimális (10 fő/nap) szintet, a jelentkezőket értesítjük a tanfolyam elmaradásáról.

- Amennyiben a létszám eléri a maximális (25 fő/nap) szintet, hírlevelet küldünk ki, miszerint az adott kurzusra nem tudunk több jelentkezőt fogadni.

- A tanfolyamra jelentkezni a kitöltött és aláírva visszaküldött jelentkezési lappal lehet, mely megrendelésnek minősül.

- A tanfolyam nem mondható le a jelentkező részvételben való akadályoztatása esetén sem, de a Költségviselő a tanfolyam kezdete előtt a részvételi jogot másra átruházhatja. Erről a szervezőt írásban köteles értesíteni legkésőbb egy nappal a tanfolyam kezdete előtt.

- A részvételi díj számlázása a tanfolyamot követően történik.

2020

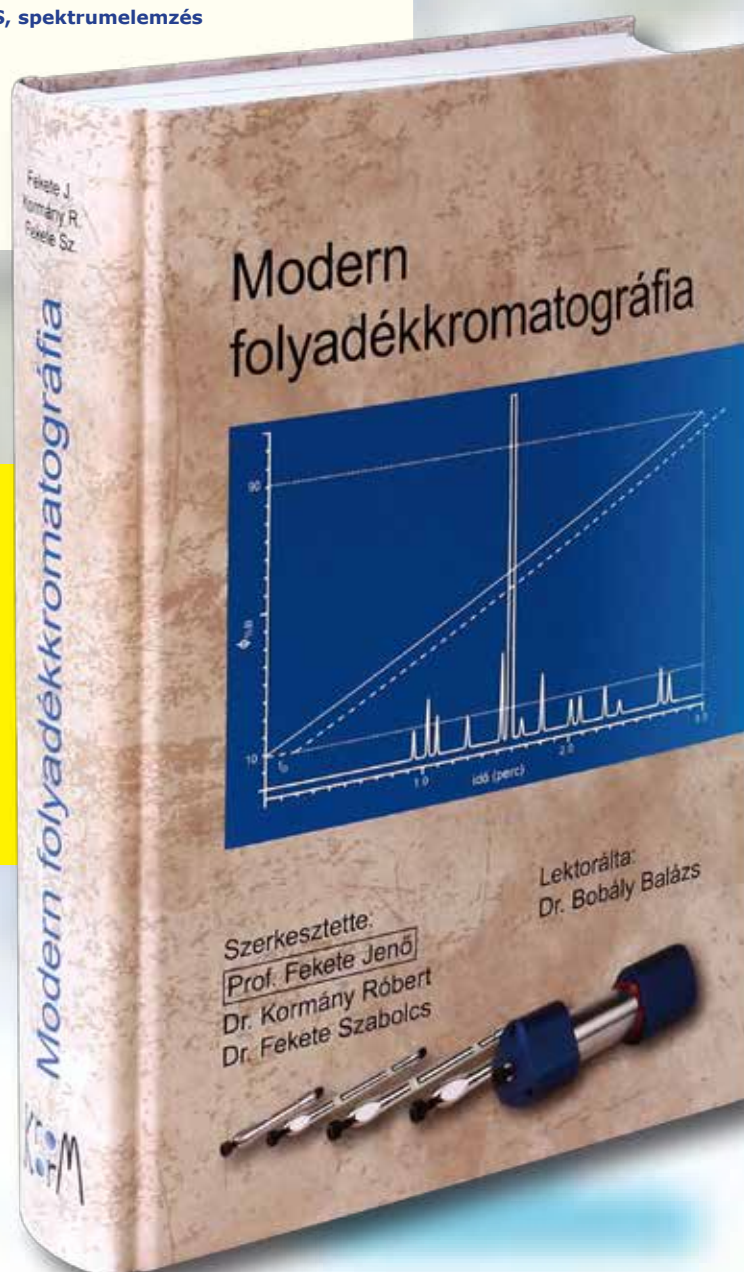
## LC/GC tanfolyam 2020 rövid szakmai program

(bővebben: [www.kromkorm.hu](http://www.kromkorm.hu))

- 04.15 A gázkromatográfia (GC) alapjai, műszerezettség (Göröcs Noémi)
- 04.16 GC mozgó- és állófázisok, gőztéranalízis (HS), minőségi és mennyiségi elemzés (Göröcs Noémi)
- 04.17 Gyakorlati tippek, trükkök, mintaelőkészítés, a GC alkalmazási területei (Göröcs Noémi)
- 04.20 A folyadékkromatográfia (HPLC) alapjai, mérési adatok értékelése (Horváth Krisztián)
- 04.21 HPLC-s technikák (NP, RP, HILIC, optikai izomerek elválasztása) (Kormány Róbert)
- 04.22 Műszerezettség, gyorsfolyadékkromatográfia, 2D-LC, ionkromatográfia (IC) (Kormány Róbert, Horváth Krisztián)
- 04.23 Kísérlet tervezés (Fekete Szabolcs, Kormány Róbert)
- 04.24 Fehérje vizsgálati módszerek (RP, HIC, HILIC, SEC, IEX) (Fekete Szabolcs)
- 04.27 A tömegspektrometria (MS) alapjai, GC/MS, spektrumelemzés (Drahos László)
- 04.28 LC/MS, spektrumelemzés (Drahos László)
- 04.29 Spektrumelemzés, proteomika (Drahos László)

### Kedves Kollégák!

Év végéig megrendelhetik  
a **Modern folyadékkromatográfia c.**  
könyvet 9900 forint helyett csupán  
**4200 forintért,**  
csak a Gen-Lab Kft.-nél!



# Analitikai célú laboratóriumi műszerek kapacitáskihasználásának vizsgálata hazai szervezeteknél

Tolnay Anita, Dr Koris András  
LabEx Kft.

A jelen cikkben egy olyan módszer kerül bemutatásra, ami a kromatográfiai műszerek kapacitáskihasználásának mérésére és értékelésére irányul a két fő ágazatban, a nonprofit és a profit szektorban. A költségvetési intézményi laboratóriumokban, főként az Európai Unió Operatív Programja által finanszírozott beszerzéseket vizsgáltuk. A felmérés elsődleges célja a megfelelő laboratóriumi kapacitáskihasználás, valamint a teljesítménymérés meghatározása a két szektorban. A kutatás igyekszik rávilágítani a szektorok közötti működésbeli eltérésekre és vizsgálja azok kiváltó okait. A laboratóriumi eszközök kapacitáskihasználásának (CU – Capacity Utilisation) különbségei az egyes szektorok közötti eltérésekből fakadnak, főként olyan kutatási célú tevékenységekből, mint például az egyetemi vagy tudományos alap kutatás, szemben a saját laboratóriumi saját alkalmazott kutatásokkal vagy a szerződéses laboratóriumok külsős mérési megbízásaival. A méréseket kérdőíves felmérés segítségével, holtidő indikátorok alkalmazásával végeztük 12 hónap / év időszakra vetítve 2018-ban.

Az elemzés során meghatározzuk a műszerhasználat laboratóriumi időhatékonysági mutatóját a fel nem használt kapacitás és az esetleges tartalékkapacitást meghatározó egyéb időbeli tényezők feltárásával. Célunk az ágazati laboratóriumi kutatási teljesítmény átláthatóságának növelése, valamint a felmerülő akadályok azonosítása a fenntartható gazdasági növekedés elérése érdekében az EU által finanszírozott hosszú távú K+F tevékenység során.

A kapacitásfelhasználás kapacitásának és modelljeinek meghatározása

A szakirodalom szerint a kapacitáskihasználás mértékét (CU) sok éven át használták a gazdaság jelenlegi „állapotára” és a létező kontrakciós erők elemzésére (Segerson, 1990). A közgazdasági szakirodalomban a kapacitásmérés két főcsoportra osztható, nevezetesen a Gold kapacitásának fizikai meghatározása 1955-ben, pusztán a termelési függvény fogalmának felhasználásával, amelyet Johansen 1968-ban tovább fejlesztett csak egyetlen kimeneti technológiára, amely meghatározta az egység maximális termelhető mennyiségét időben. Miközben az elmúlt évtizedekben a „gazdasági kapacitás meghatározása” alatt gazdaságosabb jelentőségű mérőszámokat értettek,

olyanokat, amelyek szorosan kapcsolódtak a szilárd magatartás gazdasági elméletéhez (Coelli et al., 2000). Számos alternatív CU javaslatot fogalmaztak meg, de általánosan elfogadott módszer a mai napig nem született a CU mérésére. Prior és Filimon (2002) szerint a CU arány egyik legelterjedtebb definíciója a tényleges kimenet és a potenciális kimenet aránya. A kimenet bármely technikai megközelítéssel meghatározható, amelyre a potenciális kimenet a rövidtávon előállított maximális kimeneti mennyiséget képviseli (Vestergaard et al., 2003).

Vestergaard (2003) szerint, a kapacitást úgy lehet meghatározni, mint egy vállalkozás vagy iparág azon képességét, hogy potenciális kimenetet állítson elő. A kapacitásnak két különböző mérőeszköze van: az egyik műszaki-gazdasági módszeren alapszik, míg a másik szigorúan gazdasági elven nyugszik (Morrison, 1985). A technológiai-gazdasági intézkedés a Johansen (1968) által kínált kapacitás fogalma, mely szerint „... Az időegységre jutó maximális mennyiséget a meglévő felszerelésekkel vagy berendezésekkel lehet meghatározni, feltéve, hogy a változó termelési tényezők rendelkezésre állása nem korlátozott”. Segerson (1990) szerint a CU intézkedések elméleti és empirikus elmélete egy termékre korlátozódik, míg a valóságban a legtöbb vállalat több terméket állít elő.

Számos kapacitáskihasználási modell és költségmérés történt a kapacitás kihasználtságának és költségének mérésére. Ezeket a modelleket a kapacitásmérések szerint csoportosítják:

- *Elméleti kapacitás:* az optimális munka mennyisége, melyet 24 órában lehet elvégezni nulla hulladék nélkül.
- *Gyakorlati kapacitás:* elméleti kapacitás mínusz elkerülhetetlen termelési idő (eszközkészítés, karbantartás, bontások).
- *Normál kapacitás:* egy laboratóriumi eszköz átlagos kihasználtsága

A kapacitáskihasználás mérésekor egy másik fontos tényező az elemzés időkeretének megfontolása. A kapacitáskihasználási idő függvénye három fő kategóriába sorolható: holtidő kapacitás; nem termelési kapacitás; termelési kapacitás. Haupt 1998-ban publikációjában kiemelte, hogy ezek a kategóriák összeadódnak, így a berendezés teljes névleges kapacitását adják meg.

Módszertan

A vizsgálat 20 db HPLC műszert üzemeltető laboratórium egy éves működési idejére terjed ki. A felmérést a 2018-as évben végeztük el. A kutatásban részt vevő laboratóriumok fele a for-profit (FP) szférából származó, magán, kontrakt és gyógyszeripari laboratórium. Másik fele az állami (NP) szférához tartozó, főként egyetemi laboratóriumok voltak. A kutatásba bevont HPLC műszerek nagy része, főként a központi költségvetési szervekhez tartozó laboratóriumoknál pályázati forrásból származik, míg a magánkézben lévő laboratóriumok általában saját forrásból szerzik be műszereiket. Az elemzett adatokat kérdőíves és személyes

interjú formájában hajtottuk végre a laboratóriumi vezetőkkel a HPLC készülékük produktív és nem produktív működési idejének meghatározása céljából. A megkérdezett laboratóriumok különböző tevékenységi területeken végeztek feladatokat, ennek köszönhetően eltérő meghatározási számokkal. Az egyetemi NP laboratóriumok jobban foglalkoznak az oktatással és a kutatással, míg az FP laboratóriumok támogatják a külső mérési és támogatási projektek gyártási technológiáját vagy ügyfélszolgálatát.

Az ipari termelés kapacitáskihasználási indexe (CUI – Capacity Utilisation Index vagy  $\eta$ ) Bóna és munkatársai munkájában (2012) a következő egyenlet alapján kerül kiszámításra:

$$\eta = \frac{N_{kh}}{N} \cdot 100(\%) \quad (1)$$

ahol  $N_{kh}$  a reális átviteli teljesítmény (az előállított termékek száma),  $N$  az elméleti (maximális) teljesítmény (darabokban).

