

PANNON EGYETEM

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Páll Boglárka Zsuzsa

2025

Doktori (PhD) értekezés

**GYÓGYSZERHATÓANYAGOK ÉS - SZENNYEZŐK RETENCIÓS
TULAJDONSÁGAINAK VIZSGÁLATA NAGYHATÉKONYSÁGÚ
IONKROMATOGRÁFIÁS RENDSZERBEN**

Készítette:

Páll Boglárka Zsuzsa
okleveles vegyészmérnök

DOI:10.18136/PE.2025.938

Témavezetők:

Dr. Horváth Krisztián
egyetemi docens

Dr. Kormány Róbert
címzetes egyetemi docens, Pannon Egyetem
senior szerkezetkutató, Egis Gyógyszergyár Zrt.

Készült a Pannon Egyetem
Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskolája keretében

Pannon Egyetem
Analitikai Kémia Kutatócsoport



Veszprém
2025

**GYÓGYSZERHATÓANYAGOK ÉS - SZENNYEZŐK RETENCIÓS TULAJDONSÁGAINAK
VIZSGÁLATA NAGYHATÉKONYSÁGÚ IONKROMATOGRÁFIÁS RENDSZERBEN**

Az értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében készült a Pannon Egyetem Kémiai és
Környezettudományi Doktori Iskolája keretében

Kémiai tudományok tudományágban

Írta: Páll Boglárka Zsuzsa

Témavezető: Dr. Horváth Krisztián

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....

témavezető

Témavezető: Dr. Kormány Róbert

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....

témavezető

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: igen /nem

Bíráló neve: igen /nem

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján%-ot ért el.

Veszprém,

.....

a Bíráló Bizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése

Veszprém,

.....

az EDHT elnöke

Kivonat

Gyógyszerhatóanyagok és - szennyezők retenciós tulajdonságainak vizsgálata nagyhatékonyságú ionkromatográfiás rendszerben

A dolgozat célja a különböző hatóanyagokban található szennyezők retenciós viselkedésének bemutatása ionkromatográfiás vizsgálat során, valamint, a különböző ionok meghatározására fejlesztett módszereken keresztül rávilágítani arra, hogy az ionkromatográfiának, azon belül is az ioncsere-kromatográfiának milyen szerepe lehet a gyógyszerhatóanyagok/készítmények vizsgálata szempontjából. A disszertáció olyan vegyületek ionkromatográfiás megoldhatóságára is fókuszál, melyek meghatározása nehezen és/vagy csak valamilyen nagyműszeres megoldással lennének kivitelezhetőek.

A dolgozat első részében az irodalmi áttekintés ad egy rövid összefoglalót a kromatográfia alapjairól, és a kísérletek során alkalmazott összefüggésekről. Ez a fejezet ad számot az ioncsere-kromatográfiáról, valamint a mérés során használt berendezések felépítéséről is. Külön szó esik az ionkromatográfián mérhető vegyületekről/ionokról, valamint az "Eszközök, anyagok" fejezetben az alkalmazott készülékekről és vegyszerekről.

A dolgozat „Eredmények” részénél a Szerző ecetsav meghatározását mutatja be gázkromatográfia és ionkromatográfia segítségével, valamint elvégzi a fejlesztett módszerek limit szintű validálásainál kapott eredményei összehasonlítását.

A nátrium-azid meghatározása kulcsfontosságú egy olyan hatóanyag esetében, ahol a tetrazol gyűrű kialakításának egyik technológiai lépésében magát az azidot alkalmazzák alapanyagként. A hatóságok által megszabott szigorú feltételeknek való megfeleléshez a Szerző bemutatja az azidion cilostazol hatóanyagban történő vizsgálatát, valamint a módszer fejlesztését, mely magában foglalja a módszer hatékonyságának vizsgálatát és az azidion retenciós viselkedésének bemutatását a hőmérséklet változásának hatására.

További vizsgálatai során trisz (trisz(hidroximetil)-aminometán), nátrium-, valamint lítiumkationok retenciós viselkedésével foglalkozik egy meglehetősen mátrixterhelt rendszerben, majd igazolja, hogy ezen rendszer alkalmas felbontás javítására a trisz-és nátriumion között.

Végül a Szerző leírja az *N*-brómszukcinimid meghatározását és a módszer fejlesztésének lépéseit prasugrel hatóanyagban. A Jelölt által fejlesztett mintaelőkészítési lépést a prasugreltől egy teljesen eltérő szerkezetű hatóanyag esetében is alkalmazza, annak igazolására, hogy a mintaelőkészítés, vagy annak bizonyos elemei (lúgos oldószer, extrakció) általánosan is alkalmazhatóak bromidion képzésére az *N*-brómszukcinimidből.

Abstract

Investigation of the retention properties of active pharmaceutical ingredients and contaminants in high performance ion chromatography system

The aim of this dissertation is to describe the retention behaviour of impurities in different active ingredients by ion chromatography and to highlight the role of ion chromatography, including the ion-exchange chromatography, in the analysis of active pharmaceutical ingredients/products by means of methods developed for the determination of different ions. The essay focuses on the feasibility of investigating a number of compounds that may not or hardly measurable or can only be investigated by mass spectrometry.

In the first part of the thesis, the literature review gives a brief summary of the fundamental contexts of chromatography, which are used in the experiments. In this section, a short and concise history of the ion-exchange chromatography and the units of the instrument used for the measurements is given. The group of compounds that can be measured by ion-exchange chromatography is also defined in this chapter. The equipment, chemicals and columns used are listed in the section 'Eszközök, anyagok'.

The 'Eredmények' of the thesis are presented, showing the determination of acetic acid by gas chromatography and ion chromatography and the comparison of the results obtained. The determination of sodium azide is need for an active pharmaceutical ingredient (API) that is used in the synthesis pathway to form the tetrazole ring. To meet the strict requirement set by the authorities, the author describes the determination of sodium azide content of cilostazol API and the development of a method that includes the efficiency of the method and the retention behaviour of the azide ion depending on temperature of the column. Further investigations were made for the retention behavior of tris (tris-hydroxymethyl)-aminomethan), sodium and lithium cations in a strongly matrix-loaded system and demonstrates that, this system is suitable for improving the resolution between tris and sodium ions.

Finally, the Author describes the determination of N-bromosuccinimide and the steps for the method development in prasugrel API. The sample preparation step developed by the Author is also applied to a drug with a completely different structure from prasugrel to demonstrate that the sample preparation, or some parts of it (alkaline solvent, extraction), can be applied in general to the formation of bromide ion from N-bromosuccinimide.

Résumé

Etude des propriétés de rétention des ingrédients pharmaceutiques actifs et des contaminants dans un système de chromatographie ionique à haute performance

L'objectif de cette thèse est de décrire le comportement de rétention des impuretés dans différentes substances actives lors de la chromatographie ionique et de mettre en évidence le rôle de la chromatographie ionique, et en particulier de la chromatographie d'échange d'ions, dans l'analyse des principes pharmaceutiques actifs/préparations à l'aide de méthodes développées pour la détermination de différents ions. La thèse se concentre également sur la faisabilité de l'analyse par chromatographie ionique de composés difficiles à déterminer et/ou qui ne peuvent être déterminés qu'à l'aide d'une forme d'instrumentation à grande échelle.

Dans la première partie de la thèse, la revue de la littérature donne un bref résumé des bases de la chromatographie et des contextes utilisés dans les expériences. Dans cette section, une description brève et concise de la chromatographie par échange d'ions et des unités de l'instrument utilisé pour les mesures est donnée. La gamme de composés pouvant être mesurés par chromatographie d'échange d'ions est également définie. Dans la section « Eszközök, anyagok », l'appareil, les produits chimiques et les colonnes utilisés sont énumérés.

Dans la section « Eredmények » du document, l'auteur décrit la détermination de l'acide acétique par chromatographie en phase gazeuse et par chromatographie ionique et compare les résultats obtenus.

La détermination de l'azide de sodium est cruciale pour une substance active qui est utilisée dans la voie de synthèse pour former le cycle tétrazole. Pour répondre aux critères stricts fixés par les autorités, l'auteur décrit le dosage du cilostazol dans la substance active et le développement d'une méthode, y compris le test de l'efficacité de la méthode et le comportement de rétention de l'ion azide sous l'influence du changement de température.

Elle étudie le comportement de rétention des cations tris, sodium et lithium dans un système fortement chargé en matrice et démontre que ce système permet d'améliorer la résolution entre les ions tris et sodium.

Enfin, l'auteur décrit la détermination du N-bromosuccinimide et les étapes de développement de la méthode pour le prasugrel. Il applique également l'étape de préparation de l'échantillon développée par l'auteur à une substance médicamenteuse dont la structure est complètement différente de celle du prasugrel, afin de démontrer que la préparation de l'échantillon, ou certains de ses éléments (solvant alcalin, extraction), peut être utilisée en général pour former un ion bromure à partir du N-bromosuccinimide.

Tartalomjegyzék

Bevezetés és célkitűzés	1
1. Irodalmi áttekintő	2
1.1. Kromatográfia alapjai	2
1.1.1. Alapfogalmak	3
1.2. Ionkromatográfia	9
1.2.1. Nagyhatékonyságú ioncsere-kromatográfias rendszer felépítése	11
1.2.2. Ionkromatográfiával meghatározható komponensek	15
2. Eszközök, anyagok	28
2.1. Berendezés, anyagok, oszlopok	28
2.1.1. Berendezés, anyagok	28
2.1.2. Oszlopok	29
3. Eredmények	31
3.1. Hatóanyagban található ecetsav analízisének gázkromatográfias és ionkromatográfias összehasonlítása	31
3.1.1. Limit szintű validálások során kapott eredmények	33
3.2. Nátrium-azid meghatározása cilostazol hatóanyagban	35
3.2.1. Mintaelőkészítés	36
3.2.2. Azidion retenciós tulajdonságai	38
3.2.3. Validálás	41
3.3. A mátrixhatás kihasználása a felbontás javítására trisz- és nátrium-kationok között	45
3.3.1. Az eluens koncentrációjának hatása a nátrium-kation viselkedésére	47
3.3.2. Az oszlop hőmérséklet és az injektált térfogat hatása	48
3.4. <i>N</i> -brómszukcinimid meghatározása gyógyszerhatóanyagokban	57
3.4.1. Mintaelőkészítés fejlesztése	58
3.4.2. Oldatkészítések és mérési módszer prasugrel hatóanyag vizsgálata esetében	61

3.4.3. Validálás prasugrel hatóanyagban található NBS vizsgálata esetében . . .	62
3.4.4. Favipiravir hatóanyagban található <i>N</i> -brómszukcinimid meghatározása	64
4. Összefoglalás	68
Irodalomjegyzék	69
Tézispontok	i
Theses	iii
A szerző tudományos munkássága	v
Köszönetnyilvánítás	viii

Jelölésjegyzék

α	szelektivitási tényező	d_p	szemcseátmérő
API	active pharmaceutical ingredient- gyógyszer hatóanyag	D_s	diffúziós állandó az állófázisban
A_s	gyógyszerkönyvi szimmetria faktor	ESI	elektrospray ionizáció
β	fázisarány	η	viszkozitás
CDI	N,N'-karbonil-diimidazol	Φ	áramlási ellenállás
c_m	mozgófázisbeli koncentráció	FID	lángionizációs detektor
c_s	állófázisbeli koncentráció	γ	a töltet zezugosságára jellemző állandó
ΔE	belső energia változás	GC	gázkromatográfia
ΔH	komponens mozgófázisból az állófázisba történő átjutása során fellépő entalpiaváltozás	H	tányérmagasság
Δp	oszlopmenti nyomáscsökkenés	HPIEC	nagyhatékonyságú ioncsere-kromatográfia
ΔS	komponens mozgófázisból az állófázisba történő átjutása során fellépő entrópiaváltozás	HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
ΔV_m	parciális moláris térfogatok közötti különbség az álló- és mozgófázisban	IC	ionkromatográfia
d_f	folyadékfilm vastagsága	ICH	Nemzetközi Harmonizációs Konferencia
DL	detektálási határ	k	retenciós tényező
D_m	diffúziós állandó a mozgófázisban	K	megoszlási hányados
		$K_{A/E}$	ioncsere-egyensúlyi állandó
		λ	töltetre jellemző empirikus állandó

L	kolonnahossz	S/N	jel/zaj arány
LC	folyadékkromatográfia	T	abszolút hőmérséklet
MSA	metánszulfonsav	T_f	tailing faktor
N	elméletitányér-szám	TOF	repülési idő analizátor
Na-azid	Nátrium-azid	t_o	holtidő
NBS	<i>N</i> -brómszukcinimid	t_R	retenciós idő
NMR	mágneses magrezonancia	t'_R	nettó retenciós idő
n_m	adott komponens mozgófázisbeli mennyisége	Trisz	trometamin, trisz(hidroximetil)-aminometán
n_s	adott komponens állófázisbeli mennyisége	u_o	mozgófázis vándorlási sebessége
p	nyomás	u_A	adott komponens oszlopon belüli vándorlási sebessége
Q	kvadrupól analizátor	UHPLC	ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
QL	Mennyiségi meghatározás alsó határa	V_m	mozgófázis térfogata
R	egyetemes gázállandó	V_s	állófázis térfogata
RP-LC	fordított fázisú folyadékkromatográfia	w	az alapvonalnál meghatározott csúcshélesség
R_s	felbontás	w_{0,5}	a csúsmagasság felénél meghatározott csúcshélesség
σ	komponens csúcsának varianciája		

Bevezetés és célkitűzés

A kismolekulás gyógyszerengedélyezések száma a makromolekulás készítmények mellett még mindig jelentős, és ezen engedélyezéseknek való megfelelés egyre nagyobb kihívást jelenthet az egyre szigorodó követelmények mellett. A gyógyszerhatóanyagok előállításakor a szintézis-út során alkalmazott reagensek és a reakciók, vagy az esetlegesen végbemenő mellékreakció során képződött egyéb termékek vizsgálata a gyártott termékben szükségszerű a nemzetközi előírásoknak köszönhetően, melyek megszabják az engedélyezések feltételeit. Abban az esetben, ha az alkalmazott vagy képződött vegyület rákkeltő vagy mutagén hatású, akkor azt rendkívül alacsony kimutatási határral kell pontosan mennyiségileg is megadni a vizsgálat során és bizonyítani, hogy a hatóságok által megadott szint alatt van a gyártott végtermékben.