A fentiekben bemutatott CUI egyenlet a termelt mennyiség/óra alapon került meghatározásra, azonban a kutatás-fejlesztés nem termelési tevékenység. Majdnem lehetetlen meghatározni a kimenet mértékét, mely az esetek többségében nem állandó. A laboratóriumi létesítmények CU mérésének sikeressége szempontjából döntő fontosságú a mutatók jelentős tényezőinek meghatározása.

Az ágazati specifikációnak köszönhetően nehéz a CU-t a termékek mennyiségében kifejezni egy bizonyos idő alatt (pl. db / óra) – ezért a szerzők módosított egyenletet határoztak meg az időkeretben (óra / év), beleértve az üzemórát és az idővesztést a műszerekre (2. egyenlet).

$$CUI_{lab} = \frac{T_{productive}}{T_{total}} \cdot 100(\%) \quad (2)$$

Ahol a  $CUI_{lab}$  az analitikai laboratóriumi eszköz kapacitáskihasználási indexe, a  $T_{total}$  az adott eszköz elméleti maximális éves munkaideje, a  $T_{productive}$  az évenkénti gyakorlati mérési órákra vonatkozik.

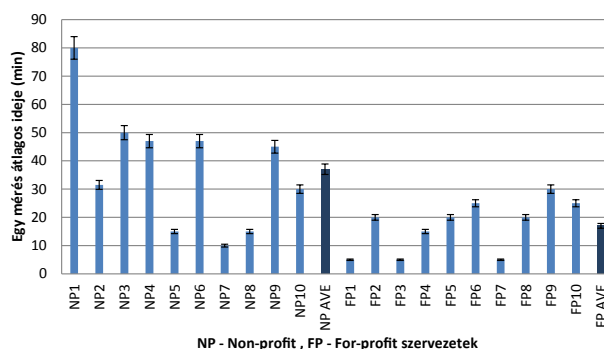
Az elemzési időkeret fontos tényező a laboratóriumi szegmensben, ahol a K+F laboratóriumok számos különböző projektet végeznek, amelyek, ciklikusak és nem rendelkeznek szabványos időtartammal. Ezért a mérőeszköz CU mérése kizárólag az idő használatát teszi lehetővé, így a tanulmányban bemutatott módosított egyenlet a laboratóriumi piacon használt műszerek, eszközök teljes kapacitáskihasználás mutatójaként alkalmazható.

## Eredmények

A válaszadók a kérdőívben először megbecsülték az átlagos éves munkanapokat, és az átlagolt eredmények csaknem 38,5%-kal magasabb munkanap számokat mutattak a profitorientált szervezetek esetén, a non-profit laboratóriumokkal szemben, ami természetesen

a profitorientált tudományos életben mutatkozó különbségnek tudható be; az egyetemeken esetében elsősorban az oktatás a fő tevékenység.

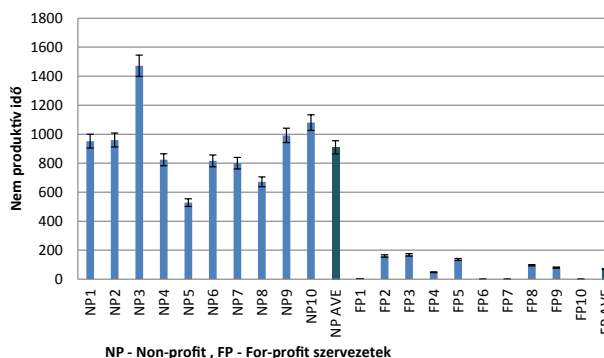
Jelentős különbségeket találtunk az átlagos mérési időkhöz, amint azt a 1. ábrán láthatjuk. Az eltérés mértéke az alkalmazott módszertől függ nagymértékben, mely, természetesen különböző eredményeket is hoz létre. Bár a mérési idő egyértelműen hosszabb volt az NP intézeteknél, mint az FP szervezeteknél; jól látható, hogy a nyereségérdekelte szervezetek rövidebb mérési idővel működnek, átlagosan 20 perccel. Ezzel szemben a nonprofit intézmények átlagos mérési ideje az FP cégek idejének kicsit több mint a duplája (37 perc). A 2. ábrán a kromatográfias műszerek nem produktív teljesítménye látható a két vizsgált szektorban, a kapott eredmények nagyon hasonlóak a mérési időkhöz. Az NP szervezetek esetében a fel nem használt idő meglehetősen magas az FP-khez képest.



**1. ábra** Egy HPLC mérés megközelítő időtartamának összehasonlítása az NP és FP szervezeteknél

*Forrás: Saját kutatási adatok*

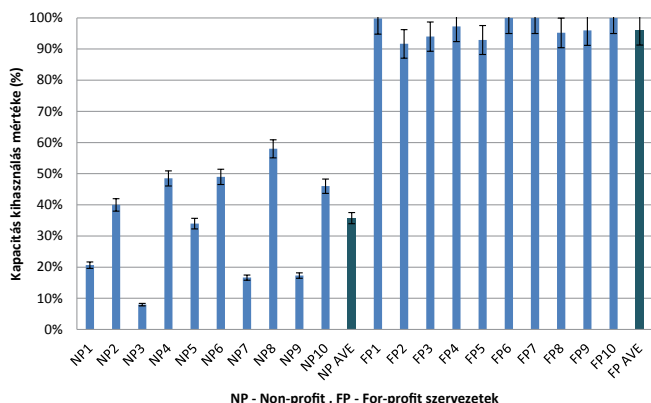
A különböző okok, mint például a műszerhibák vagy a vegyi anyagok hiánya miatt elvesztett átlagos idő, az NP intézetek esetében 910 óra, míg az FP cégek esetében csak 72 óra volt, ami egy nagyságrendbeli különbséget jelent. A viszonylag magas termelékenység hiányának fő okaira egyértelműen rámutattak a válaszadók: a megrendelés hiánya okozta a legtöbb kiesést, ezen ok után csökkenő mértékben, de a műszer javítási ideje, az operátor hiánya és a vegyi anyagok nélkülözése is okozott nem kívánt, de jelentős, több hétig tartó szünetet.



**2. ábra** A két szektor felmérésben résztvevő szervezeteinek összes produktív időszaka

*Forrás: Saját kutatási adatok*

A CU index HPLC műszerekre történő (CUI) kalkulálása a (2) egyenlet szerint történt. Az eredmények a 3. ábrán láthatóak. A profitorientált szektorban található laboratóriumok kiváló CUI-vel rendelkeznek, átlagosan 96%-os eredményt értek el. Ezzel szemben az állami költségvetési szervek (NP) átlagos CUI kizárólag 36%-ot értek el.



**3. ábra** Az egyes szervezetek számított kapacitáskihasználási indexei

*Forrás: Saját kutatási adatok*

Az NP intézetek laboratóriumai között jelentős különbségek mutatkoznak a CUI eredményeit illetően. A legalacsonyabb eredmény 8%, míg a legmagasabb 58%. Az eredmény 50%-os eltérést reprezentál, mely magas szórást takar. Ezzel szemben az FP vállalatok CU indexei nagyon közel állnak egymáshoz 90%-os megbízhatósági szinten, a különbség mindössze 8%, ami azt jelenti, hogy nem találtak szignifikáns különbséget közöttük 10%-os szignifikancia szinten,  $p=0,1$ .

A CUI analitikai laboratóriumi műszerekre módosított számítási módszere, a kapott eredmények alapján indokoltnak bizonyult egy adott eszköz értékelésében; azonban nem szabad elfelejteni, hogy a módszer még a fejlesztés korai szakaszában van. Nyilvánvalóan képes az eszközöket naplózás alapján osztályozni, azonban a még pontosabb eredmény érdekében szükséges az egységes adatrögzítést szervezetenként megszervezni, valamint a mintaelem szám növelése is elengedhetetlen

a vizsgálat folytatása során. A tanulmányban bemutatott módszer segíthet az analitikai laboratóriumi szektor szűk keresztmetszeteinek feltárásában, különösen a nonprofit szektor tagjai számára.

#### Következtetések

Az elmúlt években nőtt a kutatás-fejlesztés támogatása, az eszközök pályázatokon keresztül beszerzése. Ez a tendencia lehetővé tette a különböző kutatási szervezeteknek a régi készülékeik cseréjét, vagy új műszerek beszerzését a meglévők mellé. A pályázati úton beszerzett műszerek későbbi, a beszámolási szakasz utáni, laboratóriumi kihasználtságát az ellenőrző szervek már nem vizsgálják, ez a fenntartó hatáskörébe tartozik. Napjainkban a nonprofit szervezetek, mint például az egyetemek egyre inkább a saját költségvetésük megszerzésére szorúlnak a nem megfelelő szintű Európai Unió, állami és privát pénzügyi támogatás miatt. Az analitikai eszközök rejtett kapacitásának kihasználása ígéretes módja a jövedelem növelésének és egy intézmény pozíciójának megerősítésének. A jobb eredmények elérése érdekében a magán és állami szervek között erős együttműködésre lenne szükség, mely segítené az alacsony költségvetéssel rendelkező NP szektor laboratóriumainak hatékonyabb működését és ezen keresztül a magasabb műszerkihasználtságot. Az analitikai laboratóriumok zárt, bizalmi alapon nyugvó szegmens, és ennek köszönhetően az adatgyűjtés nehezebb, mint pl. a fogyasztói felmérések (consumer technical insights - CTI) tesztjeinél. Az eredmény, az elvárások szerint, kiváló CUI-t mutatott az FP vállalatok számára, de az NP intézményeknél, az egyetemi tanszékek, a kormányzati- és az akadémiai laborok esetében gyenge kihasználtság volt tapasztalható. A felmérés számos akadályra világított rá, például a megbízások hiánya, a műszer javítási ideje, az emberhiány vagy a vegyi anyagok hiánya okozott gondot, mely főként az NP szervezeteknél jelentkezett, és melyek nagymértékben felelősek egy adott eszköz alacsony kapacitáskihasználtságáért. A jelen kutatás eredményei alacsony számú laboratóriumi együttműködést tükröz, így a jövőben javasoljuk a kutatás szélesebb körben történő kibővítését, mely mélyebb adatfelvételt követel meg.

## 51. Kromatográfias Továbbképző Tanfolyam Szeged, 2020. január 27-29

**A tanfolyam részvételi díja változatlanul:**

**20.000 Ft + ÁFA, PhD hallgatóknak: 15.000 Ft + ÁFA.**

Jelentkezni a Magyar Kémikusok Egyesülete Csongrád Megyei Csoport honlapján keresztül lehet (<http://www.staff.u-szeged.hu/~mkecsmc/ktt.html>)

**Jelentkezési határidő: 2019. december 31.**

További információk: [krom.tanfolya@pharm.u-szeged.hu](mailto:krom.tanfolya@pharm.u-szeged.hu)





# Az új etalon

A Nexera UHPLC-sorozat – úttörő technológia az intelligencia, hatékonyság és tervezés szempontjából. A fejlett mesterséges intelligencia képességével és laboratóriumi menedzsmenttel a dolgok internete (IoT) elvét felhasználva ellenőrzi a teljesítményt és az erőforrások elosztását, melyek segítségével az új Nexera rendszerek élenjáró és felhasználóbarát megoldásokat kínálnak a sokoldalú iparágak számára, új etalont teremtve az UHPLC-k világában.

## **Intelligens automatikus diagnosztika és önhelyreállítási funkciók**

pl. valós idejű mozgófázis (folyadék)szint ellenőrzés, automatikus buborékmentesítés, fogyóeszközök kezelése

**Hatékony folyamatautomatizálás, valamint gyors, megbízható teljesítmény** az indítástól a leállításig, biztosítva az automatikus munkafolyamatot, a maximális teljesítményt és a drasztikusan megnövekedett elemzési kapacitást

## **Kompakt kialakítás**

könnyű kezelhetőséget kínál csökkentett ökológiai lábnyom mellett



**Nexera**  
series

# A fehérje-kromatográfia alapvető problémái

Fekete Szabolcs

Genfi Egyetem, Gyógyszerészeti Tudományok Tanszék, 1211 Genève, Rue Michel Servet 1.