A módszerek fejlesztése és vizsgálata gyógyszeranalitikai feladat, melyhez az alkalmazható technikák széles köre áll rendelkezésre. A termék minősítéséhez és törzskönyvezéséhez vezető út a színmeghatározástól a titráláson és a nagyműszeres technikákon (tömegspektrometria, NMR) át vezet. A termék teljes minősítési eljárása során az egyes vizsgálatok együtt adnak egy teljes képet a szennyezésprofilról és a hatóanyag-tartalomról.

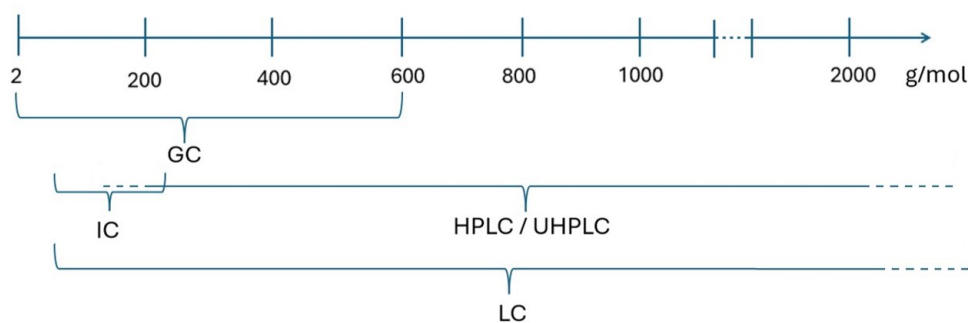
A gyógyszeranalitikai vizsgálatok egyik fő ága a kromatográfia. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias vizsgálatok adják a kromatográfias elemzések jelentős részét, köszönhetően a különböző detektor és kolonna fejlesztéseknek. Ehhez járul hozzá az ionkromatográfia, mint a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia egyik ága. A kutatómunkám egyik célkitűzése volt bemutatni és megerősíteni az ionkromatográfia jelentőségét a gyógyszerhatóanyagok és szennyezőik vizsgálata során rávilágítva ezzel a gyógyszeranalitikán belüli helyére. További célom volt a meghatározandó komponensek retenciós viselkedésének elemzése az ionkromatográfias mérések során.

1. Irodalmi áttekintő

Az irodalmi áttekintőben bemutatom a kromatográfia alapjait, valamint a vizsgálatokhoz tartozó ionkromatográfiai alapokat, míg a specifikus irodalmakat az eredmények leírásánál adom meg.

1.1. Kromatográfia alapjai

A kromatográfia olyan analitikai technika, mely többkomponensű rendszerek (vizsgálandó minta) minőségi és mennyiségi meghatározására alkalmas. Ezen többkomponensű rendszert mozgófázissal áramoltatva egy megfelelően megválasztott helyhez kötött állófázison keresztül, bizonyos kölcsönhatás(oka)t kihasználva a különböző komponensek elválaszthatóak és mennyiségileg meghatározhatóak. Az elválasztás maga a mozgó- és állófázis közötti dinamikus anyagátmeneten alapszik, mely többféle kölcsönhatáson keresztül lehetséges, például adszorpció, abszorpció, H-hidas kölcsönhatás, ioncsere, komplexképzés, stb. A kromatográfias módszerek csoportosítása több szempontból is lehetséges, az egyik a mozgófázis halmazállapota szerinti. Tehát abban az esetben, ha a mozgófázis gáz, akkor gázkromatográfiáról (GC), ha folyadék, akkor folyadékkromatográfiáról (LC) beszélhetünk. Ezen felsorolás természetesen nem teljeskörű, egyéb megoldások is léteznek, de ez a két legjelentősebb ága a kromatográfiának. A különböző kromatográfias technikák a vizsgálható vegyületek molekulatömege szerint is csoportosíthatóak (1.1.ábra). Ez a csoportosítás természetesen közös metszeteket is tartalmaz, vagyis az egyes csoportok átjárhatóak, hiszen például gázkromatográfiával mind a kis móltömegű, mind a nagy móltömegű, változtatás nélkül elpárologtatható vegyületek, mind a jóval nagyobb móltömegű vegyületek (származékképzéssel) is analizálhatóak [1].



1.1. ábra. Különböző kromatográfiai technikák csoportosítása a vizsgált molekulák móltömege szerint (GC, ionkromatográfia (IC), nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC), ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (UHPLC), LC [1]).

A gyógyszeranalitikai vizsgálatok legnagyobb részét a kromatográfiai technikák teszik ki, ezen belül is a folyadékkromatográfia adja az elemzések jelentős részét. Utóbbi elválasztásokat az álló- és mozgófázis tulajdonságai szabják meg. Ezek alapján több módszer különíthető el egymástól: normál fázisú, fordított fázisú, fordított fázisú ionpár, ionkizárásos, hidrofíl kölcsönhatáson alapuló, méretkizárásos, ioncserés, hidrofób kölcsönhatáson alapuló, valamint királis folyadékkromatográfia.

1.1.1. Alapfogalmak

A kromatográfiai elválasztás során pillanatszerűen a mozgófázisba (eluensbe) juttatott kis térfogatú mintában található komponensek a dinamikus szorpciós-deszorpciós és migrációs folyamatok során elválnak és eltérő időben fognak a detektorba jutni, ahol a bejutó anyag mennyiségével arányos jelet kapunk. Az így kapott kromatogramok minőségi és mennyiségi információt adnak a vizsgált mintáról. A retenciós idő szolgáltatja a minőségi információt, míg a csúcs alatti terület adja a mennyiségi adatot az ismeretlen komponensről. A retenciós idő (t_R) nem más, mint az az idő, mely a minta bejutásától az adott komponens detektor jelének maximumáig eltelik. Ez egy bruttó idő, mely készülékenként eltérő lehet, ezért ezt az értéket korrigáljuk a holtidővel (t_0), ami nem más, mint a kromatográfiai oszlopon nem megkötődő komponens retenciós ideje. Az így kapott ún. nettó retenciós idő (t'_R) már független a folyadékkromatográfiai rendszer geometriájától (1.1).

$$t'_R = t_R - t_0 \quad (1.1)$$

Az elválasztás során az álló- és mozgófázis közötti megoszlás a megoszlási hányadossal (K) jellemezhető, mely az adott komponens két fázisbeli koncentrációviszonyának hányadosaként fejezhető ki (1.2).

$$K = \frac{c_s}{c_m} \quad (1.2)$$

ahol c_s az állófázisbeli koncentrációt, míg a c_m a mozgófázisbeli koncentrációt jelöli.

Az adott fázisokban található anyagmennyiségek hányadosa a retenciós tényező, k . Abban az esetben, ha nem változnak a körülmények az analízis során, és így a komponensek vándorlási sebessége konstans, k megegyezik az alkotó állófázison töltött idejének ($t_R - t_0$) és a mozgófázisban töltött idejének (t_0) hányadosával (1.3).

$$k = \frac{n_s}{n_m} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1.3)$$

ahol n_s és n_m a komponens mennyisége (mól) az álló- és mozgófázisban.

A megoszlási hányados és a retenciós tényező közötti kapcsolatot a fázisarány (β) teremti meg, mely az álló- és mozgófázis térfogatának hányadosa (1.4).

$$K = \frac{V_m}{V_s} k = \beta k \quad (1.4)$$

A retenciós tényező, és ezen keresztül a megoszlási hányados határozza meg egy adott komponens oszlopon belüli vándorlási sebességét, u_A

$$u_A = \frac{u_0}{1 + k} \quad (1.5)$$

Amennyiben két komponens retenciós tényezője eltér, úgy vándorlási sebességük is különböző lesz, így van esély azok elválasztására. Két komponens retenciós tényezőjének hányadosa adja a szelektivitási tényezőt:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_2}{K_1} \quad (1.6)$$

A retenciós idő kifejezhető az (1.3) egyenletből, a holtidő megadható a kolonna hosszának (L) és a mozgófázis lineáris áramlási sebességének (u_0) hányadosaként (1.8).

$$t_R = t_0 (1 + k) \quad (1.7)$$

$$t_0 = \frac{L}{u_0} \quad (1.8)$$

Az elúció sebessége függ az adott komponens molekuláris jellemzőitől, az eluens összetételétől, az állófázis kémiai tulajdonságaitól, valamint az alkalmazott hőmérséklettől. A retenció hőmérséklet függését a van't Hoff összefüggés írja le:

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \beta \quad (1.9)$$

ahol ΔH és ΔS a komponens mozgófázisból az állófázisba történő átjutása során fellépő entalpia- és entrópiaváltozás, R az egyetemes gázállandó, T pedig az abszolút hőmérséklet.

Általánosságban elmondható, hogy a hőmérséklet emelkedésével az anyagátadási folyamatok sebessége nő, a diffúziós állandók értéke nő. Az emelkedő hőmérséklet kedvez a deszorpciónak, így az elúciós térfogat csökkenése figyelhető meg. Ioncsere-kromatográfia esetében a hőmérséklet hatása kevésbé jósolható, melyet befolyásol az ioncserélő anyag típusa is. Tapasztalatok alapján az esetek egy részében a hőmérséklet növelése növelheti a retenciót [2]. Ez a retenció növekedés valójában azonban annak köszönhető, hogy a mintaion és az eluens ellenion egyensúlyát egy picit más mértékben tolja el a hőmérséklet.

A hőmérséklet további hatása, hogy a mozgófázis viszkozitásának változásával csökkenő nyomásváltozást idéz elő [3]. A nyomásesés és a viszkozitás kapcsolatát a Darcy egyenlet (1.10) adja meg.

$$\Delta p = \frac{\phi \eta L u}{d_p^2} \quad (1.10)$$

ahol ϕ az áramlási ellenállás, η a viszkozitás, és d_p a szemcseátmérő.

Az oszlop nyomásesésének hatása a retenció tényezőre a következőképpen írható le:

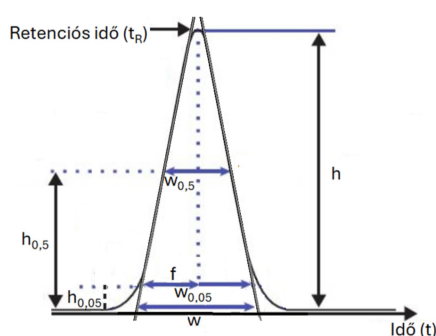
$$\ln k = -\frac{\Delta E}{RT} - p \frac{\Delta V_m}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \beta \quad (1.11)$$

ahol a ΔE a belső energia változása, p a nyomás és a ΔV_m a parciális moláris térfogatok közötti különbség az álló- és mozgófázisban.

A nyomás hatásának vizsgálatával számos tanulmány foglalkozik [4–8]. Megfigyelhető a nyomás növelésével a visszatartási tényező növekedése aromás szénhidrogének és a legtöbb apoláris vegyület esetében, mely mértéke általában 10-25%-os az oszlop hőmérsékletétől füg-

getlenül [9]. Előfordulhat olyan eset is, amikor a nyomásváltozás hatására végbemenő kismértékű visszatartási tényező változása annak köszönhető, hogy a vizsgált mintamolekula kicsi, ezért a parciális moláris térfogat változása az adszorpció során sokkal kisebb, mint a nagyobb molekulák esetében [9].

A kromatográfias analízis eredményeként, ideális esetben a komponensek adott szélességű, Gauss-görbe jellegű csúcsokként jelennek meg a kromatogramon (1.2. ábra). Az oszlopban lejátszódó folyamatok következményeként az elúciós sáv folyamatosan szélesedik, és minél több időt tölt az állófázison az adott komponens, annál szélesebb lesz a kromatogramon megjelenő csúcsa. Mivel a csúcsok szélessége közvetlenül meghatározza az adott idő alatt elválasztható komponensek számát, ezért a kromatográfias hatékonyságot a csúcshatárterület határozza meg.



1.2. ábra. Kromatográfias csúcsok geometria jellemzése.

Egy adott elválasztás hatékonyságának megadása több elmélet szerint is lehetséges, ezek közül az egyik megközelítés a tényérelmélet, mely értelmében a kromatográfias oszlopot, mint rektifikáló oszlopot képzelet el, ahol az egyes elméleti tényérokön a két fázis egyensúlyban van [10]. Ezen elmélet feltételezi, hogy az egyes tényérokön pillanatnyi kvázi egyensúly áll be, a megoszlási hányados független a koncentrációtól, a mozgófázis folyamatosan áramlik az egyik tényérről a másikra, valamint elhanyagolja a hosszirányú diffúziót [11].

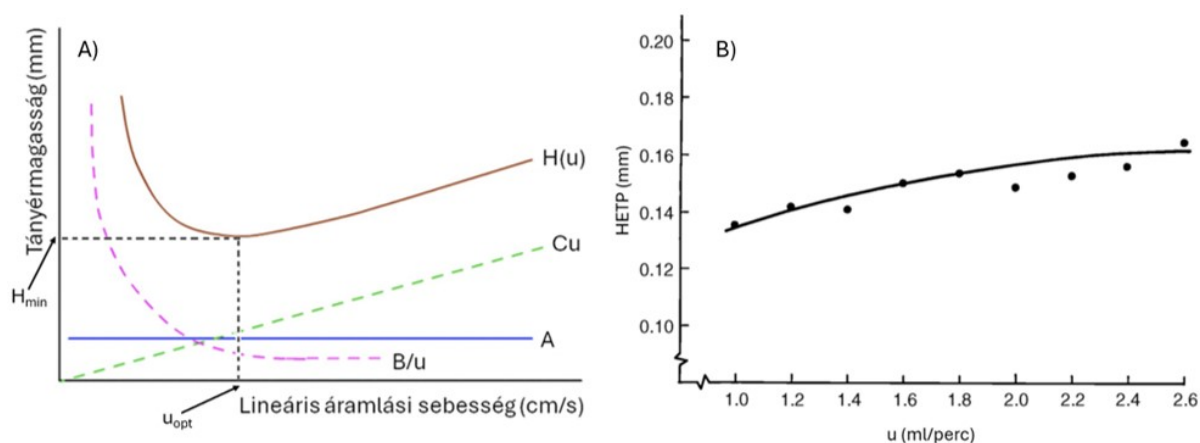
Van Deemter és munkatársai által kidolgozott sebességi elmélet [12] már figyelembe veszi az áramlási viszonyokat, az anyagátadással szembeni ellenállást, valamint a hosszirányú diffúziót is, tehát a fő csúcshatárterület hatásokat, melyek csökkentik a hatékonyság mértékét. Ennél a megközelítésnél az egy elméleti tényérra jutó tényérmagasságot (H) az alábbiak szerint fejezzük ki.

$$H = A + \frac{B}{u_0} + C u_0 = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_m}{u_0} + \left(\frac{\omega d_p^2}{D_s} + \frac{\rho d_f^2}{D_m} \right) u_0 \quad (1.12)$$

Az összefüggésben az első, A tag az ún. örvénydiffúziós tag, vagyis a szemcsék közötti tér egyenetlenségeiből eredő sebességkülönbség zónaszélesítő hatása, ahol a λ a töltetre jellemző empirikus állandó, míg d_p a szemcseátmérő. A második, B/u_0 tag a hosszirányú diffúziót leíró

tag, ahol γ a töltet zegzugosságára jellemző állandó, D_m pedig a diffúziós állandó a mozgófázisban. A harmadik, $C u_0$ tag a fázisok közötti anyagátadási gátlásból eredő zónaszélesítő hatásokat foglalja magában, mégpedig a pórusdiffúziót, a külső (film) anyagátadási ellenállást és az adszorpciót-deszorpció kinetikáját [12]. Az (1.12) kifejezésben az ω és ρ állandók, d_f az állófázis szemcséket körülvevő folyadékfilm vastagsága és D_s a diffúziós állandó az állófázisban.