A fehérjék kromatográfias jellemzésének kiemelkedő jelentősége van a proteomikában, a fehérjék szerkezetével, koncentrációjával, valamint ezek szervezeten belüli időbeni és térbeni eloszlásával foglalkozó tudományban. A proteomikai kutatások eredményei segíthetnek megérteni a fehérjék szerkezet-funkció kapcsolatát, ezen keresztül pedig a szabályozásban és bizonyos kórképekben betöltött szerepüket. Kiemelkedő fontosságú terület a terápiás fehérjék minőségi és mennyiségi analízise [1]. A gyógyszeripar az utóbbi két évtized alatt jelentős változáson ment keresztül. A klasszikus kismolekulás terápiás készítmények mellett fokozatosan megjelentek a fehérjealapú készítmények. Az új fehérjealapú készítmények célzott és hatékony terápiát ígérnek a kismolekulákkal nehezen kezelhető betegségek esetében. A fehérjealapú gyógyszereket (biologikumokat) biotechnológiai úton állítják elő, legjelentősebb képviselőik az említssejtek által előállított monoklonális antitestek (mAb). Ezek a molekulák 150 kDa körüli mőtömegű, jellemző alapszerkezetű, de nagyfokú variabilitást mutató immunglobulinok. A molekulát felépítő aminosavak a gyártás, tisztítás és tárolás során fellépő környezeti hatásokra módosulhatnak. Az így megváltozó fehérjelánc terápiás hatékonysága és immunogenitása változhat, alapos analitikai jellemzést kell tehát adni a fehérje variánsok minőségét és mennyiségét illetően.

A biologikumok mérete és komplexitása miatt lehetetlen az egzakt analitikai jellemzés. Elvárható viszont, hogy a gyártó a lehető legnagyobb mélységű, koherens információval rendelkezzen a készítményéről. Ennek érdekében széles analitikai „fegyvertárat” vetnek be a jellemzéshez, melyben a tömegspektrometria, valamint az egyéb spektroszkópiái és elválasztástechnikai módszerek mellett kiemelt szerepe van a folyadékkromatográfias módszereknek. A legfontosabb technikák a fordított fázisú (RPLC), ioncserés (IEX), méretkizárásos (SEC), hidrofób kölcsönhatáson alapuló (HIC), valamint a hidrofíl kölcsönhatáson alapuló (HILIC) kromatográfia. Aktív formában frakcionáljuk, és további fizikai- kémiai, vagy biológiai vizsgálatokhoz használjuk fel.

A makromolekulák folyadékkromatográfias tulajdonságai alapvetően eltérnek a kismolekulák (<1000 Da) tulajdonságaitól [1]. Az eltérések főként szerkezeti és méretbeli különbségekből, valamint az állófázissal való

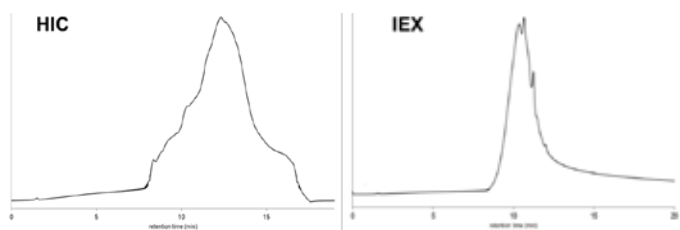
kölcsönhatási lehetőségek (szorbcíós tulajdonságok) különbségeiből adódnak. Az 1. táblázatban néhány olyan fizikokémia tulajdonságot foglaltunk össze, amelyek eltéréseket okoznak a folyadékkromatográfiasan kis és nagy molekulatömegű anyagok viselkedésében.

**1. táblázat** Különbségek folyadékkromatográfiasan kis és nagy molekulatömegű anyagok között [1].

	kismolekula	közepes méretű molekula (peptid)	makromolekula (fehérje)
MW (Da)	100-1000	~1000-5000	>5000
$D_n$ (Å)	5-10	10-15	>15
$D_m$ (cm <sup>2</sup> /s)	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
konformáció	állandó	változhat	változik

A molekulamérettel kapcsolatos probléma

A fehérjék mérete megnehezíti az analitikai információ kinyerését. A fehérjék hidrodinamikai átmérője ( $D_n$ ) függ a kromatográfias elválasztásnál alkalmazott mozgófázistól (összetétel, hőmérséklet, stb.). A molekulatömeg és átmérő között közvetlen kapcsolat van. A folyadékkromatográfiasan kis molekulatömegű anyaghoz képest egy nagyságrenddel nagyobb lehet a makromolekulák átmérője. Ez meghatározza az alkalmazott töltet pórusátmérőjét. A pórusok átmérőjének legalább 10-szer nagyobbak kell lennie a molekula hidrodinamikai átmérőjénél, különben a pórusdiffúzió gátolt. Nagyobb méretű fehérjék elválasztásához legalább 200-300 Å pórusátmérőjű töltetek javasoltak. A molekuláris diffúziós együttható ( $D_m$ ) négyzetgyökösen változik a molekulatömeggel. Ennek eredményeként a van- Deemter egyenletben (a kromatográfias tányérmagasságot leíró összefüggés) szereplő B-tag (hosszirányú diffúzió okozta zónaszélesedés) elhanyagolható nagyobb méretű fehérjék esetében, ugyanakkor a C-tag (anyagátadási ellenállás okozta zónaszélesedés) jelentősen megnő. Az anyagátadási ellenállás növekedése a kinetikai hatékonyság csökkenést eredményezi, így a molekulaméret növekedésével mindig szélesebb csúcsokra kell számítanunk. Az 1. ábrán egy intakt antitest-drog-konjugátum (ADC) HIC, illetve IEX módban felvett kromatogramját mutatjuk be. Jól látszik, hogy a széles csúccsal eluálódó intakt variánsok közötti elválasztás nem megfelelő. A kromatogramok alapján nem sokat tudunk mondani a fehérje heterogenitásáról vagy tisztaságáról. Az ugyan látszik, hogy a minta nem homogén, de hogy hány variánst tartalmaz, illetve hogy azoknak mi az aránya, arról nem ad információt az intakt fehérje kromatogramja. Ezért előnyösebb, ha a nagy fehérjéket nem intakt formában, hanem ún. fragmens szinten (sub-units) vizsgáljuk. Ha csökkentjük a molekulaméretet, az mind kromatográfias, mind detektálás (pl. tömegspektrometriás) szempontból kedvező. Kromatográfias szempontból a molekulaméret csökkentésével nő a diffúziós állandó, így csökken az anyagátadási ellenállás, ami a kinetika hatékonyság növekedéséhez vezet. Néhány specifikus enzim és redukálószer segítségével 25 – 50 kDa-os fragmensekre



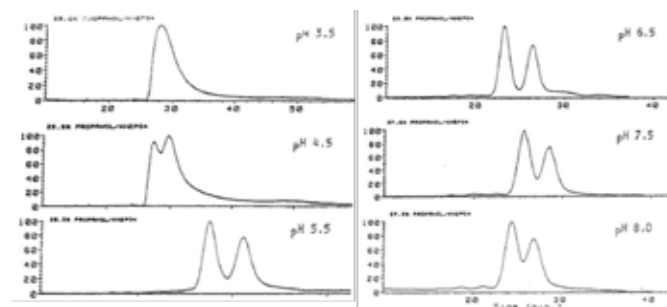
**1. ábra** Intakt ADC hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás (HIC), illetve ioncserés (IEX) módban felvett kromatogramja.

hasíthatók a mAb-ok (és mAb származékok), amelyek sokkal kedvezőbbek kromatográfiás szempontból (éles csúcsban eluálhatók).

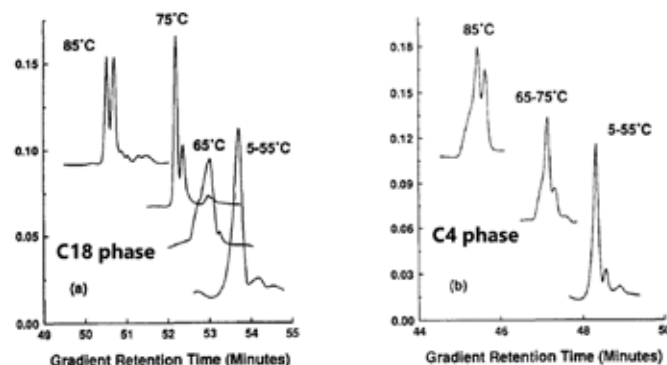
A konformáció-változással kapcsolatos probléma

Kismolekuláknál a konformáció, így a visszatartás nem mutat jelentős függést a kromatográfiás körülményektől. Fehérjék esetében a kromatográfiás körülmények, mint hőmérséklet, nyomás, oldószer típusa, vagy az állófázis felülete, mind befolyásolhatják a molekula konformációját. A konformáció-változásával együtt változik a kölcsönható felület minősége (pl. jobban hozzáférhetővé válnak a hidrofób csoportok), ezen keresztül pedig a visszatartás. A konformáció kromatográfiás körülmények közötti irreverzibilis megváltozását lehetőleg el kell kerülni, ha a vizsgált makromolekulát biológiailag aktív formában szeretnénk izolálni. A szakirodalomban bőven találunk példát mind reverzibilis, mind irreverzibilis konformáció-változásra, amelyet a kromatográfiás körülmények idéztek elő. Annak érdekében, hogy az elválasztás minőségét javítsuk, sok esetben szándékosan törekszünk arra, hogy konformáció-változást okozzunk (pl. só, ill. szerves oldószer hozzáadásával, vagy akár a hőmérséklet emelésével). A 2. ábrán reverzibilis konformáció-változásra láthatunk példát. Ez esetben a mozgófázis pH-jának változtatásával sikerült olyan mértékben módosítani a fehérje (rekombináns humán növekedési hormon) konformációját, hogy az egyébként hasonló szerkezetű izoformák jól elválaszthatók legyenek [2]. A 3. ábrán hőmérséklet függő irreverzibilis konformáció-változást figyelhetünk meg [3]. Az inzulin ilyen szempontból kiváló példa. Jól ismert, hogy a hőmérséklet emeléssel egyre jobban „kitekeredik” (unfold) és így változik az állófázis számára hozzáférhető hidrofób/hidrofil felület aránya. Néhány nagy borítottságú RPLC fázison még az is előfordul, hogy a hőmérséklet emeléssel

nő az inzulin retenciója (általában a hőmérséklet emelés hatására a retenció csökken). Összességében tehát nem kell félnünk a fehérjék konformáció-változásától, sőt sok esetben – ez a tulajdonság – jól ki is használható a szelektivitás kedvező befolyásolására.



**2. ábra** Rekombináns humán növekedési hormon (rhGH) fordított fázisú kromatográfiás módban (RPLC) felvett kromatogramja, különböző mozgófázis pH-t alkalmazva. A szerzők szerint, a pH módosítása reverzibilis konformáció-változást idézett elő [2].

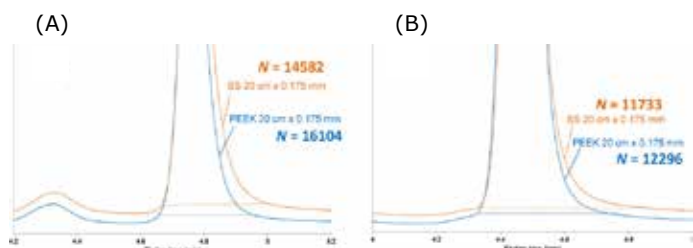


**3. ábra** Inzulin fordított fázisú kromatográfiás módban (RPLC) felvett kromatogramja, különböző mozgófázis hőmérséklet beállítások mellett (két különböző állófázison: C18 és C4). A hőmérséklettől függően egy vagy két kromatográfiás csúcs figyelhető meg, amelyek két eltérő konformációs állapotnak felelnek meg [3].

A fehérjék nem-kívánatos megkötődésével („ragadással”) kapcsolatos probléma

A terápiás fehérjék jelentős részének (pl. mAb-ok) az a biológiai szerepe, hogy felismerje és kötődjön a szervezetbe került idegen anyagokhoz, tehát természetükből fakadóan ún. felület-aktív anyagok. Ez az erős kötődésre való hajlam gyakran megnyilvánul a kromatográfiás mérések során is. Mivel egy fehérje igen nagy és sokféle funkciós (reaktív) csoportot tartalmaz, ezért hajlamos hidrofób, hidrofil, H-hidas és elektrosztatikus (pl. ioncserés) kölcsönhatások kialakítására is. Azaz bármilyen kölcsönhatásra képes attól függően, hogy az alkalmazott körülmények minek kedveznek. A kromatográfiás gyakorlatban ezért sokszor megnehezíti az életünket a fehérjék nemkívánatos kötődése, tapadása. Alapvetően megkülönböztetjük a kromatográfiás oszlopon és a kromatográfiás rendszerben előforduló (ki)tapadásokat [4].