Az adott tagok ismeretében meghatározható az adott komponens legkisebb tányérmagasságához (leghatékonyabb ponthoz) tartozó optimális áramlási sebesség (pld.: grafikusán a $H - u_0$ görbe ábrázolásával, 1.3. ábra). Egy anioncserélő oszlopon felvett $H - u_0$ görbe látható az 1.3/B ábrán, mely esetében elmondható, hogy az áramlási sebesség növelése nem jár a hatékonyság szignifikáns csökkenésével, így a sebesség növelésének csak a nyomásesés szabhat határt.



1.3. ábra. $H-u$ görbe A) elméleti, B) anioncserés elválasztás során meghatározott gyakorlati görbe [13].

Míg az elméletitányér-magasság a kromatográfias állófázis hatékonyságát jellemzi, addig az ún. elméletitányér-szám, N , a teljes oszlop hatékonyságát írja le. N az alábbiak szerint számítható:

$$N = \frac{t_R^2}{\sigma^2} \approx 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \approx 5,55 \left(\frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2 \quad (1.13)$$

ahol σ a komponens csúcsának varianciája, w az alapvonalon mért csúcshélesség, $w_{0,5}$ pedig a csúcsmagasság felénél meghatározott csúcshélesség. Emellett N kifejezhető az oszlop hosszának (L) és az elméletitányér magasságának (H) hányadosával:

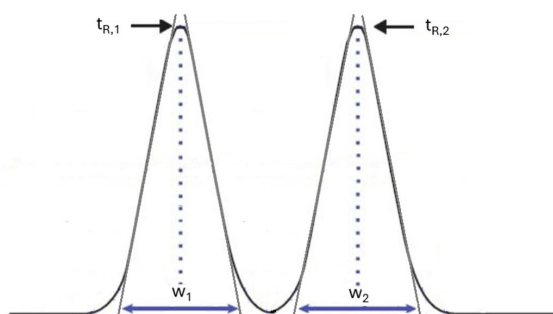
$$N = \frac{L}{H} \quad (1.14)$$

Az elúció során az egyes komponensek csúcsai nem minden esetben szimmetrikus lefutásúak. Csúcsszimmetria torzulás léphet fel számos esetben, mint például a kromatográfiaszlop degradálódása, állófázis inkompatibilitás, nem megfelelően választott injektált térfogat, termosztálási probléma, nem megfelelő mintaoldat koncentráció, mozgófázis pH, stb. A gyógyszerkönyvek alapján meghatározott csúcsszimmetria jelző értéke a szimmetria faktor (A_s), vagy tailing faktor (T_f), mely a következők alapján számítható, ahol is az f az a csúcs elülső szegmensének szélessége az 5%-os csúcsmagasságnál (1.2. ábra) [14].

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2f} \quad (1.15)$$

Több komponensű keverékek esetében fontos mérőszám a felbontás (R_s), mely számszerűleg megadja két komponens közötti elválasztás mértékét.

$$R_s = 2 \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_1 + w_2} \quad (1.16)$$



1.4. ábra. Két komponens közötti felbontás meghatározása.

Tetszőleges csúcspárok közötti felbontás számítható az (1.16) összefüggés alapján, a retenciós idők és az alapvonalon mért csúcshélességek segítségével. Közel eluálódó csúcsok közötti felbontás esetében, ahol $R_s = 1,0$, a csúcsok kb. 2%-ban átfednek, ezért az alapvonal elválasztást az $R_s > 1,5$ érték jelzi. A gyógyszeranalitikai eljárások során ezen érték alapvető követelmény, melyet mind az európai, mind az amerikai gyógyszerkönyv is előír.

A felbontás közelíthető a hatékonyság, szelektivitás és retenciós tényezők segítségével az alábbi összefüggés szerint:

$$R_s \simeq \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{1 + k} \quad (1.17)$$

Belátható, hogy kritikus csúcspárok megfelelő elválasztásához az (1.17) összefüggés mind-

három tagjának optimalizálására is szükség lehet egy módszerfejlesztés során. A hatékonyságon keresztüli felbontás javítására az oszlopon belüli és az oszlopon kívüli tényezők állnak rendelkezésre. Az oszlophoz kötődő tulajdonságok az oszlophossz, részecskeméret és a töltés minősége. Az oszlopon kívüli tényezők az áramlási sebesség, az injektált térfogat és a holtterfogatok (oszlopon kívüli). A tányérszám növelés hatására a felbontás növekedés négyzetgyökös, így kevésbé hatékony megoldás a felbontás javítására.

A retenciós tényezőn keresztüli felbontás javítása az eluenserősség változtatásával lehetséges. A k célszerű tartománya 1–10 között van, alatta a holtidőhöz túl közel történik az elúció, 10-nél nagyobb érték esetében pedig nagyon hosszú lehet az analízisidő.

A felbontás befolyásolható a szelektivitáson keresztül is, minden olyan paraméteren keresztül, ami hatással van a megoszlási hányadosokra ((1.6) egyenlet), úgy, mint az állófázis típusa, mozgófázis pH -ja, hőmérséklet, szerves oldószer típusa, eluenshez adott egyéb adalékok típusa. A szelektivitás változtatásával jelentős felbontásváltozást érhetünk el, hiszen $\alpha=1$ esetben nincs felbontás, ám $\alpha=1,1$ -nél már 10%-os a megoszlási hányadosok közötti különbség és ezen érték felett a felbontás értéke nagyobb, mint 1,5 megfelelő retenció és a kommerciális oszlopokra jellemző tányérszámok esetén.

1.2. Ionkromatográfia

Az ionkromatográfia definíció szerint ionos vagy ionizálható komponensek meghatározására és/vagy elválasztására alkalmas kromatográfias technika, a folyadékkromatográfias elválasztások egyik tagja, ahol az állófázis szilárd halmazállapotú, míg a mozgófázis folyadék [15]. Az első ionkromatográfias rendszer ioncserén alapuló berendezés volt, mely ppm koncentráció szint alatti anionok vizsgálatát tette lehetővé az 1970-es évektől kezdve [16]. Small és munkatársai először egy két kolonnás rendszert készítettek, ahol egy kis kapacitású ioncserélő oszlop mögé egy újabb ioncserélő oszlopot tettek (szupresszor) és detektálásként vezetőképességmérést alkalmaztak [17], melyek segítségével számos anion és kation elválasztása is lehetővé vált.

Az következő évek folyamán olyan egykolonnás rendszert is fejlesztettek, mely esetében nem volt szükség szupresszállásra (ionelnyomásra), de továbbra is vezetőképesség szerint történt a detektálás [2]. A szupresszállt és a nem szupresszállt rendszerek esetében más-más eluens alkalmazható. Egykolonnás rendszereknél kisebb vezetősű mozgófázis szükséges (pld.: ftálsav, citromsav, borkősav), míg szupresszállt rendszerekben hatékonyan alkalmazhatóak erős savak és bázisok is (pld.: nátrium-hidroxid, metánszulfonsav).

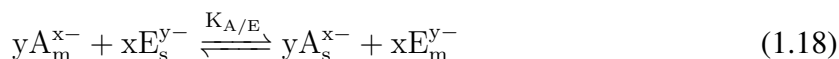
Az ioncsere mellett további retenciós mechanizmusokon (pld.: ionkizárás, ligandumcsere) alapuló alkalmazások is elérhetővé váltak a technika fejlődésével.

Retenciót leíró modellek ioncsere-kromatográfiában

Az ioncserén alapuló elválasztások esetében a retenció előre becsülhető különböző modellek alkalmazásával. Az elválasztás során lejátszódó egyensúlyi folyamatokat leíró modellek empirikus vagy elméleti alapúak. A főbb elméleti modellek a következők:

1. lineáris eluenserősségi modell,
2. Hoover modell [18],
3. kettős eluens modell [19],
4. Kuwamoto modell [20],
5. bővített kettős eluens modell [21],
6. többszörös eluens/minta modell [22],
7. empirikus végpont modell [23],
8. latex modell [24],
9. kriptand modell [25].

A lineáris eluenserősségi modell a legelőször publikált és az ioncsere folyamatok legegyszerűbb leírását adó retenciómodell. Ennek a megközelítésnek az alapja, hogy egyensúlyi folyamatnak írja le az ioncserét, és feltételezi, hogy ez a jelenség sztöchiometrikus [26, 27] (1.18).



ahol A^{x-} a mintaion, E^{y-} a mozgófázisban lévő ellenion, x és y ezek töltése, m index a mozgófázisban (mobile), míg s az állófázison (stationary) tartózkodó ionokat jelöli, $K_{A/E}$ pedig az ioncsere folyamat termodinamikai egyensúlyi állandója. Ioncsere-kromatográfiában ez utóbbit gyakran szelektivitási állandónak is nevezik, mely leírható az egyes fázisokban található ionok egyensúlyi koncentrációinak segítségével.

$$K_{A/E} = \left(\frac{A_s^{x-}}{A_m^{x-}} \right)^y \left(\frac{E_m^{y-}}{E_s^{y-}} \right)^x \quad (1.19)$$

A mozgófázis-ion állófázisbeli koncentrációja az oszlop ioncsere-kapacitásának (Q) ismeretében:

$$E_s^{y-} = \frac{Q}{y} \quad (1.20)$$

Az (1.19), (1.20) összefüggések, valamint az (1.2) és (1.4) egyenletek alkalmazásával a mintakomponensek retenciós tényezője logaritmizált formában számítható:

$$\lg k_A = \frac{1}{y} \lg K_{A/E} + \frac{x}{y} \lg \frac{Q}{y} + \lg \frac{V_s}{V_m} - \frac{x}{y} \lg E_m^{y-} \quad (1.21)$$

Az (1.21). egyenletből a $K_{A/E}$, Q , V_m , V_s adott egy oszlop és mozgófázis alkalmazása esetén, állandó értékek, így egyszerűsíthető az alábbiakra:

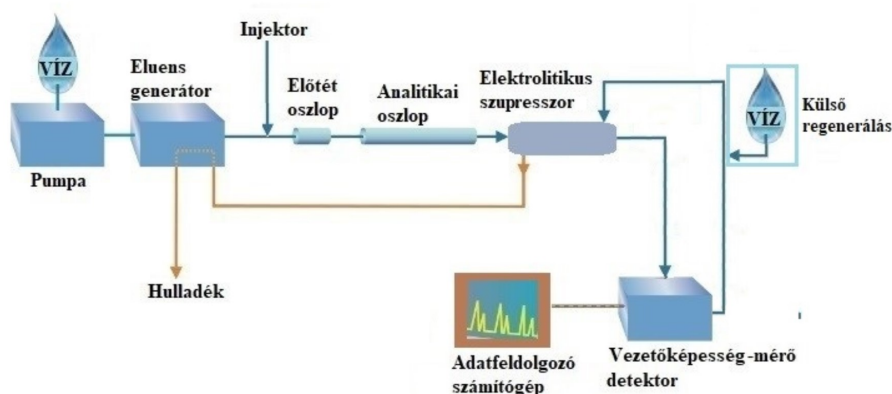
$$\lg k_A = C - \frac{x}{y} \lg E_m^{y-} \quad (1.22)$$

A fenti egyenlet lineáris kapcsolatot mutat a mintakomponensek retenciós tényezője és a mozgófázisban a komponens moláris koncentrációjának logaritmusá között. A kapott egyenes meredeksége a minta és az eluens töltéseinek negatív hányadosát adja meg. A lineáris eluenserősségi modell olyan mozgófázisok esetében alkalmazható, melyek egy anionnal rendelkeznek, például: KOH, NaOH. Összetett eluensek használata esetében (pld.: $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-/\text{OH}^-$), melyek több elleniont is tartalmaznak, a retenció becslésére kiterjesztett modelleket szükséges alkalmazni [2]. Ilyen leírás pl. a Hajós és munkatársai által fejlesztett többszörös eluens/minta modell [22].

A vizsgálataim során, egykomponensű eluenst használtam, ennek megfelelően a lineáris eluenserősségi modellt alkalmaztam, így az összetett mozgófázisok leírására alkalmas modellek bővebb bemutatása nem tárgya a dolgozatomnak.

1.2.1. Nagyhatékonyságú ioncsere-kromatográfias rendszer felépítése

Napjainkban használt készülékek elvi felépítése túlnyomórészt megfelel a Small által alkalmazottnak. A nagyhatékonyságú ioncsere-kromatográfias (HPIEC) rendszer alapjaiban megegyezik egy nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfias rendszer konstrukciójával. Amiben jelentősen eltér ettől a rendszertől, az a szupresszor és a vezetőképességmérő detektor. A kereskedelmi forgalomban elérhető két vezető gyártó által kínált készülékek gyakorlati megoldásai eltérnek egymástól. A Dionex típusú készülékek esetében a szupresszállás nagyrészt egy dinamikus, elektrokémiai regenerálható ioncserező membrán segítségével történik, míg a Metrohm típusúaknál három ioncserező oszloppal oldják meg. A Dionex további fejlesztéssel olyan rendszert épített, mely az eluens pontos koncentrációjának jobb ismételtelhetőségét teszi lehetővé. A kutatási éveim során a méréseimhez egy Dionex típusú készüléket használtam, melynek az elvi felépítése az 1.5. ábrán látható. A továbbiakban a készülék egyes részeit részletesebben is bemutatom.