Gyakori az injektor, az összekötő vezetékek, a detektor cellák és a mintatartó üvegek belső felületén lejátszódó megkötődés. Ezek a kromatográfias rendszerben előforduló megkötődések a csúcsterületek bizonytalanságához (nagy szórás), csúcstorzuláshoz vagy akár áthordási problémához (kereszt-szennyezés) vezetnek. Kiküszöbölésük vagy legalább a csökkentésük céljából, fehérje mérésekhez speciális inert készülékek használata javasolt. Ma az ilyen készülékeket „bioinert” vagy „fém-mentes” (metal-free) névvel illetik. Ezekben a rendszerekben, az áramlási útvonalat (amelyben a minta végig halad) a hagyományos rozsdamentes acél felületek helyett elsősorban titán, poliéter-éterketon (PEEK) vagy teflon (PTFE) felületekkel helyettesítik. A teflon felület azért is kedvező, mert a fehérje kromatográfiában gyakran alkalmazott agresszív körülményeknek (pl. magas hőmérséklet, alacsony pH,...) is jól ellenáll. Ma már a legtöbb készülégyártó forgalmaz ún. bioinert rendszereket a fehérje elválasztásokhoz. A 4. ábrán példát láthatunk arra, hogy az oszlop és a detektor cella közötti összekötő vezeték anyaga hogyan befolyásolja a fehérje csúcsok szélességét egy méretkizáras mérés során. Ugyanazt az oszlopot és készüléket használtuk a mérésekhez. Az egyetlen különbség az volt, hogy a rozsdamentes acél vezeték (SS) kicseréltük egy azonos méretű PEEK vezetékre. Ennek következtében jelentős különbség volt megfigyelhető a csúcshélességben. Az SS vezetékkel mért szélesebb csúcsok a vezeték belső falán lejátszódó fehérje tapadás következményei. A méréseket azonos oszloppal és mozgófázissal végeztük, ugyanazon a készüléken. A különbség az összekötő vezeték anyaga. A narancs kromatogram a rozsdamentes acél- (SS), a kék kromatogram a PEEK összekötő vezetékkel ellátot kromatográfias rendszerrel lett mérve. N a látszólagos tányérszámot jelenti [5].

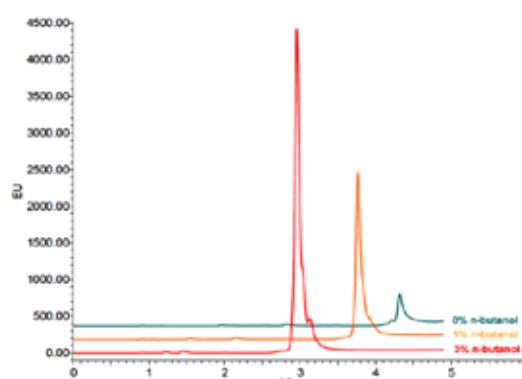


**4. ábra** Albumin (A) és egy IgG1 mAb (B) méretkizáras kromatográfias módban (SEC) felvett kromatogramja.

Az oszlop fala és a bemeneti frit is kritikus lehet a nemkívánatos adszorpció szempontjából. Ezért az oszlopgyártók – hasonlóan a készülékekhez – titán vagy PEEK felülettel borított oszlopházat és frit-et javasolnak (pl. BioZen vagy a ProteCol oszlop-családok).

Természetesen az eddig tárgyalt erős és kevert mechanizmusú fehérjeadszorpció a kromatográfias állófázison is végbemegy. Ez leggyakrabban nem megfelelő csúcs visszanyerésben vagy csúcsalak torzulásban nyilvánul meg. A fehérjék az összes kromatográfias módban ún. kevert retenció mechanizmussal (mixed-mode retention) eluálódnak. Ez lehet hátrányos, de akár előnyös is. Hogy egy példát említsünk az előnyökről, RPLC-s mérések során

a szilika alapú állófázisok szinte minden esetben jobb szelektivitást mutatnak mint a szerves polimer vagy hibrid (pl. BEH) alapú töltetek. Ennek oka, hogy az egyébként nem kedvelt szilanolos kölcsönhatások jelentősen hozzájárulnak a retencióhoz (javítják a szelektivitást). Ezzel szemben egy szerves vagy hibrid fázison ez a plusz kölcsönhatás nem lép fel, a retenciót elsősorban csak a hidrofób kölcsönhatás határozza meg. Hogy hátrányt is említsünk, ez az erős másodlagos kötődés viszont azt eredményezi, hogy szobahőmérsékleten (vagy kevéssel felette, 20 – 40 °C-on) túl erősen kötődnek a fehérjék az állófázishoz, ezért előfordulhat, hogy egyáltalán nem is eluálódik az oszlopról. Ezt a „káros” hatást magas mozgófázis hőmérséklettel (70 – 90 °C) és ionpárképző hozzáadásával (0,05 – 0,1% TFA) lehet csökkenteni. Esetleg kis mennyiségű alkil-alkoholt (pl. 1-2 % n-butanol) is adhatunk a mozgófázisba, ami jól maszkírozza a szabad szilanol csoportokat és a felületen megkötött vizet, így javítja a fehérje visszanyerést. [6]. Erre láthatunk példát az 5. ábrán.

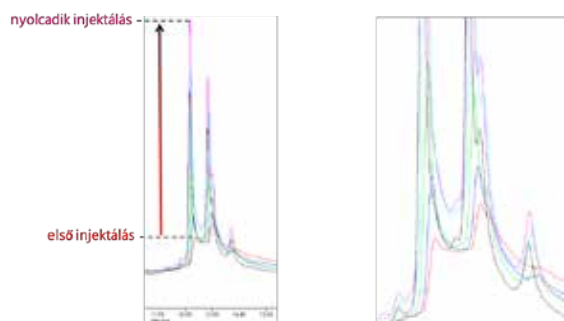


**5. ábra** IgG1 mAb visszanyerése fordított fázisú (RPLC) oszlopról 0, 1 és 3% n-butanol tartalmú mozgófázissal [6].

#### Oszlop-kondicionálás, „etetés” (feeding), deaktiválás

Gyakori probléma szokott lenni, hogy kisebb mennyiségű fehérje minta injektálásakor lényegesen alacsonyabb a visszanyerés ahhoz képest, mint amikor nagyobb mennyiséget injektálunk. Ennek oka, hogy ún. aktív felületek (aktívabb, mint az állófázis felület nagyobb része) található az állófázison. Egy állófázis felülete sosem teljesen homogén. Ezért, ezeket a „túl aktív” felületeket deaktiválni kell. Ezt a következőképpen tehetjük meg: (1) Nagy mennyiségű fehérje mintát injektálunk egymás után többször, hogy telítsük ezeket az aktív kötő felületeket. Néhány oszlopgyártó BSA triptikus emésztményt javasol erre a célra, de van olyan gyártó is akinek saját receptje van (pl. Waters, „glycoprotein performance test standard” a nagy pórusú HILIC fázisok kondicionálásához). Másik lehetőség (2), hogy erősen denaturáló körülményeket állítunk elő, mert ekkor általában javul a fehérjék visszanyerése. Ezt megtehetjük magas mozgófázis hőmérséklet alkalmazásával, savas mozgófázissal vagy kaotróp mozgófázis additívakkal (pl. urea, guanidin). Az állófázis megfelelő deaktiválása különösen fontos, ha egy új oszlopot használunk. Gyakran tapasztaljuk új oszlopok esetén, hogy az egymást követő injektálásokból származó

csúcsterületek szisztematikusan nőnek, sőt e mellett gyakran még retenció csökkenést is megfigyelhetünk. Erre láthatunk példát a 6. ábrán, ahol egy új HILIC oszlopra injektáltunk egy IgG antitestet egymás után nyolcszor. A csúcsterület drasztikusan nő, ami arra utal hogy a korai injektálásból az állófázisra jutott fehérje nagy részét az oszlop aktív helyei megkötötték. Ennél a példánál 10-15 injektálást kellett végezni az új oszlopon annak érdekében, hogy jól ismételhető csúcsterületeket kapjunk.



**6. ábra** IgG1 mAb fragmens nyolc egymást követő injektálásból származó kromatogramja egy új, nagy pórusú HILIC fázison.

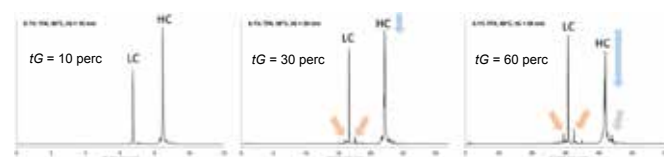
Az oszlop megfelelő kondicionálása különösen fontos a nem-denaturáló kromatográfiai módok esetén (SEC, HIC, IEX).

A fehérjék oszlopon lejátszódó bomlása/változása

Sajnos a fehérje minták érzékenyek, így a mérés során is változhatnak, bomolhatnak. Ez nagy problémát okozhat, hiszen a méréssel mi magunk – szándékosság nélkül is – befolyásolhatjuk a mérési eredményt. Denaturáló kromatográfiai körülmények között, ha a mintánk elég sok időt tölt az oszlopon (pl. magas hőmérsékleten, nagy nyomáson, erősen savas mozgófázisban), akkor sajnos jelentős mértékben bomolhat. Ez gyakran megfigyelhető RPLC-s körülmények között. A 7. ábrán azt láthatjuk, hogy egy mAb könnyű- (LC) és nehéz- (HC) láncának az RPLC-s mérése során, a kromatográfiai profil nagyban függ a gradiensidőtől ( $t_G$ ). Ha elég hosszú a mérési idő (pl.  $t_G > 20$  perc), akkor olyan csúcsok jelennek meg a kromatogramon, amik a rövidebb gradiensidő alkalmazásával nem voltak láthatóak [7]. Továbbá, a két főcsúcs aránya is nagyban megváltozik ahogy egyre növeljük a mérési időt.

Sajnos nem-denaturáló körülmények között is lejátszódhat fehérje bomlás (változás). Egyik legjellegzetesebb ilyen változás, hogy méretkizárásos kromatográfiában (SEC) a mért aggregátumok mennyisége nagyban függhet az oszlopon eső nyomástól, illetve az alkalmazott mozgófázis hőmérséklettől [8]. Ez különösen nagy probléma lehet módszer-transzfer során amikor egy konvencionális HPLC SEC módszert szeretnénk átdolgozni UHPLC módszerre. A nyomást és a hőmérsékletet lehetőség szerint alacsony értéken kell tartani. Előfordulhat ún. részleges minta denaturáció is.

SEC körülmények között ez úgy nyilvánul meg, hogy a denaturálódott (jobban kitekeredett konformációjú) monomer elúciós ideje csökken, hiszen a látszólagos mérete a kitekeredés miatt megnő [9]. Ezek a részlegesen denaturálódott monomerek sokszor bal vállként eluálódnak a fő-monomer csúcson, hasonlóan mintha aggregátumok lennének, ami ahhoz vezethet, hogy fölébecsüljük a minta valódi aggregátum tartalmát.



**7. ábra** Redukált IgG1 mAb fragmensek és variánsainak RPLC-s elválasztása erősen denaturáló körülmények között ( $T = 90$  °C,  $pH \sim 2$ ), különböző gradiensidők (mérési idők) mellett. Ha hosszabb az oszlopon tartózkodási idő, nő a bomlástermékek mennyisége (oszlopon lejátszódó minta bomlás) [7].

## Összefoglalás

Általánosságban elmondható, hogy a fehérjék „túl nagyok”, „túl heterogének”, „túlzottan ragadnak” és „túl érzékenyek”. Úgyis mondhatnánk, hogy a nagy fehérjék – természetüktől fogva – nem kompatibilisek egy kromatográfiai méréssel/rendszerrel. Ennek ellenére, mégis alkalmaznunk kell a különböző folyadékkromatográfiai módokat, hiszen még mindig ez a legjobb módszer arra, hogy egyes tulajdonságokat (pl. méret variánsok, töltés variánsok) megmérjük vagy legalábbis, hogy legyen róla elképzelésünk. Való igaz, hogy egy fehérje-kromatográfiai mérésben sok bizonytalanság lehet, ezért kell mindig körültekintően megválasztani a mérési körülményeket és megbizonyosodni arról, hogy a kromatográfiai mérés tényleg a valós eredményt nyújtja.