1.5. ábra. Dionex típusú nagyhatékonyságú ionkromatográf felépítése [28].

Eluensgenerátor

Az eluensgenerátorral működtetett rendszer esetében az eluenstartóban csak víz található és a pontos koncentrációjú eluent a készülék állítja elő. Az eluensgenerátor [28] töményen tartalmazza az adott mozgófázist (például: kálium-hidroxid, metánszulfonsav) és egy kettős elektrolízises ioncserélő membránrendszer segítségével állítja elő a kellő koncentrációjú eluent. A rendszer nagy előnyei közé tartozik, hogy a mozgófázis koncentráció nagy pontossággal ismételtető, valamint egy pumparendszer elegendő gradiens program esetében is.

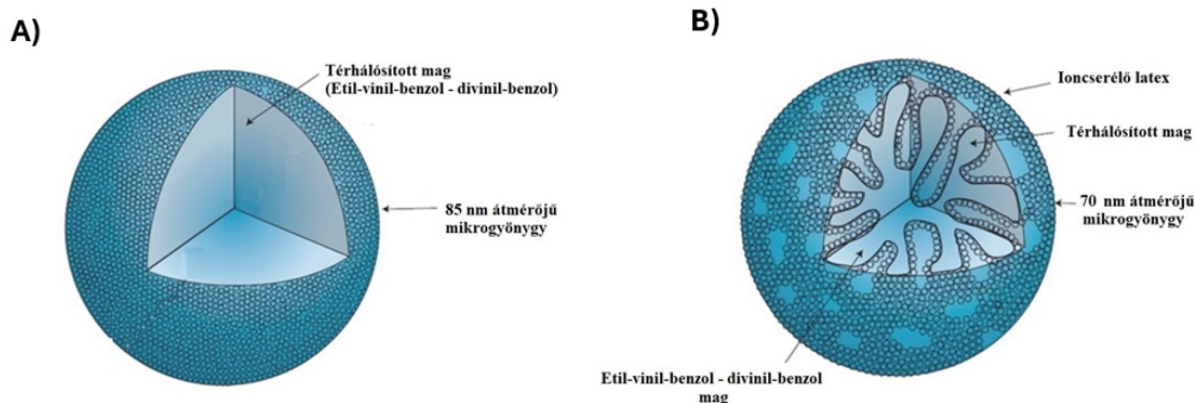
Állófázis

Több típusú állófázis alkalmazása lehetséges ionkromatográfia esetében, melyek lehetnek szerves (polimer, cellulóz, dextrán) vagy szervetlen alapúak (például: fém-oxidok, alumínium-szilikátok) [15]. Az állófázis ioncserélő tulajdonságai alapján beszélhetünk erős vagy gyenge ioncserélőkről. Erős ioncserélők esetében az ionizáltság foka a pH -tól független, míg gyenge ioncserélők esetében a pH -tól függően változik.

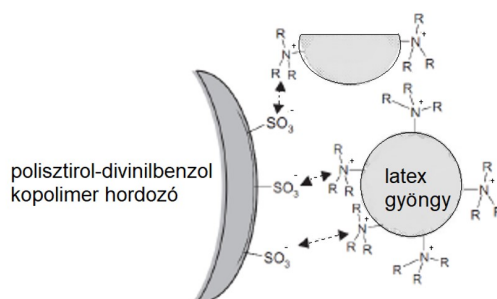
A legelterjedtebben használt kolonnák polimer alapú állófázisok, melyek egyik nagyon előnyös tulajdonsága a széles pH -tartományban való alkalmazhatóságuk. Ezek lehetnek polisztirol-divinil-benzol vagy metakrilát kopolimer alapú latex agglomerált állófázisok, melyeket elektrosztatikus erő tart össze [29]. Az 1.6. és 1.7. ábrák mutatják ezen típusú állófázisok felépítését.

Anioncserélő gyanta esetében az ioncserélő felület egy $5-25 \mu\text{m}$ átmérőjű, felületileg szulfonált stiroil-divinil-benzol kopolimerből és az erre felvitt, elektrosztatikusan kötött teljesen aminált pórusos anioncserélő gyöngyökből áll. Kationcserélők (erős) esetén a hordozó felülete aminált és szulfoncsoportok biztosítják az ioncseréhez szükséges negatív töltést [13].

Ezen típusú állófázisok ioncsere-kapacitása kicsi és a mozgófázis alkohol tartalmára rendkívül érzékenyek, mivel csökkenti az elektrosztatikus kölcsönhatás erősségét.



1.6. ábra. Elektrosztatikusan összetartott állófázis felépítései (A) nem porózus mag (pórusok mérete: $< 10 \text{ \AA}$), B) nagy porozitású mag (pórusok mérete: 2000 \AA).



1.7. ábra. Latex-agglomerált anioncserélő állófázis felépítése [30].

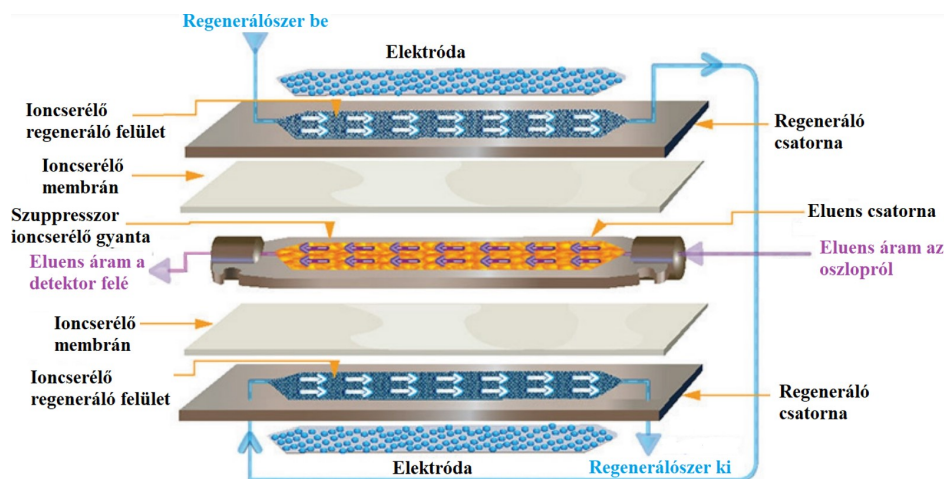
Szupresszor

A rendszer következő eleme ami az egykolonnás megoldások esetében nem része a konstrukciónak az az ionelnyomó egység, vagyis a szupresszor. Funkciója a mozgófázis vezetéseinek lecsökkentése, az elválasztásban résztvevő ellenionok hidroxil- vagy oxóniumionra cserélésével, melynek következményeképpen víz, valamint az analit ionjai savként vagy lúgként távoznak az ionelnyomóból, így az érzékenység növelhető.

A két leginkább elterjedt szupresszor megoldást az 1.2.1. fejezetben már érintettem, de a továbbiakban részletesebben is bemutatom. Az első egy, az analitikai oszloppal ellentétes töltésű ioncserélő gyanta alkalmazása. Ebben az esetben három szupresszor oszlopot kötnek be egymással párhuzamosan, és amikor kimerült az első, elforgatják a rendszert, úgy, hogy az áramlás a második oszlopra menjen, mialatt az első regenerálják. Ezen oszlopok az analitikaikkal ellentétben nagy kapacitású ioncserélők.

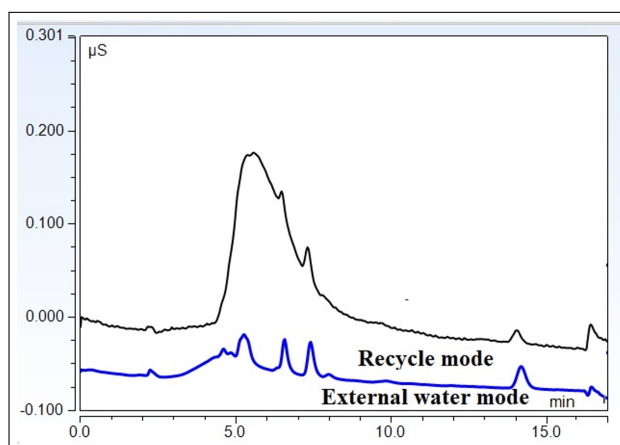
A másik elterjedt megoldás egy ioncserélő membrán alkalmazása, mely elektrokémiailag dinamikusan regenerálható [31] ennek felépítése látható az 1.8. ábrán [32]. Ilyen típusú rendszer esetében akár tiszta víz is lehet a regenerálószer.

Az 1.5. ábrán látható készülék felépítése alapján a szupresszor regenerálása többféleképpen



1.8. ábra. Elektrokémiai regenerálású szupresszor.
[32]

is lehetséges. Az egyik esetben recirkuláltatjuk a detektorból kilépő eluens áramát (mely tartalmazza a vizsgálandó komponenseket is) és ezzel a vizes rendszerrel regenerálunk (Recycle Mode). A másik esetben egy külön pumparendszerrel külső forrásból történik a regenerálás (External Water Mode). Ennek a külső regenerálásnak nagy előnye az, hogy a mintában lévő esetleges egyéb mátrix ionokat nem keringtetni a membránok között, így például a szerves oldószer hatása csökken és a tiszta vízzel történő regenerálás a membrán élettartamát is növeli. Az 1.9. ábrán recirkuláltatással és külső regenerálással működő szupresszorral ellátott készüléken felvett metanolt tartalmazó minták kromatogramjai láthatók. Megfigyelhető, hogy a metanol okozta alapvonal emelkedés kiküszöbölhető külső regenerálással.



1.9. ábra. Recirkuláltatott és külső regenerálású szupresszorral felvett kromatogramok metanol tartalmú mintáról.¹

¹Saját eredmény

A különböző gyártók által kínált szupresszorok mindegyike megfelelően alkalmazható az adott célra.

Detektorok

Az ionkromatográfias rendszerekhez számos detektor elérhető, melyek egymásutáni alkalmazása (soros kapcsolásuk révén) is lehetséges, így mindig célszerű az adott feladatnak megfelelő választani. A leggyakrabban alkalmazott detektor a vezetőképesség mérésen alapuló detektor, mely mind anionok, mind kationok mérésére egyaránt alkalmas. A második legelterjedtebb detektor az UV abszorbancián alapuló detektor, melynek előnye, hogy számos olyan ionizálható szerves vegyület analízise megoldható, mely elveszti töltését a szupresszállás során, de van olyan hullámhossz ahol megfelelő érzékenységgel detektálható. Ezen két detektálási módszeren kívül amperometriás, coulombmetriás vagy tömegspektrometriás megoldás is lehetséges [33].

1.2.2. Ionkromatográfiával meghatározható komponensek

Az előzőekben bemutatott ionkromatográfias rendszer tehát egy olyan folyadékkromatográfias rendszer, mely segítségével ionos vagy ionizálható komponensek vizsgálatát lehet végrehajtani [2]. Természetesen ezzel a technikával megoldható mind szervetlen, mind szerves ionok (szerves savak, bázisok, aminosavak, peptidok, szerves-fém komplexek [34], szénhidrátok [35]) elemzése is. Az ioncserés kölcsönhatást kihasználó ionkromatográfián kívül számos más retenciós mechanizmuson alapuló technika is található, úgy, mint ionkizárás, ionpár vagy ligandumcsere, melyek segítségével további vegyületek meghatározhatóak. A gyógyszeranalitikai alkalmazásokat tekintve az esetek döntő többségénél szerves ionok vizsgálata a cél [36]. A továbbiakban csoportosítva mutatom be gyógyszerhatóanyagok/készítmények ionkromatográfias vizsgálati lehetőségeit.

Gyógyszerkészítmények hatóanyag vizsgálatai

Gyógyszerhatóanyagok illetve készítmények vizsgálata esetében lehetőség van az ionkromatográfia alkalmazására a gyógyszerhatóanyagok tartalmának meghatározásánál. Kereskedelmi forgalomban található olyan gyógyszerkészítmény is, mely hatóanyaga egyszerű szervetlen só, mint például kálium-klorid [37]. Ilyen esetben természetesen mind a kálium, mind a klorid mennyisége meghatározható ionkromatográfia segítségével egy egyszerű vizes oldással. További hatóanyagvizsgálatra példa a különböző antibiotikumok mennyiségének mérése anioncserés ionkromatográfiával, ebben az esetben pulzáló amperometriás detektálást alkalmaznak [38–41]. Szintén amperometriás detektálással és ioncserével meghatározhatóak mono-, di-, és lineáris poliszacharidok is [42]. A gyógyszerhatóanyagok közül további hatóanyagok

mennyisége is mérhető, úgy, mint a betanekol, karbakol, kolin, glükózamin, heparin, bifoszfónát [36,43–46]. Hatóanyagok kioldódás vizsgálata is megoldható, vagyis az adott készítményből történő hatóanyag felszabadulásának vizsgálata a megadott körülmények beállításával.

Ellenionok meghatározása

A gyógyszerkészítményekben található hatóanyagok nagy része valamilyen só formában van jelen. Ilyen esetekben fontos információ lehet az ellenion tartalmának meghatározása a sztöchiometrikus mennyiségek igazolása szempontjából [47–49].

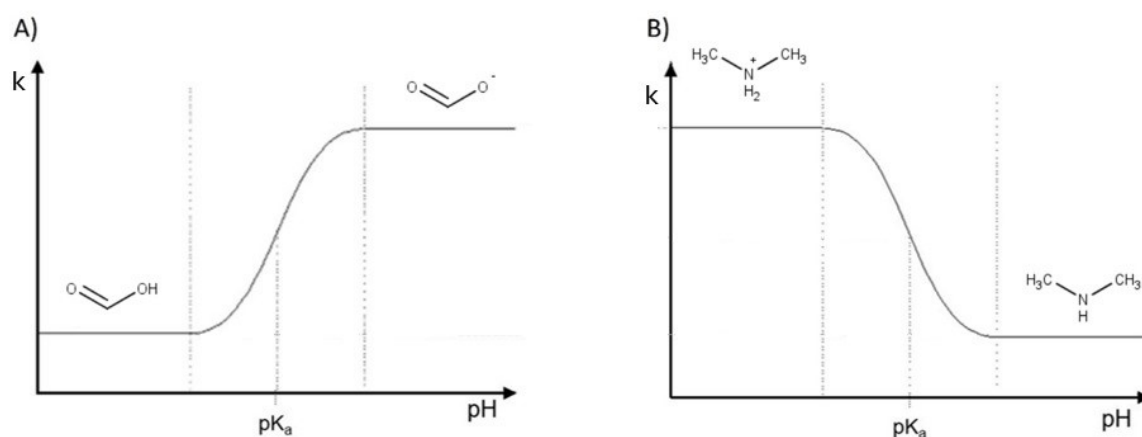
Gyógyszerkönyvi víz vizsgálata

A gyógyszergyártás során fontos lehet a szintézishez használt anyagok tisztaságának vizsgálata és igazolása annak érdekében, hogy használható legyen az adott hatóanyag, készítmény előállításához. Ebből kifolyólag a gyógyszerkönyvi minőségű víz minősítése is szükséges lehet [50].

Gyógyszerhatóanyagokban/készítményekben található szennyezők vizsgálata

Az ioncsere-kromatográfianak jelentősége van kis molekulatömegű, poláros, ionizálható vegyületek vagy ionok meghatározása esetén, melyek szennyezőként fordulhatnak elő a gyógyszerhatóanyagok mellett. Ezen vegyületek keletkezhetnek az előállítás során melléktermékként, vagy valamelyik lépésben feleslegben maradhatnak a reakció után. Ilyen szennyezők lehetnek a savas vagy bázikus funkciós csoportot tartalmazó szerves vegyületek, melyek vizsgálata ion-visszaszorított formájukban lehetséges gázkromatográfias vagy fordított fázisú folyadékkromatográfias (RP-LC) módszer segítségével. Tehát meghatározásuk sikere a vegyület pK_a értékétől függően a pH helyes megválasztásával, beállításával lehetséges. Gázkromatográfias vizsgálat során a túl alacsony vagy magas pH a készülék élettartamát csökkentheti. Az ion-visszaszorított vizsgálatához a tesztelt hatóanyag/készítmény pH -ját is figyelembe kell venni, hiszen ez befolyásolhatja a visszanyerés mértékét (például: aminok vizsgálata savas hatóanyagban). A probléma megoldása GC, ill. RP-LC esetében nehézkes mintaelőkészítést, hosszabb vizsgálati módszert eredményezhet. Ionkromatográfia esetében az ionizációhoz szükséges pH adott az eluens által, mely lúgos vagy savas tartományban van. Ionkromatográfia esetében a pH és a retenciós tényező közötti kapcsolat ellentétes irányú a fordított fázisú folyadékkromatográfiahoz képest. Az 1.10. ábra A) része vonatkozik a savas jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületekre, míg a B) a bázikus jellegű csoportot tartalmazó szerves vegyületek esetét mutatja. Mindkét diagramon (szerves anionok, kationok) látható, hogy hogyan változik a retenciós tényező a pH változásával. Mindez leképezi az ionizáltsági állapotokat is.

Megjegyzésként hozzáfűzendő, hogy gyenge, hidrofil szerves savak esetén, ahol a pK_a érték kisebb, mint 5, valamint gyenge aminok esetén, ahol a pK_a érték nagyobb, mint 9, biz-



1.10. ábra. k - pH összefüggés savas (A) vagy bázikus (B) jellegű csoportot tartalmazó szerves vegyületek esetében.

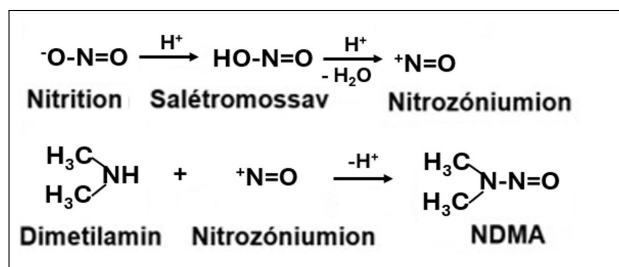
tónsággal alkalmazható a vezetőképességi detektálás a szupresszált rendszerben, ám ha ezen feltételek nem állnak fenn, más detektálási módot kell választani, hiszen a szupresszálas után a vizsgálandó molekula nem rendelkezik a detektáláshoz szükséges ionizáltsággal. Olyan esetben, amikor a vegyület tartalmaz valamilyen kromofór csoportot, az UV detektálás megfelelő megoldást jelenthet (meghatározott hullámhosszon). Ezért érdemes legalább ezen két detektor alkalmazása, akár sorbakötve is, melyek segítségével komplexebb, több információt eredményező kromatogramokat kaphatunk a vizsgált hatóanyagról/készítményről.

Gyógyszeranalitika szempontjából a szerves hidrofíl savak és bázisok mellett olyan esetekben is jelentősége van az ioncsere-kromatográfiának, amikor hidrolízis segítségével ionkromatográfián vizsgálható származékot képzünk. Számtalan olyan genotoxikus és/vagy rákkeltő vegyület meghatározása lehetséges így, melynek meghatározása csak valamilyen nagyműszeres technikával lenne megoldható.

Hatóanyagok/készítmények lehetséges szennyező anyagainak meghatározásait két csoportra osztottam: direkt és indirekt vizsgálatokra. A továbbiakban gyakorlati példákon keresztül mutatom be a vizsgálható vegyületeket (szennyező) kategóriánként besorolva. A direkt vizsgálatok esetében közvetlenül mérhető az adott komponens. Indirekt vizsgálati módszereknél származékképzést végzünk, így olyan vegyületek vizsgálata is lehetővé válik, melyek valamilyen ismert, leírt, bizonyított reakció segítségével átalakíthatóak anion(ok)ra, kation(ok)ra. A hidrolízis segítségével mind anionok, mind kationok keletkezhetnek, melyek a továbbiakban egyszerűen mérhetőek ioncsere-kromatográfia segítségével [51].

Szervetlen szennyezők közvetlen vizsgálata

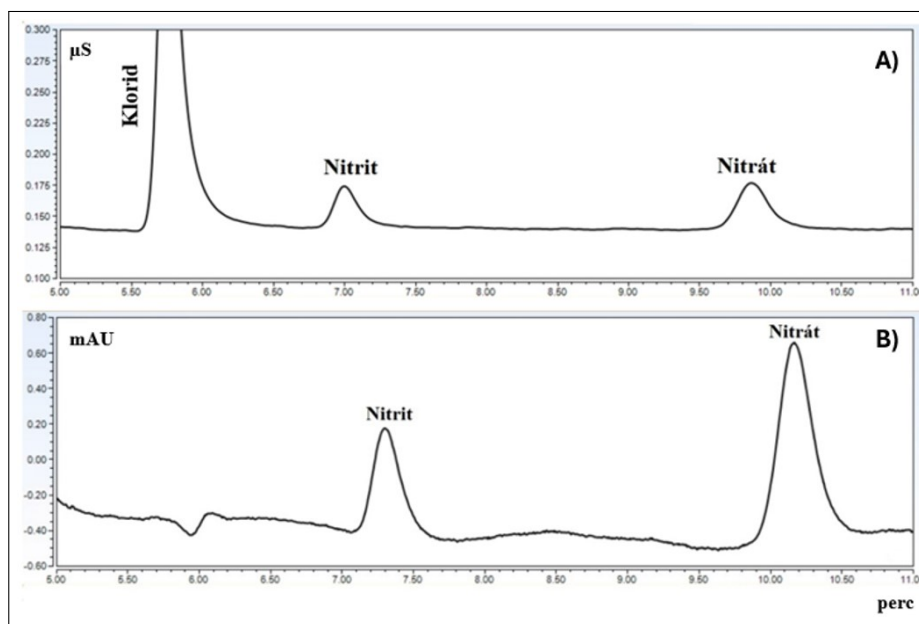
Szennyezők közvetlen vizsgálata esetében a szervetlen ionok meghatározása elengedhetetlen, melyek egyaránt lehetnek anionok és kationok is (klorid, nitrit, nitrát, nátrium, kálium, kalcium, stb.) [52–55]. A szervetlen ionok tekintetében a 2018-as valsartan-nitrózamin havária után reflektorfénybe került a nitrition, melynek oka, hogy a nitrózaminok keletkezéséhez szükséges amin forrás (szekunder amin, terciér amin, ciánamid, guanidin, amidin, hidroxilamin, hidrazin, hidrazon, hidrazid stb.) mellett egy nitrózó ágensnek (pld.: salétromossav, nitrit savas körülmények között, nitrozil-klorid, nitrogén-oxid, nitrozónium-tetrafluoroborát, nitrogén-monoxid stb.) is jelen kell lennie. Az előállítás során a gyógyszerhatóanyagok mellett található segédanyagokban, vagy a gyártás során alkalmazott technológiai vízben lévő nitrit (nitrózó ágens) jelenléte mellett is keletkezhet nitrózamin (1.11. ábra) akár már a hatóanyagban, de a készítmény előállítása során is. Sok esetben maga a vizsgált hatóanyag is egy amin forrás, így a nitrition mennyiségét szabályozni szükséges, főként, ha a hatóanyag savas pH-ja az egész folyamatot katalizálhatja. Ilyen esetekben a nitrition vizsgálata (megelőzősképpen) szinte elengedhetetlen – a mostani szabályozások mellett – a különböző hatóanyagokban [56], készítményekben, segédanyagokban [57] és/vagy a gyártáshoz, formulázáshoz alkalmazott technológiai vízben. Az elmúlt években számtalan megoldás született nitrition vizsgálatára, melyek között találhatunk tömegspektrométerrel csatolt ionkromatográfias módszert is [58].



1.11. ábra. N-nitrozó-dimetilamin keletkezésének mechanizmusa.

A szervetlen ionok detektálása leggyakrabban vezetőképességi detektorral történik, ám vannak olyan ionok, melyeknek adott (jellemzően alacsony) UV hullámhosszon van elnyelése, így detektálhatóak UV detektorral is. A nitrit- és nitrátionok megfelelnek ezen kitételnek, így mérésük 210 nm-en szelektíven megvalósítható a többi zavaró (pld.: klorid) szervetlen ion mellett. Az 1.12. ábrán vizes oldatban 0,02 mg/L-es koncentrációban található nitrit-, nitrátion kromatogramja látható.

Az ábrán bemutatott kromatogramokon retenció csúszás látható a két detektort összehasonlítva. Ez a jelenség csupán abból adódik, hogy a két detektor egymás után, sorbakötve található a rendszerben. Tapasztalataim alapján a két detektor érzékenysége között nincs jelentős különbség a nitrit- és nitrátionok vizsgálata tekintetében.



1.12. ábra. Nitrit-, nitrátion meghatározása (A) vezetőképességmérő detektálással (B) UV detektálással. ¹

Az anionvizsgálatok mellett fontos szerepe lehet a szerves kationok mennyiségi meghatározásának is. Nyomnyi alkáli- (nátrium, kálium) és alkaliföldfémek (magnézium, kalcium) pontos meghatározására is szükség lehet gyógyszerhatóanyagok/készítmények minőségellenőrzése során, valamint a gyártási tételek eltéréseinek kezelése, követése céljából indított hibakivizsgálások gyökérok keresésénél is hasznos segítséget adhat.

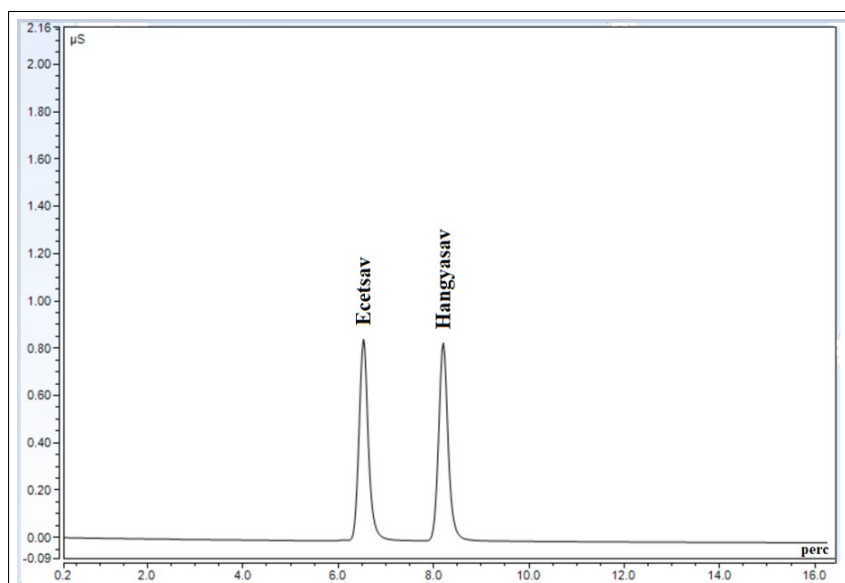
Szerves szennyezők közvetlen vizsgálata

A különböző hatóanyagok előállításához számos savas, illetve bázikus vegyületet használhatnak, melyek ionkromatográfiai vizsgálata megoldható, ha adott *pH*-n ionizálhatóak. Anionos elemzések esetében a karbonsavak (R-COOH, ahol R: hidrogén, alkil-, alkén-, arilcsoport is lehet) vizsgálata jelentős. Kutatási éveim során tapasztaltak alapján a két leggyakrabban vizsgált tagja ennek a nagy csoportnak az ecetsav és a hangyasav.

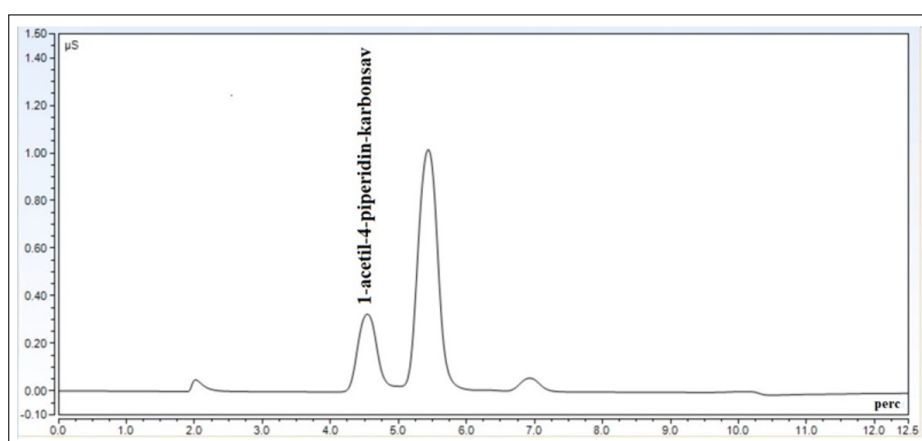
Az 1.13. ábrán látható acetát és formiát csúcsok jel/zaj aránya (S/N) ~1500. Egyértelműen látható, hogy milyen érzékenyen mérhető mindkét ion HPIEC rendszerrel.