## Felhasznált irodalom

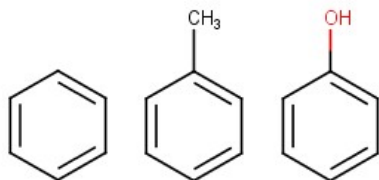
- [1] J. Fekete, R. Kormány, Sz. Fekete (szerk.), *Modern Folyadékkromatográfia (tankönyv)*, 2017 KromKorm Kft.
- [2] P. Oroszlan, S. Wicar, G. Teshima, S.-L. Wu, W.S. Hancock, B.L. Karger, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1623–1631.
- [3] A.W. Purcell, M.I. Aguilar, M.T.W. Hearn, *J. Chromatogr. A* 711 (1995) 61–70.
- [4] B. Bobály, E. Sipkó, J. Fekete, *J. Chromatogr. B* 1032 (2016) 3–22.
- [5] Sz. Fekete, D. Guillaume, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 149 (2018) 22–32.
- [6] Sz. Fekete, S. Rudaz, J.L. Veuthey, D. Guillaume, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 3113–3123.
- [7] B. Bobály, M. Lauber, A. Beck, D. Guillaume, Sz. Fekete, *J. Chromatogr. A* 1549 (2018) 63–76.
- [8] Sz. Fekete, J. Fekete, D. Guillaume, *Kromatográfus 2016 május*, 8–10. [9] J.S. Philo, *AAPS J.* 8 (3) (2006) 564–571.

# Szerves savak és bázisok meghatározása gázkromatográfián

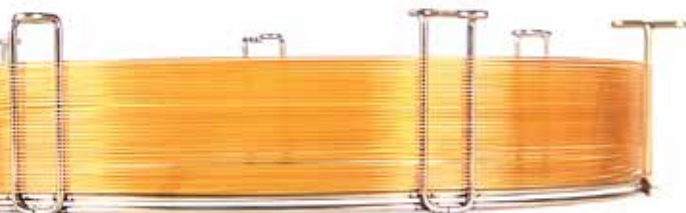
Göröcs Noémi  
Egis Gyógyszergyár Zrt.

Egy analitikai feladat kapcsán az elsődleges kérdés, hogy milyen technikával fogjunk hozzá a méréshez. Bizonyos feladatok egyértelműen, szinte tálcán kínálják a megoldást, azonban léteznek speciális esetek, ahol előfordulhat, hogy a folyadék-, illetve gázkromatográfiás technika is hozhat megfelelő eredményt. Ez utóbbi esetben mérlegelhetünk a kimutatási határ, a szükséges mintaelőkészítési igény, az elemzés hossza, stb. alapján.

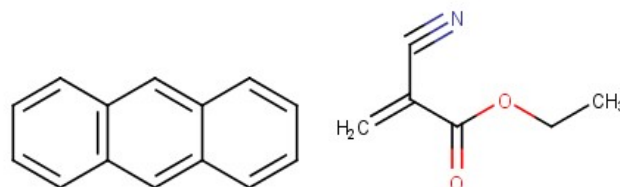
Egy adott komponens mérése előtt általában a légköri nyomáson mért forráshőmérséklete, azaz a forráspontja alapján tájékozódhatunk arról, hogy érdemes-e gázkromatográfiás analízissel próbálkozni. Már az is nagy segítség, ha egyáltalán van légköri adat az irodalomban, s nem csak vákuum alatt mért értéket találunk. Semleges, apoláris karakterű molekulák esetén viszonylag könnyű döntést hozni, nagy valószínűséggel nem fog problémát okozni a meghatározás. Poláris, savas vagy bázikus komponensek elpárologtatása azonban bonyolultabb lehet, a forráspont önmagában keveset jelent az analízis szempontjából, amit egy alacsony kimutatási határ igény csak még tovább ronthat. Az apoláris tulajdonságú benzol forráspontja 80 °C. Cseréljük le egy hidrogénjét metil csoportra, amivel 111°C-os forráspontú toluolt kapunk. Azonban, ha a hidrogént egy szintén kis méretű, de poláris hidroxid csoportra cseréljük (1. ábra), már 182°C-ról van szó!



**1. ábra** A benzol (fp. 80°C), a toluol (fp. 111°C) és a fenol (fp. 182°C) szerkezete.

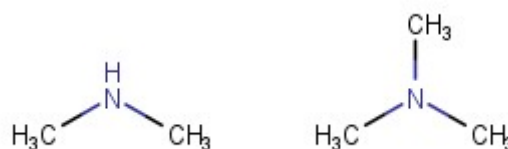


Bizonyos molekulák nagyon magas vagy nem kimérhető forráspontjuk ellenére gázkromatográfián meghatározhatók. Ilyen például az antracén, mely a „rossz hírű” policiklusos aromás szénhidrogének egyik tagja, 340 °C-os forrásponttal rendelkezik, de ide tartozik a pillanatragasztók „sztárja”, az etil-cianoakrilát is, melynek ráadásul légköri forráspontja nem mérhető ki (2. ábra). Ezek a vegyületek méréskor általában híg oldat formájában kerülnek az injektortérbe, ahol az oldószer illékonyága és a bejuttatott kis mennyiségű oldat miatt olyan anyagokat is mérhetünk reprodukálható csúcs alatti területekkel, melyeknek a forráspontja az injektor hőmérséklete felett van.



**2. ábra** A fenantrén (fp. 340°C) és az etil-cianoakrilát (fp. 55°C/3 Hgmm) szerkezete.

Bázikus vagy savas vegyületek esetén szintén megtévesztő lehet, ha csak az alacsony forráspont alapján szeretnénk tájékozódni. Ezekben az esetekben előfordulhat, hogy az alacsony forráspontnak megörülünk, majd -különböző okok miatt- azt tapasztaljuk, hogy a csúcs alatti területek ismételtetősége nem megfelelő, vagy akár meg sem jelenik a kromatogramon az adott csúcs. Erre jó példa a dimetil- és trimetil-amin (3. ábra).



**3. ábra** A dimetilamin (fp. ~9 °C) és trietilamin (fp. ~5 °C) szerkezete.

Ha a molekula erősen poláris, a megosztó folyadékban végbemenő abszorpciós-deszorpciós folyamatoknak köszönhetően a csúcsalak erősen torzult lehet. Ez még akkor is bekövetkezhet, ha igyekszünk megfelelően poláris állófázist választani a meghatározáshoz. Sőt, ha a kolonna készítésekor az állófázis térhálósítása savas vagy bázikus molekulák eliminációjával járt együtt, előfordulhat, hogy az adott molekulára egyáltalán nem kapunk jelet. Emiatt a megfelelő kolonna kiválasztása nagy körültekintést igényel ezekben az esetekben. Érdekes ilyen meghatározásokhoz speciálisan bázikus vagy savas komponensek analízisére alkalmas kolonnákat beszerezni. Az 1. és 2. táblázatban található néhány állófázis típus bázikus és savas jellegű komponensek gázkromatográfiás vizsgálatához.

**1. táblázat** Kereskedelemben kapható kolonnatípus a bázikus jellegű anyagok elválasztásához.

	Állófázis alapja	Megjegyzés
CP-Volamine	deaktivált polisziloxán váz	kitűnő inertesség és csúcsalak, vizes minták esetén is alkalmazható
PoraPLOT Amine	szerves adszorbens	
Rtx-35 Amine	35% fenil – metil-polisziloxán	kitűnő inertesség és csúcsalak
Rtx-5 Amine	5% fenil – 95% metil-polisziloxán	magas maximum hőmérséklet
Stabilwax-DB	polietilén-glikol	

**2. táblázat** A két leggyakoribb kereskedelmi forgalomban lévő kolonnatípus savas jellegű anyagok elválasztásához.

	Állófázis alapja	Megjegyzés
FFAP álló-fázis	nitro-tereftálsavval módosított polietilén-glikol	
Stabilwax-DA	polietilén-glikol	néhány szerves sav analízisére is alkalmas

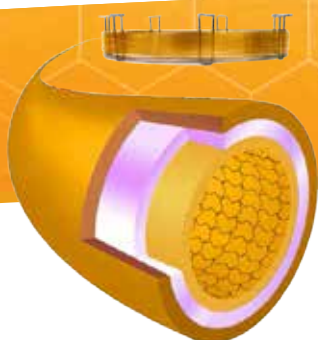
A megfelelő állófázis kiválasztása során érdemes többfélet kipróbálni, megfigyelni, hogy melyik állófázison hogyan viselkedik a meghatározandó molekula. Ha nem vagyunk olyan szerencsés helyzetben, hogy egymás után sorakoznak a polcainkon ezek a kolonnák, kiindulási pontként jó választás a CP-Volamine. Ez a típusú állófázis különlegesen inert, az erősen bázikus aminok is szép szimmetrikus csúcsalakkal eluálódnak, s akár vizes minták analízisére is alkalmas, robusztus kolonna. A két táblázatban található kolonnák maximum hőmérséklet értékei sajnos alapvetően alacsonyak, jellemzően 220 °C körül vannak (kivéve Rtx-5 Amine, 315°C). A CP-Volamine esetében 265 °C-ra melegíthetjük a kolonnateret izoterm körülmények között, és így a nagyobb molekulatömegű szennyező anyagoktól is meg tudunk szabadulni, melyek esetleg alapvonal emelkedést okozhatnak.

Savak meghatározása esetén kevesebb kolonna választási lehetőségünk van. Ennek egyik oka, hogy a szerves savak nagy része egy viszonylag könnyű származékképzési technikával kevésbé poláris, kellemesen illékony anyaggá varázsolható, melyek nem igényelnek speciális elválasztási körülményeket. A karbonsavak metilészterré

való alakítása kénsav katalizátor mellett rutinfeladat. Ha az adott karbonsav szénlánc érzékeny az oxidációra, kíméletesebb körülmények között, Lewis sav katalizátor mellett is elvégezhető az észterképzés. Ide tartoznak az egészségügyi szempontból kiemelt figyelmet érdemlő EPA és DHA omega zsírsavak. A természetben a zsírsavak általában triglicerid formában fordulnak elő, melyeket sokszor fontos átészterezési eljárással metilészterré alakítani. Ha erre nincs szükség, akkor egy magas maximális hőmérsékletű, kis filmvastagságú és alacsony vérzéssel rendelkező kolonnán érdemes az analízist végezni (pl. Rxi-65 TG, ZB-50). Zsírsavak, zsírsavészterek mérése során más jellegű problémákra számíthatunk, mint a poláris vegyületek esetén, mert a hosszú, inert apoláris lánc miatt az adszorpciótól kevésbé kell tartanunk.

A polaritás a különböző komponensek adszorpciós képességét befolyásolja a készülék különféle pontjain. Ezek közül főként az injektor aktív kötőhelyei, illetve gőztéranalízis esetén a headspace mintaadagoló egységei okozhatnak gondot. Ezekben az esetekben érdemes a feladatra dedikált felszereléseket, például speciális linereket és kvarcgyapotot beszerezni. A kvarcgyapot anyagi minősége miatt hajlamos rontani a bázikus komponensek mérésekor az ismételtelőséget, ilyenkor próbálkozhatunk kifejezetten bázikus komponensek analíziséhez deaktivált kvarcgyapot használatával. Gazdaságossági szempontokat figyelembe véve a házi kvarcgyapot csere előnyösebb a gyári, előre töltött liner változatoknál. Erősen poláris anyagok esetén mégis érdemes megfontolni a használatra kész liner-ek használatát, mert az inertizálást a már betöltött liner-en végzik el, így a gyapot töredeződéséből keletkező aktív helyek megjelenése kiküszöbölhető. A linerek felületét speciális kezelésnek alávetve az intertség foka javítható, a siltek liner bevonatok ellenállóbbak, mint az általános szililezési úton kapott rétegek.

A mintahurokkal ellátott headspace összekötő kapillárisa, az ún. transfer line készülhet kvarcüvegből és fémből is, melyek bár minden esetben inertizált felülettel rendelkeznek, előfordulhat anomália. Headspace mintaelőkészítő egység vásárláskor szem előtt kell tartani a maximális headspace hőmérsékleteket (inkubálási, transfer line, mintahurok és/vagy fecskendő hőmérséklet), mert általában a mintahurkos kivitel magasabb maximális hőmérsékleteket bír el, mint a fecskendő megoldás. Az adszorpció pedig nagyobb hőmérsékleten kisebb mértékű, s a meghatározási módszer robusztusabb lesz.



Meet Your NEW Zebron™ ZB-624 PLUS™ !