A karbonsavak közül vizes oldatból a laktát, maleát, fumarát, oxalát, szukcinát, benzoát egyszerűen meghatározhatóak, de természetesen ezeken kívül számos más anion is, mint például 1-acetil-4-piperidin-karbonsav (1.14. ábra) vagy a ciánecetsav [59] anionja. A gyógyszerhatóanyagok vizsgálata során szintén fontos vizsgálat lehet a citrát meghatározása is [60].

¹Saját eredmény



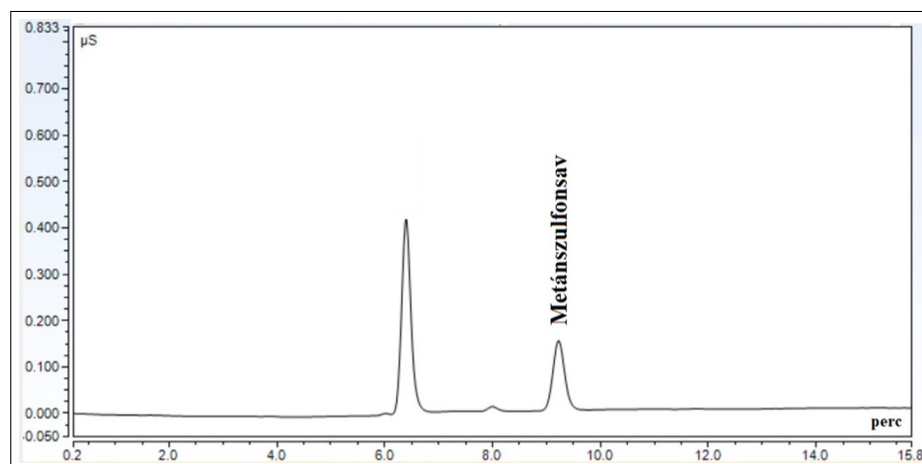
1.13. ábra. Ecetsav ($c= 2,5$ mg/L) és hangyasav ($c= 2,5$ mg/L) kromatogramja. ¹



1.14. ábra. 1-acetil-4-piperidin-karbonsav ($c= 6,3$ mg/L) kromatogramja. ¹

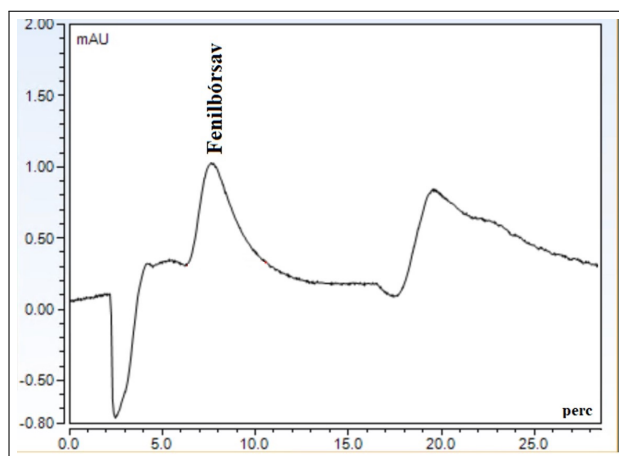
A karbonsavakon kívül természetesen az ioncsere-kromatográfias rendszerrel mérhetőek szulfonsavak (pld.: metánszulfonsav [61] (1.15.ábra), benzolszulfonsav) és nátrium-lauril-szulfát [62] is.

¹Saját eredmény



1.15. ábra. Metánszulfonsav (c=1,0 mg/L) kromatogramja.¹

Az UV detektálás szerves anionok esetében is alkalmazható. Jelentős szerepet játszik olyan esetekben, amikor a vizsgálandó vegyület ionizációjához szükséges pH a szupresszorban már nem áll fent, de van UV elnyelése. Ilyen vegyületre példa a fenil-bórsav ($\lambda = 265$ nm), mely folyadékkromatográfias készüléssel kapcsolt tömegspektrométerrel nagyon pontosan meghatározható [63], ám abban az esetben, ha nem áll rendelkezésre ilyen lehetőség, 45 mg/L-es ($S/N \sim 50$) koncentrációban (1.16. ábra) megoldható a vizsgálata ionkromatográfia segítségével. Ez a koncentráció tovább csökkenthető a körülmények megfelelő változtatásával. A kapott csúcs teljesítményjellemző paramétereinek tekintetében nem a legkedvezőbbek az eredmények, ám robusztusan és ismételhetően mérhető ezen tulajdonságai ellenére is.

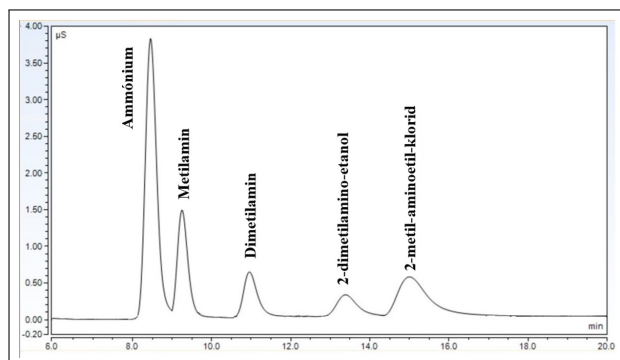


1.16. ábra. Fenilbórsav kromatogramja.¹

Az azidion meghatározása gyógyszerkönyv szerint is ioncserélő állófázison kellene, hogy történjen. Ezen szennyező vizsgálata rutin vizsgálat tárgya lehet bármely olyan készítmény esetében, ahol a szintézis úton alkalmazzák tetrazol-gyűrű kialakításához.

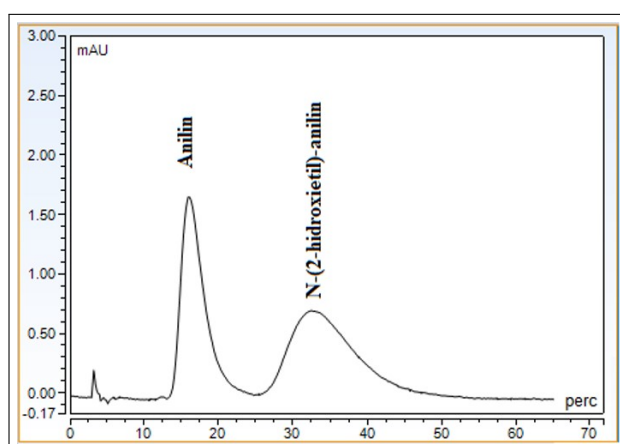
¹Saját eredmény

A szerves kationokat tekintve az aminok a leginkább vizsgált ionok, melyek lehetnek primer, szekunder vagy tercier aminok is. Aminok meghatározása a nitrózaminok keletkezése miatt is szükséges lehet (1.11. ábra). Ioncsere-kromatográfia segítségével érzékenyen és szelektíven mérhetők a különböző aminok, úgy, mint a metilamin, dimetilamin, etilamin, dietilamin, etanolamin, dietanolamin, dietilaminoetanol, piperidin, hidrazin stb. [64–68]. Az 1.17. ábrán öt különböző amin elválasztása látható.



1.17. ábra. Ammónium ($c= 3,0$ mg/L, $S/N \sim 7600$), metilamin ($c= 1,4$ mg/L, $S/N \sim 2900$), dimetilamin ($c= 1,2$ mg/L, $S/N \sim 1200$), 2-dimetilamino-etanol ($c= 1,9$ mg/L, $S/N \sim 600$) és 2-metil-aminoetil-klorid ($c= 3,8$ mg/L, $S/N \sim 730$) kromatogramja.¹

Gyűrűs aminok mérésére példa az imidazol vagy N-metil-pirrolidin [65] analitikai vizsgálata. Sok esetben az egyszerű ammóniumion mérése is releváns lehet. Szerves kationok esetében is igaz, hogy, ha az adott vegyület pK_a értékéből eredően 7-es pH-n nem ionos, viszont rendelkezik kromofór csoporttal, UV detektorral vizsgálható. Ilyen vegyületre példa az anilin és a N-(2-hidroxietil)-anilin, melyek 240 nm-es detektálási hullámhosszon érzékenyen vizsgálhatóak (1.18. ábra).



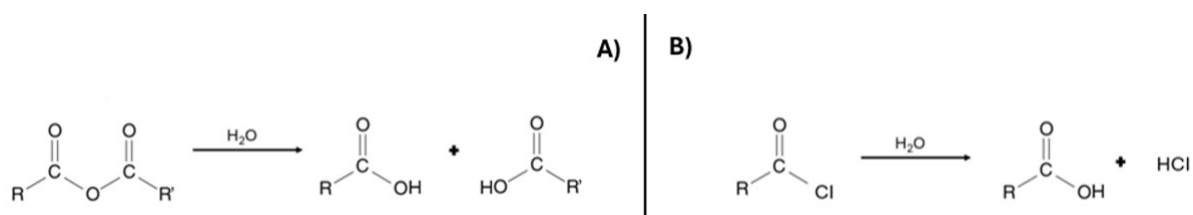
1.18. ábra. Anilin ($c=1,5$ mg/L, $S/N \sim 55$) és a N-(2-hidroxietil)-anilin ($c= 1,0$ mg/l, $S/N \sim 23$) kromatogramja.¹

¹Saját eredmény

Szerves szennyezők közvetett vizsgálata vizes hidrolízis segítségével

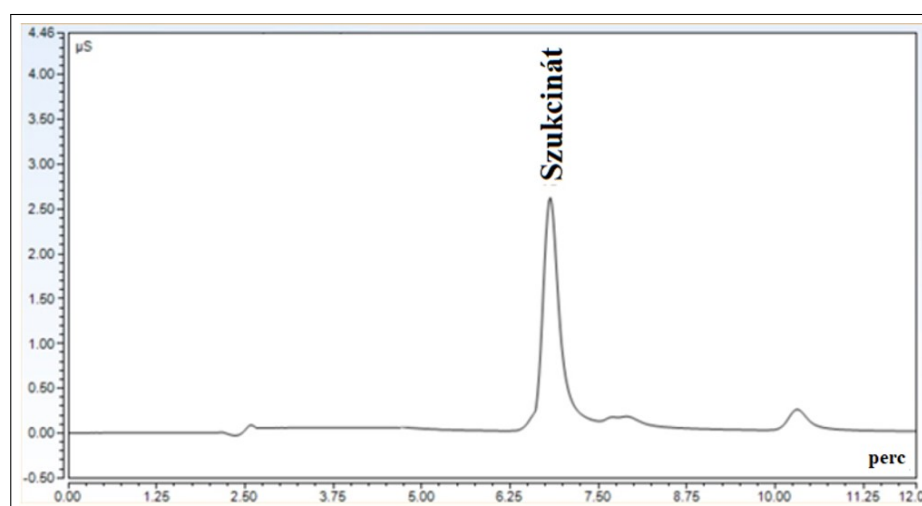
Vízzel történő hidrolízis segítségével vizsgálható vegyületek közé tartoznak a sav-halogenidok: acetil-klorid, metánszulfonsav-klorid, sav-anhidridek: ecetsav-anhidrid, borostyánkősav-anhidrid, valamint egyéb számos vegyület, mint például N,N'-karbonil-diimidazol (CDI) vagy hexafluorfoszfát sók [69].

Az acetyl-klorid és az ecetsav-anhidrid a két leggyakrabban alkalmazott acilezőszer [70] a szintézisek során, így vizsgálatuk elengedhetetlen a gyártott hatóanyagokban.



1.19. ábra. Sav-anhidridek (A) és sav-klorid hidrolízise (B).

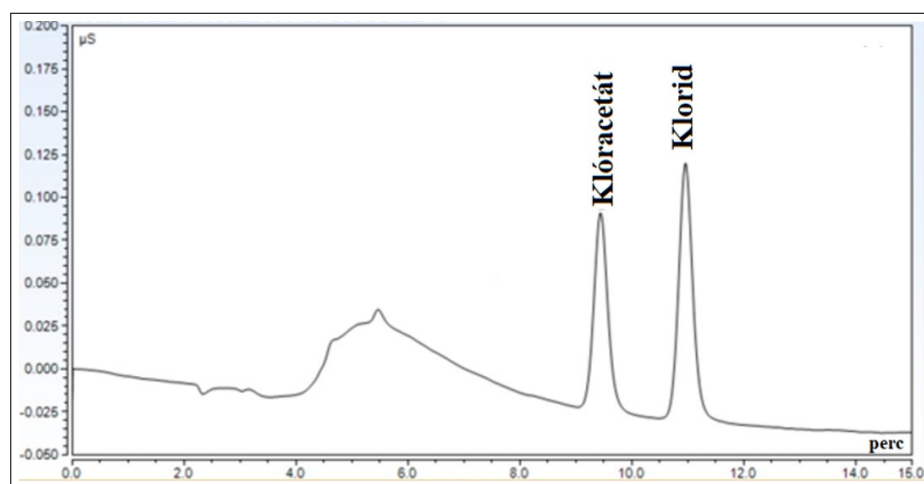
Anhidridek esetében az 1.19. ábra (A) alapján leírt mechanizmus szerint, víz hozzáadásával sav keletkezik, mely a továbbiakban érzékenyen mérhető. A sav-anhidridek családjából az ecetsav-anhidrid a "legnépszerűbb" tag, mely esetében természetesen a disszociált ecetsav forma, az acetátion lesz az ioncsere elemzés cél-ionja. Az 1.20. ábrán a borostyánkősav-anhidrid vizsgálata látható, ahol az ioncsere analízis során a szukcinát detektálása történik. A bemérésre kerülő borostyánkősav-anhidrid koncentrációja 15 mg/L, a hidrolízis után kapott szukcinát csúcsra kapott jel/zaj arány: ~ 168 .



1.20. ábra. Borostyánkősav-anhidrid kromatogramja a hidrolízis után.¹

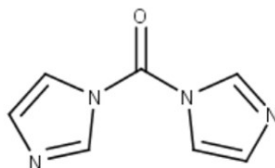
¹Saját eredmény

A sav-halogenidek közül az acetyl-klorid a legtöbbet vizsgált vegyület, mely esetében az ecetsav-anhidridhez hasonlóan acetátot tudunk detektálni, ám ráadásként megjelenik a kloridion csúcsa is (1.19. ábra (B)), így akár lehetőség van a kloridionon keresztül is meghatározni az adott sav-klorid mennyiségét. Bizonyos sav-kloridok akár a levegő nedvességtartalmával is hidrolizálhatnak, így más kromatográfias technikával történő vizsgálatuk nehézkessé válhat. Az 1.21. ábrán a klóracetyl-klorid hidrolízise után kapott klór-acetát és kloridion kromatogramja látható. A bemért klóracetyl-klorid koncentrációja 1,0 mg/L volt, a hidrolízis után a keletkező sav csúcs jel/zaj aránya közel 114.



1.21. ábra. Klóracetyl-klorid kromatogramja a hidrolízis után.¹

Kationos vizes hidrolízisre példa a CDI vizes bomlása. A folyamat során a CDI vegyület két imidazolra és szén-dioxidra hasad, a keletkező imidazol pedig kationcserélő oszlopon, vezetőképességmérő detektorral mérhető.



1.22. ábra. N,N'-karbonil-diimidazol (CDI) szerkezeti képlete.

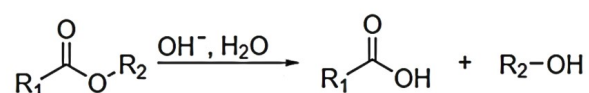
Szerves szennyezők közvetett vizsgálata sav/bázis katalizálta hidrolízis segítségével

Észterek, nitrilek, és minden olyan vegyület vizsgálható ioncserekromatográfia segítségével, melyből sav vagy lúg katalitikus hatására valamilyen mérhető ion keletkezik.

¹Saját eredmény

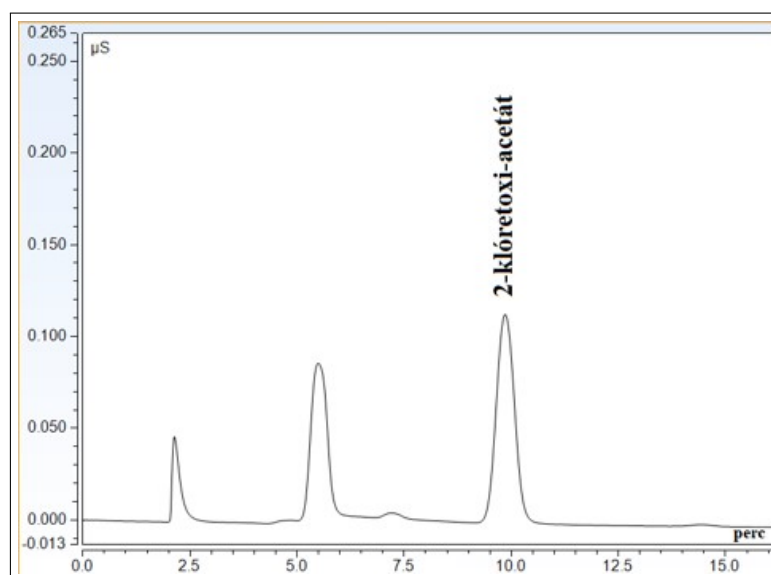
Észterek esetében a lúgos hidrolízis (elszappanosítás) során az adott észterből keletkező sav sója keletkezik [71] (1.23. ábra), mely vizes közegben ionos állapotban található, így ioncsere-kromatográfiával meghatározható. Anionok esetében a savas hidrolízis alkalmazása kevésbé előnyös, hiszen az addicionált nagy mennyiségű sav anionja miatti koelúció lehetősége áll fenn, ezzel szemben a lúgos hidrolízis esetében a magas pH nem jelent problémát. A magas pH -n történő hidrolízis sebességét növeli az emelt hőmérséklet ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$), ám a reakció végbe menetele során figyelembe kell venni a vizsgált minta (hatóanyag, kiindulási anyag, termék) pH -ját, mert az erősen savas mátrix csökkenti a reakció hatásfokát.

Észterek meghatározása megoldható gázkromatográfias direkt vizsgálattal is, de származékképzéssel is az 1.23. ábrán látható reakció alapján, mely eredményeképpen a keletkező alkohol detektálható. Ám bizonyos esetekben ez nem kivitelezhető (pl. nem elég érzékeny a gázkromatográfias módszer, nincs értékelhető visszanyerés, vagy van a mintában az adott alkoholból), így szükség lehet az észterből keletkező sav vizsgálatára.



1.23. ábra. Észterek lúgos hidrolízise.

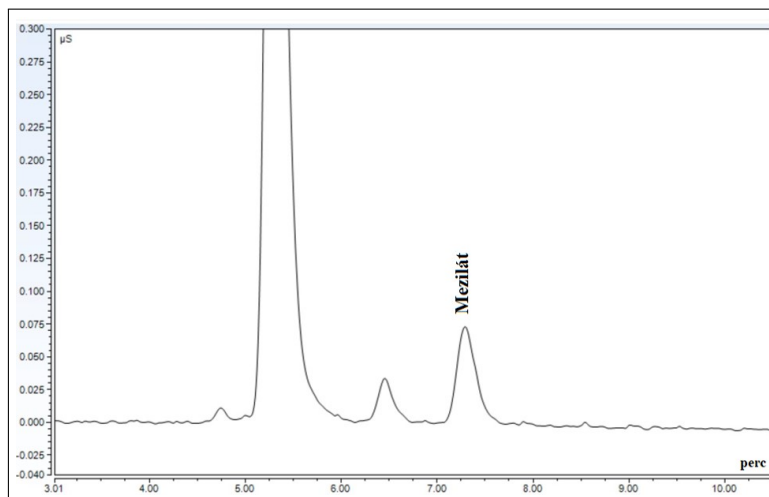
Az 1.24. ábrán látható etil-2-(2-klóretoxi)-acetát hidrolízise (szobahőmérséklet, $\sim 40\text{ mM}$ KOH oldat, 60 perc reakcióidő) során keletkező 2-klóretoxi-acetát csúcsa érzékenyen ($S/N \sim 220$) detektálható.



1.24. ábra. Etil-2-(2-klóretoxi)-acetát ($c=3\text{ mg/L}$) kromatogramja a hidrolízis után.¹

¹Saját eredmény

Az etil-mezilát más néven etil-metánszulfonát jól hidrolizálható 50 mM KOH oldattal 80 °C-on 45 percig. A reakció terméke a mezilát (1.25. ábra), mely szintén nagy érzékenységgel mérhető ioncsere-kromatográfiával.

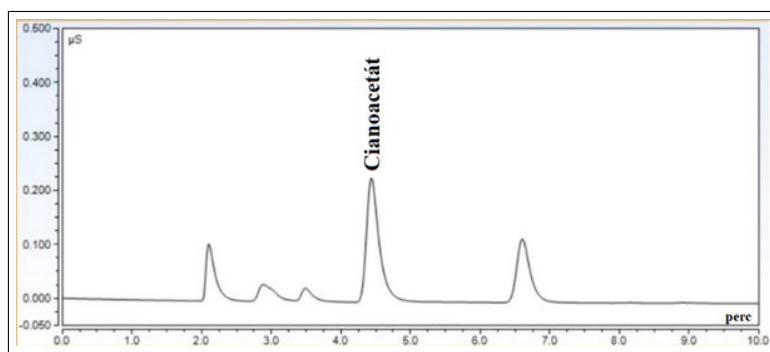


1.25. ábra. Etil-mezilát ($c=0,5$ mg/L, mezilát csúcs $S/N \sim 40$) kromatogramja a hidrolízis után.¹

A nitrilek esetében is elmondható, hogy a lúgos hidrolízis gyorsabb eredményt ad, mint a savkatalizált megoldás, valamint a körülmények helyes megválasztásával (hőmérséklet, lúg koncentráció, ultrahangos fürdő használata) csökkenthető a reakció ideje [72].

Nitrilek hidrolízisére szemléletes példa a malonitril ($N\equiv C-CH_2-C\equiv N$) meghatározása. A malonitril meghatározása elsődlegesen gázkromatográfias feladat. Az Amerikai Környezetvédelmi Hivatal (EPA) 8260 C módszere [73] is tartalmazza. Azonban ez a vegyület mind sav, mind lúg hatására bomlik, így savas, vagy lúgos mátrix melletti meghatározása a fenti módszerrel csak valamilyen célzott származékképzési reakcióval és tömegspektrometriás vizsgálattal lenne lehetséges. Maga a mátrix hatása megnyilvánulhat egy lúgos szennyezés hatásaként, vagy magának a vizsgált gyógyszerhatóanyagnak a pH-jából eredően is. Emelt hőmérsékleten végzett lúgos hidrolízissel a keletkező savat meghatározhatjuk az ioncsere-kromatográfia segítségével. A vegyület két nitrilcsoporttal rendelkezik, de csak az egyik nitrilcsoport leválása oldható meg viszonylag enyhébb körülmények között (60 °C, < 100 mM KOH) és rövidebb idő alatt, a második nitrilcsoport leszakítása kinetikai gátoltsága miatt több időt és erőteljesebb körülményeket kíván meg. A reakció megállítható az első lépésnél és kellően robusztusan ismételtető a meglévő mátrix mellett. A 2,5 mg/L koncentrációjú malonitril hidrolízise után kapott kromatogramon (1.26. ábra) látható cianoacetát csúcs jel/zaj aránya 240.

¹Saját eredmény



1.26. ábra. Malonitril kromatogramja a hidrolízis után.¹

Természetesen a különböző észterek és nitrilek eltérően viselkedhetnek, tehát nem ugyanazoknak a feltételeknek kell teljesülniük a megfelelő eredmény eléréséhez. Például a metilmezilát hidrolízise jóval nehezebben oldható meg, mint az etilcsoporttal rendelkező társáé.

A hidrolízis nemcsak a fent említett vegyületek esetében lehet egy jó megoldás, hanem számos egyéb komponensre, mely víz, vagy erős lúg hatására savat, vagy valamilyen amint képez.

¹Saját eredmény

2. Eszközök, anyagok

Alábbiakban a doktori munkám során alkalmazott mérési körülményeket, eszközöket, anyagokat ismertetem.

2.1. Berendezés, anyagok, oszlopok

2.1.1. Berendezés, anyagok

A méréseim során alkalmazott ionkromatográfiás készülék egy Dionex ICS 5000-es típusú ionkromatográf (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Ez a berendezés két csatornás, tehát mind anionok, mind kationok mérésére egyaránt alkalmas, akár még szimultán is. Az ionkromatográfiás rendszer eluensgenerátorral rendelkezik, anionos ágon kálium-hidroxid (KOH cartridge), míg a kationos ágon metánszulfonsav (MSA cartridge) eluenssel. Mindkét ágon található egy-egy vezetőképességmérő detektor. A rendszerben az adott ág vezetőképességmérő detektora után sorbakötve egy UV detektor is található. Az ionkromatográf egységei termosztálhatóak, működésének elvét az 1.2.1. szakasz mutatja be. Az injektáláshoz az anionos ágon 10 μL -es és 100 μL -es, míg a kationos ágon 100 μL -es mintabeviteli hurokot használtam.

A szupresszor egy dinamikus elektrokémiai regenerálású membráncella, melynek működtetését az adott feladatnak megfelelően recirkuláltatva vagy külső regenerálással végeztem. A külső regenerálást a kationos ág pumparendszerével oldottam meg nagy tisztaságú vízzel.

A mérésekhez, valamint az eluensekhez használt nagy tisztaságú vizet (18,2 M Ωcm) az Elga PureLab Option víztisztító rendszer szolgáltatta. A vizsgálataimhoz alkalmazott vegyszerek mindegyike analitikai tisztaságú volt és a 2.1. táblázatban láthatóak.

A készülék vezérlését, az adatok rögzítését, valamint a kromatogramok kiértékelését az alábbi szoftverrel végeztem: Chromeleon 7. Dionex Version 7.1.3.2425 (Thermo Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok). A gázkromatográfiás méréseket Perkin-Elmer Autosystem gázkromatográfon és Perkin-Elmer HS-40 automata (PerkinElmer, Inc., Waltham, Egyesült Államok) gőztér mintadagolóval és lángionizációs (FID) detektorral hajtottam végre.

2.1. táblázat. Vizsgálatokhoz alkalmazott vegyszerek.

Vegyszer	Gyártó
acetonitril	Merck KGaA, Darmstadt, Németország
ammónium-acetát	Supelco by Sigma-Aldrich, St. Louis, Egyesült Államok
ammónium-formiát	Supelco by Sigma-Aldrich, St. Louis, Egyesült Államok
ammónium-hidroxid oldat (25%)	Merck KGaA, Darmstadt, Németország
ammónium-karbonát	Sigma-Aldrich,, Darmstadt, Németország
ammónium-klorid	Sigma-Aldrich,, Darmstadt, Németország
cilostazol	Egis Gyógyszergyár Zrt.
dimetil-szulfoxid	Fisher Scientific, Loughborough, Egyesült Királyság
diklórmétán	Fisher Scientific, Loughborough, Egyesült Királyság
ecetsav	MOLAR Chemicals Kft., Halásztelek, Magyarország
etil-acetát	Fisher Scientific, Loughborough, Egyesült Királyság
favipiravir	Egis Gyógyszergyár Zrt.
85%-os foszforsav	MOLAR Chemicals Kft., Halásztelek, Magyarország
kálium-bromid	Fisher Scientific, Loughborough, Egyesült Királyság
kálium-hidroxid	Sigma-Aldrich,, Darmstadt, Németország
kálium-klorid	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Németország
kloroform	Lach:ner, Neratovice, Cseh Köztársaság
lítium-klorid	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Németország
metánszulfonsav	Sigma-Aldrich,, Darmstadt, Németország
nátrium-azid	Sigma-Aldrich,, Darmstadt, Németország
nátrium-hidroxid	Fisher Scientific, Loughborough, Egyesült Királyság
nátrium-klorid	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Németország
nátrium-tioszulfát	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Németország
<i>N</i> -brómszukcinimid	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Németország
prasugrel	Egis Gyógyszergyár Zrt.
szukcinimid	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Németország
trisz	SigmaAldrich, Darmstadt, Németország

A vegyületek ionizáltsági vizsgálatához MarvinSketch 14.9.8.0 (Chemaxon, Budapest, Magyarország) szoftvert alkalmaztam.