# Tömegspektrométer-barát mozgófázis alkalmazása terápiás fehérjék ioncserés elválasztásához

Farsang Evelin<sup>1</sup>, Fekete Szabolcs<sup>2</sup>, Horváth Krisztián<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pannon Egyetem, Analitikai Kémia Intézeti Tanszék

<sup>2</sup>Genfi Egyetem, Gyógyszerészeti Tudományok Tanszék

## Bevezetés

A cikkben az ioncsere-kromatográfia közvetlen tömegspektrometriás detektorhoz történő kapcsolásának nehézségeit és lehetőségeit tárgyaljuk. Jelen közlemény az LCGC szakfolyóiratban nemrég megjelent publikáció [1] magyar nyelvű összefoglalója.

A monoklonális antitestek (mAb-ok) a terápiás fehérjék egyik legsikeresebb csoportját képviselik. Előállításuk során, majd a később lejátszódó ún. poszttranszlációs folyamatok (PTM) következtében különböző módosulások léphetnek fel a szerkezetükben (pl. glikoziláció, oxidáció, deamidáció, fragmentáció). Ezek eredményeként töltésvariánsok is kialakulhatnak, melyek nagyban befolyásolhatják biológiai aktivitásukat és toxicitásukat, ezért elengedhetetlen a megfelelő vizsgálati módszerek kidolgozása és alkalmazása. A töltésvariánsok meghatározására leggyakrabban kapilláris elektroforézist (CE) vagy ioncsere-kromatográfiát (IEX) alkalmaznak. Az IEX módszerek közül kationcsere-kromatográfia (CEX) a legelterjedtebb, hiszen a legtöbb mAb bázikus karakterű. CEX módszerekkel a különböző savas és bázikus variánsok általában jól elválaszthatók a főcsúcstól (fő izoforma) [2-4]. A komponensek kromatográfiás oszlopról történő eluálására használhatunk ún. pH-gradienst [5-7], sógradienst [4, 8-10] vagy a kombinált pH- és sógradiens módokat [11]. Mivel a leggyakrabban alkalmazott pufferkomponensek (2-(N-morfolino)etánszulfonsav, MES és foszfát sók), valamint a sógradienshez használt NaCl és KCl nem illékonyak, tömegspektrometriás (MS) detektáláshoz

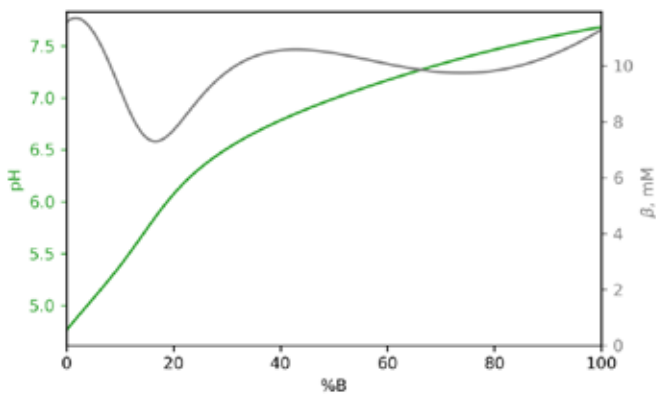
nem használhatók. Jelenleg az ammóniumion-alapú mozgófázis rendszerek (pl. ammónium-acetát, ammónium-bikarbonát) ígéretesnek tűnnek közvetlen MS detektáláshoz. Sok esetben megfelelő csúcsalakot és retenciót biztosítanak a mAb-ok elválasztására, ráadásul széles izoelektromos pont (pI) tartományban is alkalmazhatók. Ezekben a mozgófázis rendszerekben az elúciót elsősorban az ammónium-ion koncentráció változtatásával, vagy ammónium-hidroxid adagolásával kontrollálhatjuk. Az egyik legígéretesebb eluens rendszer Jan és munkatársai nevéhez köthető, akik egyidejű ionerősség (40-150 mM) és pH-gradiens (5.6-7.4) alkalmazásával egy általános átfogó módszert dolgoztak ki [12]. Számos munkában viszont ellentmondásos körülményeket közöltek és figyelmen kívül hagyták a mozgófázis pufferkapacitásának és ionerősségének a változását a gradiens fejlesztése során. Sokszor a pH gradiens meredeksége és a válaszfüggvény alakja nem jól reprodukálható. Célunk a pH- és ionerősség gradiens mAb-ok elválasztására gyakorolt együttes hatásának a vizsgálata volt. Ammónium-acetát és ammónium-karbonát tartalmú mozgófázis rendszerek összetételét optimalizáltuk, azzal a céllal, hogy megfelelő (közel lineáris) pH választ, ionerősséget és pufferkapacitást biztosítsunk és ezáltal javítsuk a mérések ismételtelhetőségét és lehetővé tegyük a közvetlen MS detektálást.

Az optimális illékony pufferrendszerek nyomában

A pufferkapacitás és a pH-válasz meghatározása céljából számításokat végeztünk ammónium-acetátot, ecetsavat és ammónium-karbonátot tartalmazó pufferrendszerekre, mivel ezek a komponensek megfelelőnek tűntek az előzetes vizsgálatok alapján. Az A eluens ammónium-acetátot és ecetsavat, míg a B eluens ammónium-acetátot és ammónium-karbonátot tartalmazott. Ezzel a mozgófázis rendszerrel széles pH tartomány lefedhető. Az egyes komponensek koncentrációját a 10-100 mM tartományban változtattuk (magasabb puffer koncentráció már megnehezítené az MS detektálást). Három intakt fehérje retencióját, csúcsalakját és szelektivitását vizsgáltuk 16 különböző eluens összetétel mellett. Ilyen körülmények között a legtöbb mAb megfelelő retenciával eluálható az  $5.5 \leq \text{pH} \leq 7.5$  tartományban. Emellett a megfelelő MS-érzékenység eléréséhez az ionerősséget a lehető legkisebb értéken célszerű tartani.

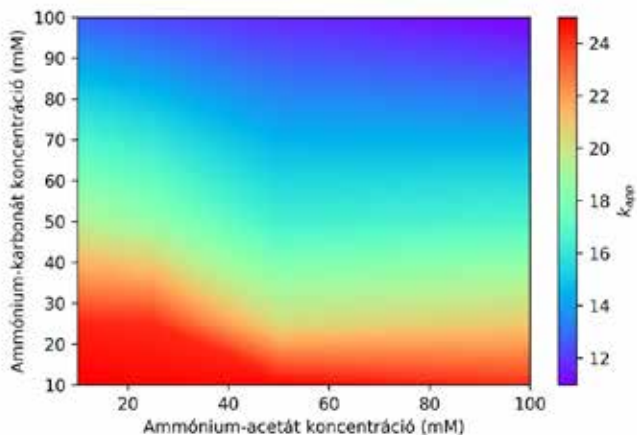
Célunk egy szimultán pH- és sógradiens módszer kidolgozása volt, amelyben a pH-gradiens szelektivitásra gyakorolt hatása és a sógradiens csúcs-fókuszáló hatása egyszerre érvényesül. Ilyen rendszerben az elúciót mind a fehérje töltésének megváltozása, mind pedig a sóval történő leszorítás együttesen befolyásolja. Ezekre a célokra ammónium-acetát/ecetsav megfelelőnek bizonyult. Az 1. ábra egy olyan pufferrendszer pH választ és pufferkapacitását mutatja, ahol az A eluens ammónium-acetátot és ecetsavat, a B eluens pedig ammónium-acetát és ammónium-karbonát sókat tartalmaz.





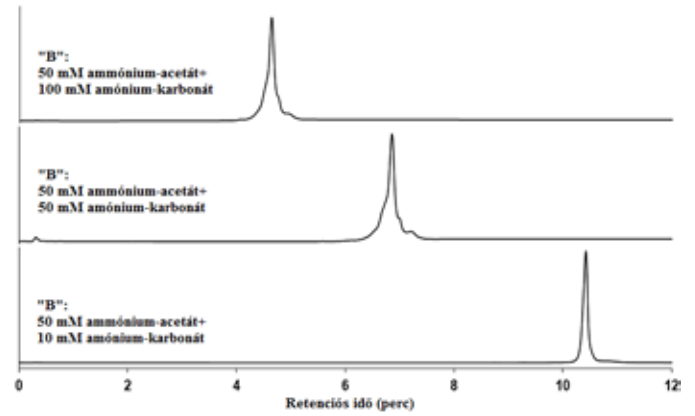
**1. ábra** pH-válasz (zöld) és pufferkapacitás (szürke) változása az eluens összetétel függvényében 10 mM ammónium-acetát és 10 mM ecetsav (A eluens), valamint 50 mM ammónium-acetát és 50 mM ammónium-karbonát (B eluens) esetében.

Az ionerősség retencióra gyakorolt hatását a 2. ábra szemlélteti, ahol a bevacizumab látszólagos retenció tényezőjét ( $k_{app}$ ) ábrázoltuk a B eluens ammónium-acetát és ammónium-karbonát koncentrációjának függvényében.



**2. ábra** A bevacizumab látszólagos retenció tényezője a B eluens ammónium-karbonát és ammónium-acetát koncentrációjának függvényében. Mérési körülmények: általános lineáris 10 perces gradiens program (0-100 % B) 0.3 ml/perc térfogatárammal 50×2 mm kationcserélő oszlopon. Az A eluens összetétele: 10 mM ammónium-acetát és 10 mM ecetsav.

A várakozásoknak megfelelően az ammónium-karbonát koncentrációnak jelentősebb hatása van a retencióra, mint az ammónium-acetátnak. Ennek oka, hogy az ammónium-karbonát kétszer annyi, ellenionként viselkedő ammóniumiont tartalmaz, mint az ammónium-acetát. Például a 10 mM ammónium-acetát és 100 mM ammónium-karbonát esetében a  $k_{app} = 12.6$ , míg fordított esetben, vagyis 100 mM ammónium-acetát és 10 mM

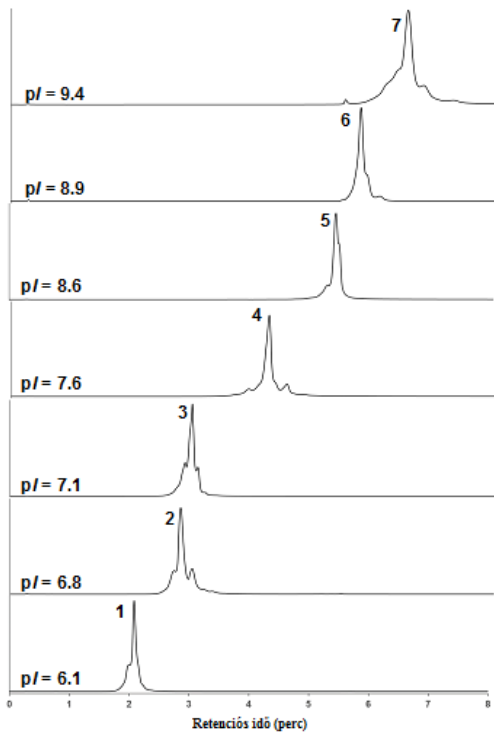


**3. ábra** A bevacizumab kationcserés kromatográfiás profilja különböző B eluens összetételeknél. Mérési körülmények: általános 10 perces gradiens (0-100 % B) 0.3 ml/perc térfogatárammal 50×2 mm kationcserélő oszlopon. Az A eluens 10 mM ammónium-acetátot és 10 mM ecetsavat tartalmazott.

ammónium-karbonát összetételénél csaknem kétszer akkora retenció figyelhető meg ( $k_{app} = 24.1$ ). A 3. ábrán látható, hogy az ammónium-karbonát koncentráció nem csak a retencióra, hanem a szelektivitásra is hatással van. Érdekesség, hogy a legnagyobb szelektivitás 50 mM sókoncentrációnál figyelhető meg, míg kis (10 mM) és nagy (100 mM) koncentrációnál a szelektivitás kisebb. 50 mM ammónium-karbonát alkalmazásával a fő csúcs mellett két bázikus és néhány savas karakterű töltésvariáns is megkülönböztethető, míg alacsony sókoncentrációnál csak egy éles főcsúcs figyelhető meg. A legnagyobb pH válasz meredekség 10 mM ammónium-karbonát koncentráció esetén jelentkezett, amikor a bevacizumab egy éles csúcsban eluálódott. Utóbbi esetben a nagy molekulák ún. „on/off” típusú retenciója miatt a szelektivitást nagy mértékben lecsökkentette a meredek pH-gradiens.

Univerzális MS-barát IEX körülmények mAb-ok elválasztására

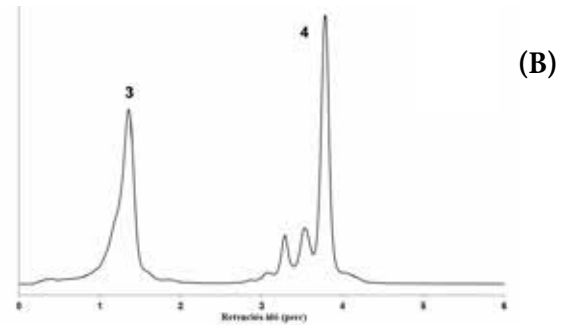
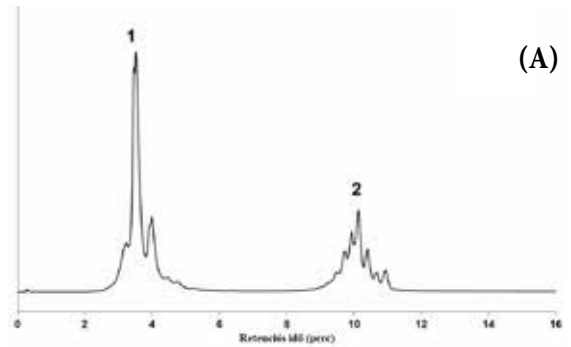
A kidolgozott mozgófázis rendszert több monoklonális antitesttel ( $6.1 \leq pI \leq 9.4$ ) is kipróbáltuk. Mindegyik esetben megfelelő retenció, csúcsalak és szelektivitás mutatkozott (4. ábra). A közel lineáris pH válasznak köszönhetően a mAb-ok pI értékeiknek megfelelő sorrendben eluálódnak, így a relatív retenciójukból a relatív izoelektromos pontjuk meghatározható. A szelektivitás tekintetében elmondható, hogy mind savas, mind bázikus töltésvariánsok elválaszthatók a főcsúcstól, így ez az MS-barát, kombinált só- és pH gradiens módszer töltésérzékeny elválasztást biztosít számos monoklonális antitesthez.



**4. ábra** Intakt mAb-ok CEX kromatogramjai (általános gradiens módszer). 10 mM ammónium-acetát és 10 mM ecetsav (A eluens), 50 mM ammónium-acetát és 50 mM ammónium-karbonát (B eluens). Gradiens: 10-70 % B 8 perc alatt, térfogatáram: 0.3 ml/perc, 50×2 mm gyenge kationcserés oszlop. Csúcsok: (1) bevacizumab, (2) panitumumab, (3) reslizumab, (4) pembrolizumab, (5) atezolizumab, (6) adalimumab és (7) rituximab.

#### Optimalizált MS-barát IEX körülmények mAb-ok elválasztására

A terápiás készítmények hatékonysága a különböző mAb-ok egy terméken belüli kombinációjával növelhető. Például az ipilimumab és a nivolumab, valamint a cetuximab és a panitumumab keverékek hatékonynak bizonyultak bizonyos esetekben. Ezen kombinációk modellezésére megfelelő komponenspárokat tartalmazó mintákat készítettünk, majd gyors, illetve nagy felbontású módszereket optimalizáltunk. pH- és sógradiens együttes alkalmazásával a módszerfejlesztés paramétereinek száma bővíthető, azaz több lehetőségünk nyílik a szelektivitás befolyásolására, így vizsgálható például a gradiens meredekség (arányos a gradiens idővel -  $t_G$ ) és a B eluens sókoncentrációjának hatása. Munkánk során három  $t_G$  értéknél (6, 10 és 18 perc) végeztünk méréseket 0,3 ml/perc térfogatárammal egy 50×2 mm oszlopon. Az így kapott felbontástérképet felhasználva



**5. ábra** A kidolgozott MS-barát mozgófázis alkalmazása mAb-ok kombinációjának elválasztására: (A) nivolumab (1.csúcs) és ipilimumab (2.csúcs) gyors elválasztása, (B) panitumumab (3.csúcs) és cetuximab (4.csúcs) nagy felbontású elválasztása.

az elválasztás optimális paramétereit meghatározhatók. Nivolumab és ipilimumab esetében egy hosszabb elválasztás adott megfelelő szelektivitást (5.A ábra), míg a panitumumab és cetuximab keverékre egy gyorsabb elválasztás bizonyult jobbnak, amikor mindkét főizozom mellett nagyszámú töltésvariáns választható el (5.B ábra).

#### Összefoglalás

Munkánk során egy olyan ioncserés pufferrendszert dolgoztunk ki monoklonális antitestek töltésvariánsainak elválasztására, ami illékony összetevőinek köszönhetően MS detektálással kompatibilis. A legjobb eredmény 10 mM ammónium-acetát és 10 mM ecetsav összetételű A eluens és 50 mM ammónium-acetát és 50 mM ammónium-karbonát összetételű B eluens alkalmazásával érhető el. Ezeket a körülményeket sikeresen alkalmaztuk mAb-ok elválasztására széles pI-tartományban ( $6.1 \leq pI \leq 9.4$ ) és mAb keverékekhez is.

## Felhasznált irodalom

[1] E. Farsang, A. Murisier, K. Horváth, O. Colas, A. Beck, D. Guillaume, S. Fekete, Optimization of ms-compatible mobile phases for iex separation of monoclonal antibodies, LCGC Europe 32 (2019) 29–34.

[2] E. Wagner-Rousset, S. Fekete, L. Morel-Chevillet, O. Colas, N. Corvaava, S. Cianffranci, D. Guillaume, A. Beck, Development of a fast workflow to screen the charge variants of therapeutic antibodies, Journal of Chromatography A 1498 (2017) 147 – 154.

[3] S. Fekete, A.-L. Gassner, S. Rudaz, J. Schappler, D. Guillaume, Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies, Trends in Analytical Chemistry 42 (2013) 74 – 83.

[4] H. Lau, D. Pace, B. Yan, T. McGrath, S. Smallwood, K. Patel, J. Park, S. Park, R. Latypov, Investigation of degradation processes in igg1 monoclonal antibodies by limited proteolysis coupled with weak cation-exchange hplc, Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences 878 (2010) 868–76.

[5] S. Fekete, A. Beck, J. Fekete, D. Guillaume, Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, part ii: ph gradient approach, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 102 (2015) 282 – 289.

[6] T. Ahamed, B. K. Nfor, P. D. Verhaert, G. W. van Dedem, L. A. van der Wielen, M. H. Eppink, E. J. van de Sandt, M. Ottens, ph-gradient ion-exchange chromatography: An analytical tool for design and optimization of protein separations, Journal of Chromatography A 1164 (2007) 181 – 188.

[7] L. Zhang, T. Patapoff, D. Farnan, B. Zhang, Improving ph gradient cation-exchange chromatography of monoclonal antibodies by controlling ionic strength, Journal of chromatography. A 1272.

[8] S. Fekete, A. Beck, J. Fekete, D. Guillaume, Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, part i: Salt gradient approach, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 102 (2015) 33 – 44.

[9] V. Joshi, V. Kumar, A. S. Rathore, Rapid analysis of charge variants of monoclonal antibodies using non-linear salt gradient in cation-exchange high performance liquid chromatography, Journal of Chromatography A 1406 (2015) 175 – 185.

[10] A. Farjami, M. Siahi-Shadbad, P. Akbarzadehlaleh, O. Molavi, Development and validation of salt gradient cex chromatography method for charge variants separation and quantitative analysis of the igg mab-cetuximab, Chromatographia 81.

[11] E. Farsang, A. Murisier, K. Horváth, A. Beck, R. Kormany, D. Guillaume, S. Fekete, Tuning selectivity in cation-exchange chromatography applied for monoclonal antibody separations, part 1: Alternative mobile phases and fine tuning of the separation, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 168 (2019) 138 – 147.

[12] Y. Yan, A. P. Liu, S. Wang, T. J. Daly, N. Li, Ultrasensitive characterization of charge heterogeneity of therapeutic monoclonal antibodies using strong cation exchange chromatography coupled to native mass spectrometry, Analytical Chemistry 90 (2018) 13013–13020.



A készülékhez a *RediSep Rf Gold C18* oszlopot ajánljuk. A *CombiFlash Ez Prep* eszközök további kiegészítőikkel (autoinjektor, oszlopválasztó, autosampler) bővíthetők.

COMBIFlash  
**EZ**  
PREP

hibrid készülék, mely alkalmas mind FLASH (azaz alacsony nyomástartományban), mind pedig PREPARATÍV HPLC készülékként is üzemelni egy ugyanazon szoftver segítségével.

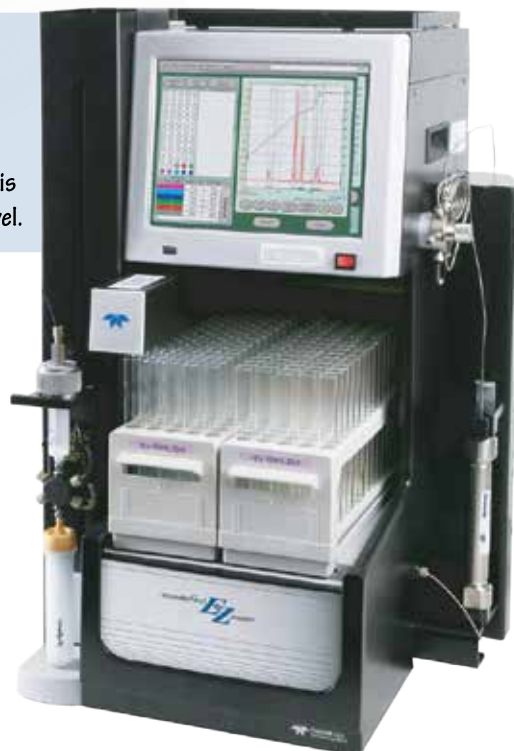
# Kapszaicin hatékony tisztítása CombiFlash® EZ Prep-pel



További információért érdeklődjön kollégánknál!

Kapcsolattartó: Bende Zsolt

E-mail: bende.zsolt@labex.hu Mobil: 06-30-311-8358



# Mintatartó üvegek elővágott- és teli szeptumainak összehasonlítása oldószer veszteség szempontjából

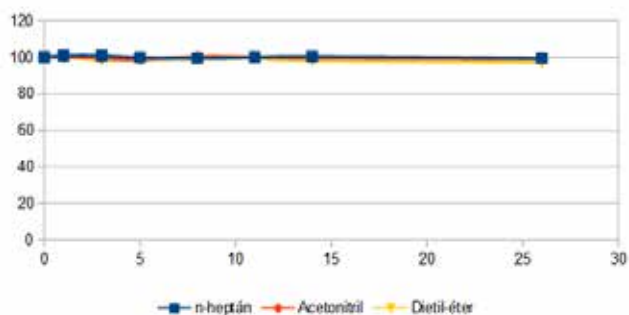
Bálint Balázs, Imrik Péter  
Gen-Lab Kft.

Munkánk során számtalan alkalommal találkoztunk a problémával, mely a területen dolgozó megannyi kollégát is megosztja. Vajon kell-e számolni HPLC minták esetén az elkészített minta oldószerének párolgásával, különösen illékony oldószerek használatával? A kérdés rég óta foglalkoztat nemcsak minket, hanem

az érintettek jelentős részét. A rendelkezésre álló forrásokot kutatva nem találtunk olyan vizsgálati eredményt, vagy adatot mely megnyugtató módon választ adna a kérdésre. Áttekintve a partnereink által használt mintatartó üvegeket és kupakokat jutottunk arra az elhatározásra, hogy egy egyszerű és gyors vizsgálattal megpróbálunk pontot tenni a dolog végére. A mérést elvégezhetjük volna pontosabban, reprodukálhatóbban, de nem volt célunk kvantitatív adatokat generálni mérésünkkel, egyszerűen megelégedtünk tájékoztató jellegű adatokkal. Talán gondolatot ébresztünk ez által az olvasóban.

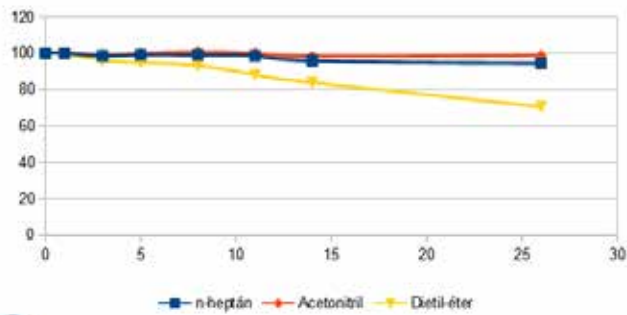
Vizsgálatunk során a leggyakrabban használt 1.5 ml-es mintatartó üvegeket és hozzájuk tartozó vágatlan és elővágott szeptummal ellátott kupakokat használtuk. Az általunk kiválasztott üvegeket körülbelül 1 ml oldószerrel töltöttük fel, majd a megfelelő szeptummal ellátott kupakkal zártuk. Az így előkészített minták tömegét  $t_0$  időpillanatban megmértük és megfelelő időközönként a tömegmérést megismételtük. Vizsgálatunkhoz három különböző oldószert használtunk, melyek illékonyságban jelentősen különböznek egymástól.

**SC9291**  
ND9, nem sliccelt kupak



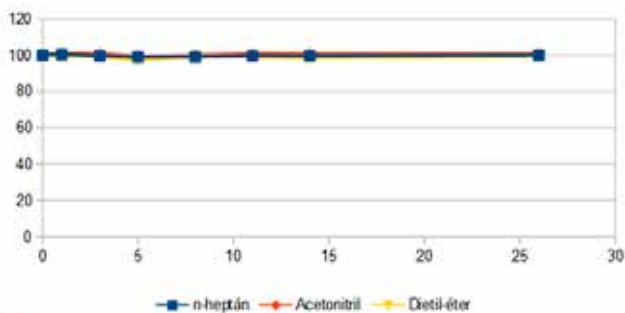
0 h	1 h	3 h	5 h	8 h	11 h	14 h	26 h	
100	101	101	100	100	100	100	100	heptán
100	100	100	99	100	100	100	99	MeCN
100	100	99	97	99	100	98	97	dietil éter

**SC92291**  
ND9, sliccelt kupak



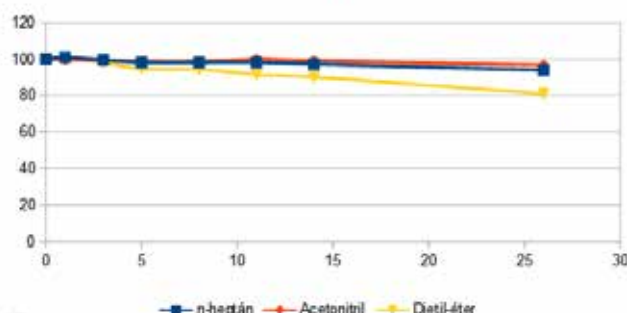
0 h	1 h	3 h	5 h	8 h	11 h	14 h	26 h	
100	100	99	99	99	99	96	94	heptán
100	100	99	100	101	100	98	99	MeCN
100	100	96	95	93	88	84	71	dietil éter

**SC101101**  
ND10, nem sliccelt kupak



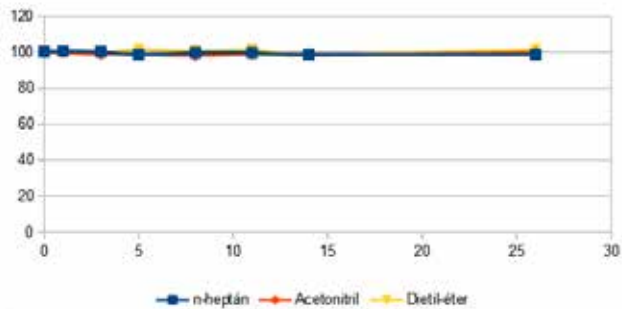
0 h	1 h	3 h	5 h	8 h	11 h	14 h	26 h	
100	100	100	99	99	100	100	100	heptán
100	101	101	100	100	101	101	101	MeCN
100	99	99	98	99	99	99	99	dietil éter

**SC101101**  
ND10, sliccelt kupak



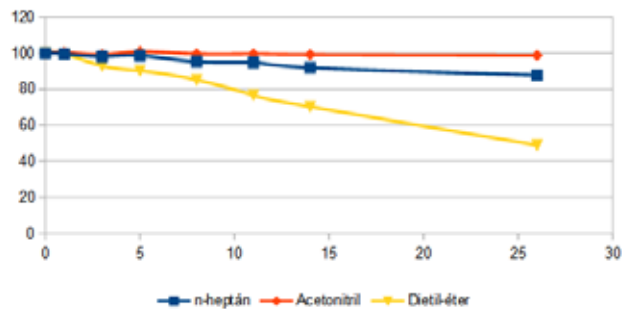
0 h	1 h	3 h	5 h	8 h	11 h	14 h	26 h	
100	101	100	98	98	98	97	94	heptán
100	100	99	99	99	100	99	97	MeCN
100	100	98	95	94	91	90	81	dietil éter

**SC111111**  
**ND11, nem sliccelt kupak**



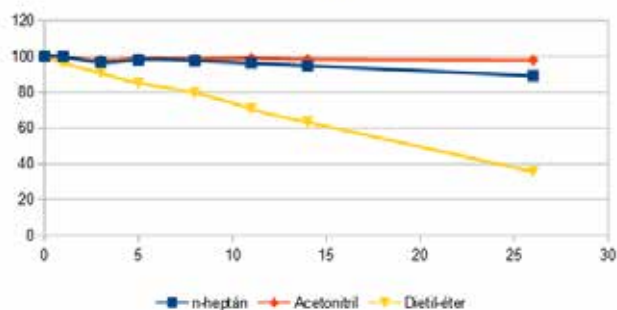
0 h	1 h	3 h	5 h	8 h	11 h	14 h	26 h	
100	100	100	99	100	100	99	99	heptán
100	100	99	99	98	99	98	100	MeCN
100	100	99	101	100	101	99	101	dietil éter

**SC111111**  
**ND11, sliccelt kupak**



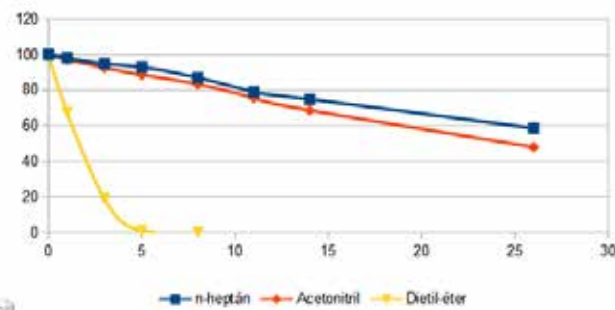
0 h	1 h	3 h	5 h	8 h	11 h	14 h	26 h	
100	100	98	99	95	95	92	88	heptán
100	100	99	101	100	100	99	99	MeCN
100	100	93	90	85	77	70	49	dietil éter

**SC94491**  
**ND9, keresztliccelt kupak**



0 h	1 h	3 h	5 h	8 h	11 h	14 h	26 h	
100	100	97	98	98	96	95	89	heptán
100	100	98	99	99	99	98	98	MeCN
100	96	91	85	79	71	63	36	dietil éter

**Kupak nélkül**



0 h	1 h	3 h	5 h	8 h	11 h	14 h	26 h	
100	98	95	137	87	79	75	59	heptán
100	97	93	89	83	76	69	48	MeCN
100	67	19	1	1	0	0	0	dietil éter

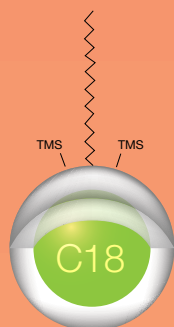
A felhasznált oldószerek rendre az normál heptán (39.97 mm Hg( 20.0 °C)), acetonitril (72.8 mm Hg (20°C)) és a dietil-éter (379.6 mm Hg (20.0 °C)) voltak. A mérés során üvegtípusonként, szeptum típusonként és oldószerenként három párhuzamos mérést végeztünk, a kapott eredményeket átlagoltuk és ábráztuk, mind táblázatos, mind grafikus formában.

**Következtetések**

Amint a fenti ábrákon is jól látható, következésképpen levonható lenne, hogy a nem elővágott (sliccelt) szeptumos kupakkal lezárt edényzetekből nem, illetve nagyon kis mértékben párolog csak oldószert a vizsgált időtartamon belül. Ami meglepő volt, hogy a menetes kupakkal szerelt edényből a lezárás ellenére kis mértékben fogyott az oldószert. Ennek az okát a meghúzás erősségében kereshetjük. Feltételezve, hogy kézzel is jelentősen túl lehet húzni a mintatartó üveg kupakját - ezáltal deformálva a szeptumot-, mely így utat nyithat az oldószertnek. Ugyan ez a jelenség adhat okot a krimpelhető lezárónál tapasztalható minimális

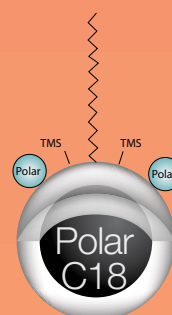
oldószertfogyásra is. Az elősliccelt kupaktípusoknál sokkal inkább megfigyelhető az oldószert elpárolgása, ugyanakkor szeretném megjegyezni, hogy az átlagos használati idő (szekvenciára várakozás, mintaelőkészítés miatti várakozás) alatt nagyon minimális. A korábban megemlített jelenség adhat magyarázatot az elővágott kupakok közötti oldószertfogyás különbségeire is. A kupaknak a szeptumra ható leszorító ereje által okozott deformáció kinyithatja az elővágott részt, ezáltal növelve a rést és ezzel elősegítve a párolgást. A zárt szeptumokhoz hasonlóan, az elővágott szeptumok esetén is azon kupaktípusoknál találtuk jelentősebbnek a párolgást, ahol a kupak rögzítése lehetőséget ad a szeptum deformálására. Végkövetkeztetésként nem szeretnénk egyik kupak, vagy szeptum típust sem javasolni, előtérbe helyezni, vagy akár kizárni. Mindenkinek megvan a készülékéhez, szokásaihoz és főképpen szívéhez legközelebb álló, legalkalmasabb típus. Bízom benne, hogy munkánk elérte célját és gondolatokat ébresztett a kedves felhasználóban, ha másban nem akkor abban, néha mennyire triviális és napi szinten végzett dolgokon is mennyi múlhat, mint egy megfelelő kupak helyes feltekerése.

## Hydrophobic Compounds



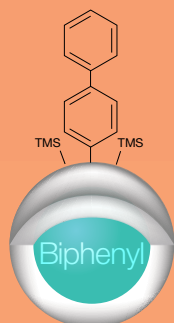
**Kinetex C18**

## Polar Acids

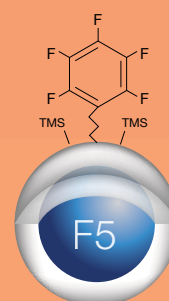


**Kinetex Polar C18**

## Closely Related Structures

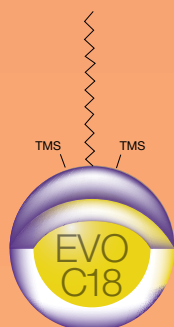


**Kinetex Biphenyl**



**Kinetex F5**

## Alkaline Conditions



**Kinetex EVO C18**

## Polar Bases



**Kinetex PS C18**

### Kinetex Ordering Information

2.6 µm Minibore Columns (mm)				SecurityGuard <sup>™</sup> ULTRA Cartridges <sup>†</sup>
Phases	50 x 21	100 x 21	150 x 21	3/pk
PS C18	00B-4780-AN	00D-4780-AN	00F-4780-AN	AJ0-8951
for 21mm ID				

2.6 µm MidBore <sup>™</sup> Columns (mm)				SecurityGuard <sup>™</sup> ULTRA Cartridges <sup>†</sup>
Phases	50 x 3.0	100 x 3.0	150 x 3.0	3/pk
PS C18	00B-4780-Y0	00D-4780-Y0	00F-4780-Y0	AJ0-8950
for 3.0mm ID				

2.6 µm Analytical Columns (mm)					SecurityGuard <sup>™</sup> ULTRA Cartridges <sup>†</sup>
Phases	50 x 4.6	100 x 4.6	150 x 4.6	250 x 4.6	3/pk
PS C18	00B-4780-E0	00D-4780-E0	00F-4780-E0	00G-4780-E0	AJ0-8949
for 4.6mm ID					

<sup>†</sup> SecurityGuard ULTRA Cartridges require holder, Part No.: AJ0-9000.

**BE-HAPPY**<sup>™</sup>  
guarantee

Your happiness is our mission. Take 45 days to try our products. If you are not happy, we'll make it right.

[www.phenomenex.com/behappy](http://www.phenomenex.com/behappy)



MINTATARTOUVEG.HU

*mintatartouveg.hu*