A tömegbeméréseket Mettler Toledo félmikroanalitikai mérlegen (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland), míg a térfogatmérések Eppendorf típusú automata pipettákkal (Eppendorf SE, Hamburg, Germany) végeztem.

2.1.2. Oszlopok

Az elválasztások során Dionex (Thermo Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) kromatográfias oszlopokat alkalmaztam. Az anionos vizsgálatokhoz nagykapacitású AS11-HC oszlopot (2×250 mm, $d_p = 13 \mu\text{m}$) a hozzá megfelelő előtét oszloppal (AG11-HC, 2×50 mm, $d_p = 13 \mu\text{m}$), továbbá AS23 oszlopot (2×250 mm, $d_p = 13 \mu\text{m}$) a hozzá megfelelő előtét oszloppal (AG23, 2×50 mm, $d_p = 13 \mu\text{m}$) használtam. Mindkét típusú állófázis alkanol kvater-

ner ammónium csoportokkal funkcionált, latex agglomerált anioncserélő kolonna. A kationos vizsgálatokhoz CS16 (3×250 mm) analitikai oszlopot és a hozzá tartozó előtét kolonnát (3×50 mm) alkalmaztam. A kationcserélő állófázis ebben az esetben karboxil funkciós csoportot tartalmazó felület.

A gázkromatográfiás vizsgálatokhoz DB-FFAP (30 m / 0,32 mm / 0,25 μm) (nitrotereftál-sav-polietilénlikol) típusú állófázist használtam.

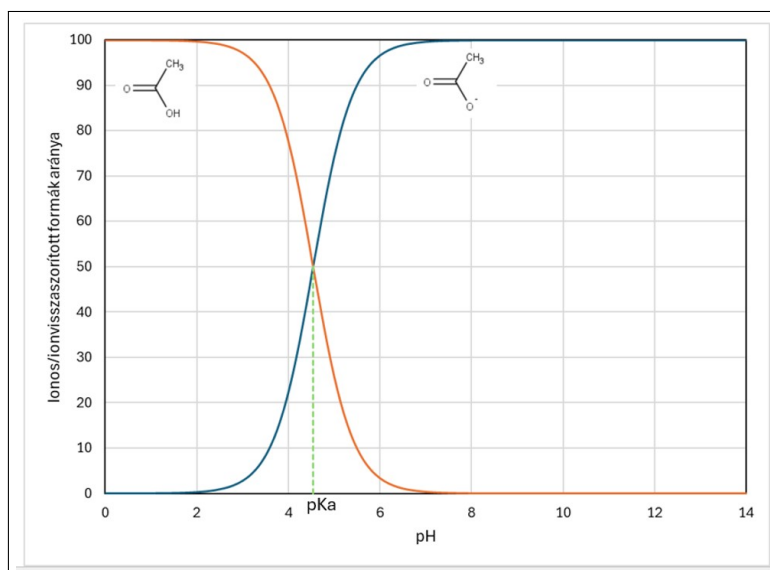
3. Eredmények

Dolgozatom további részeiben a kutatási éveim során elvégzett munkám eredményei kerülnek bemutatásra a hozzájuk kapcsolódó irodalommal.

3.1. Hatóanyagban található ecetsav analízisének gázkromatográfiás és ionkromatográfiás összehasonlítása

A hatóanyagok szintézise során számos esetben alkalmaznak ecetsavat oldószerként vagy reakcióelegyként, ezért ezen lehetséges szennyező maradékának meghatározása szükséges lehet a gyártott termékben. Az ecetsav a nemzetközi szabályozások (ICH Q3C(R9) guideline) meghatározása szerint a Class 3-as oldószerek közé sorolható, mely alapján alacsony toxicitású, így a maximális koncentráció mennyisége 5000 ppm. Az ecetsav alacsony forráspontú kis molekulatömegű vegyület, így mennyiségének meghatározása sokszor gázkromatográfiás elemzéssel történik. A közvetlen gázkromatográfiás mérési módszer esetében biztosítani kell, hogy a vizsgálat során az ecetsav a megfelelő formában legyen, így ennek érdekében alacsonyabb pH alkalmazása ajánlott, mint ahogy ez le is olvasható a 3.1. ábráról.

Az ecetsav származékképzés segítségével (pld.: észterképzés) is mérhető gázkromatográfiával, de mind a közvetlen, mind pedig a származékképzés segítségével történő meghatározás során adódhatnak problémák (pld.: tömény savak alkalmazása, a mintaoldat lúgos jellege vagy az egyéb szennyezők mátrixhatása). Az ionizáltsági nehézségek mellett további problémák is felmerülhetnek, mégpedig, hogy a gázkromatográfiás vizsgálat során a készülék aktív helyein megkötődhet az ecetsav (áthordás jelensége), mely megnehezítheti az ismételtetés és visszanyerés vizsgálatát. Szerves savak meghatározása a gázkromatográfiás megoldás mellett történhet ionkromatográfiás rendszerrel is. Ezen technika számos esetben kedvezőbb megoldást jelenthet (egyszerűbb mintaelőkészítés, alacsonyabb mintakonzentráció, stb.). Annak megállapítására, hogy a gáz-, vagy az ionkromatográfia alkalmazása előnyösebb ecetsav meghatározására, összehasonlítottam két általam fejlesztett módszert adott gyógyszerhatóanyagban található ecetsav szennyezés meghatározására, limit szintű validálásaik eredményein keresztül.



3.1. ábra. Ecetsav ionizáltsága a pH függvényében ($pK_a = 4,8$).

A gázkromatográfiás közvetlen vizsgálati módszer esetében foszforsavat alkalmaztam az oldat savas kémhatásának biztosításához. A módszer paraméterei a 3.1. táblázatban láthatóak. Az ionkromatográfiás rendszer esetében beállított paramétereket a 3.2. táblázat tartalmazza.

3.1. táblázat. Gázkromatográfiás módszer beállított paraméterei

Készülék:	Perkin-Elmer Autosystem gázkromatográf, Perkin-Elmer HS-40 automata gőztérmentadó
Kolonna:	DB-FFAP (30 m/ 0,32 mm/ 0,25 μ m)
Hőmérséklet program:	60 °C (1 perc) $\xrightarrow{20\text{ }^\circ\text{C}/\text{perc}}$ 240 °C (5 perc)
Injektor hőmérséklet:	200 °C
FID detektor hőmérséklet:	250 °C
Split arány:	5:1
Vivőgáz (Hélium) áramlási sebessége:	1,5 mL/perc
Termosztálás hőmérséklete, ideje:	80 °C, 30 perc
Tű hőmérséklete:	120 °C
Transzferline hőmérséklete:	140 °C
Ciklus idő:	min. 25 perc

3.2. táblázat. Ionkromatográfiás módszer beállított paraméterei

Készülék:	Automata mintaadagolóval felszerelt Dionex ICS 5000 ionkromatográf (eluensgenerátor, ionelnyomás (elektrokémiai), vezetőképességmérő detektor)
Előtét kolonna:	IonPac AG11-HC (2 mm x 50 mm)
Kolonna:	IonPac AS11-HC (2 mm x 250 mm)
Eluens koncentráció:	10 mM KOH
Futási idő:	30 perc
Injektált térfogat:	5 μ L
Eluens áramlási sebessége:	0,38 mL/perc
Mintaadagoló hőmérséklete:	18 °C
Kolonna hőmérséklete:	30 °C
Detektor hőmérséklete:	35 °C

3.1.1. Limit szintű validálások során kapott eredmények

A gázkromatográfiás és az ionkromatográfiás módszerek limit szintű validálása során kapott eredmények összehasonlítása látható a 3.3. táblázatban.

3.3. táblázat. Ecetsav szennyezés meghatározására fejlesztett gáz-, illetve ionkromatográfiás módszerek eredményeinek összehasonlítása.

	Gázkromatográfia	Ionkromatográfia	Követelmények
Visszatartási tényező (k)	1,9	1,1	1-10
Méterenkénti tányérszám (N)	11 000	7000	≥ 2000
Szimmetria faktor (A_s)	1,1	1,4	$\leq 2,0$
Referencia oldat koncentrációk (μ g/mL)	250	5	
Rendszerprecizitás (RSD%, n=6)	10,7%	2,4%	$\leq 20,0\%$
Ismételhetőség (RSD%, n=6)	6,2%	4,4%	$\leq 20,0\%$
Stabilitás referencia oldat (%)	109,8%	102,3%	85,0%–115,0%
Stabilitás addicionált minta (%)	96,7%	103,7%	85,0%–115,0%
DL (S/N = 3)	120 ppm (6 μ g/mL)	15 ppm (0,015 μ g/mL)	
QL (S/N = 10)	400 ppm (20 μ g/mL)	50 ppm (0,05 μ g/mL)	
Visszanyerés (%)	88,0%	97,5%	75,0%–125,0%
Elemzési idő egy minta esetében (perc)	430	300	
Minta koncentráció (mg/mL)	50	1	

Az elvégzett vizsgálataim eredménye alapján a módszerek teljesítményjellemező paramétereinek (visszatartási tényező, méterenkénti tányérszám, szimmetria faktor) összehasonlítása során a gázkromatográfiás tányérszám nagyobb eredményt adott, mint az ionkromatográfiás. Ez az eltérés a két technika közötti különbségekből erednek, hiszen a gázkromatográfia esetében nem kell számolnunk bizonyos zónaszélesítő hatásokkal (örvénydiffúzió, anyagátadással

szembeni ellenállás).

A precizitás vizsgálatok közül a rendszerprecizitás vizsgálata során az 5000 ppm-es koncentrációjú referencia oldatot injektálva (n=6) a kapott csúcsterületek szórása a gázkromatográfiás módszer esetében közel ötször kedvezőtlenebb értéket adott, mint az ionkromatográfiás vizsgálat.

Az ismételhetőség vizsgálataim során az adott gyógyszerhatóanyag mintát limit szinten (5000 ppm) addicionáltam ecetsavval, majd a referencia oldatra kalibrálva kapott ecetsav koncentrációk szórását vizsgáltam. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy az ionkromatográfiás vizsgálat szintén jobb (~ 2%-al kisebb) szórás eredményeket adott, mint a gázkromatográfiás.

Stabilitás vizsgálataim esetében mind a referencia oldat, mind az addicionált mintaoldat eltarthatósága is görcső alá került. Az elkészített oldatokat frissen valamint 24 óra elteltével is megvizsgáltam. A két módszer által kapott eredmények tekintében nincs releváns különbség, mindegyik oldat a vizsgált időintervallumban stabilnak tekinthető.

Módszereim érzékenységi vizsgálatainál a mennyiségi meghatározás alsó határára (QL) és a detektálási határra (DL) nyolcszor kisebb koncentráció értéket kaptam az ionkromatográfiával.

Pontosság vizsgálatához limit szintű visszanyerés vizsgálatot is végeztem mindkét technika esetében, mely során szintén az ionkromatográfiás módszer adott jobb eredményeket.

Végeredményül, adott gyógyszerhatóanyag esetében, a két fejlesztett módszer közül az ionkromatográfiás vizsgálat biztosított kedvezőbb eredményeket, még jóval kisebb hatóanyag mintakonzentráció mellett is. Továbbá, a két módszer között nem elhanyagolható különbség a vizsgálandó minta elemzéséhez szükséges analízis idő. A loop-os gőztér-analízises mintavételrel végzett gázkromatográfiás vizsgálat során az áthordás miatt tisztító lépések (n=3) beiktatása volt szükséges a kalibráló (referencia oldat) oldat, valamint a mintaoldatok injektálása között a pontos koncentráció meghatározása érdekében, mely növeli a mérés idejét. Ennek következtében az ionkromatográfiás vizsgálat során közel 30%-al csökkenhet a vizsgálat analízis ideje.

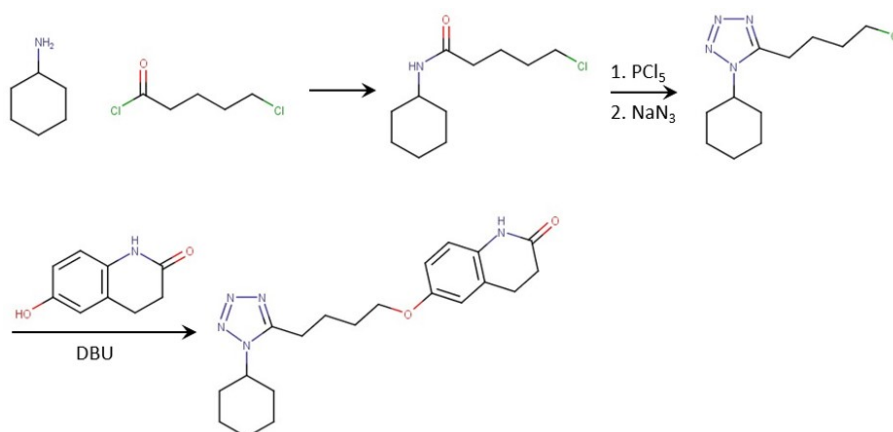
1. Tézis. *Adott hatóanyagban található ecetsav mennyiségének közvetlen meghatározására az ionkromatográfia kedvezőbb a lángionizációs detektort alkalmazó gázkromatográfiánál. Az ionkromatográfiás technika segítségével hatóanyagokban található ecetsav szennyezés kisebb kimutatási határral meghatározható kevesebb hatóanyag mennyiségből. Az alkalmazott ionkromatográfiás vizsgálati paraméterek függvényében jelentősen kedvezőbb relatív szórás értékek (rendszerprecizitás esetében ötször, míg ismételhetőség esetében másfélszer kisebb eredmények) érhetőek el, továbbá legalább 30%-al csökkenthető az analízis ideje, 10%-al jobb visszanyerés mellett ötvenszer kevesebb mennyiségű hatóanyagból.*

3.2. Nátrium-azid meghatározása cilostazol hatóanyagban

A nátrium-azid meghatározása gyógyszerhatóanyagokban egy jó példája az ionkromatográfia alkalmazhatóságára és relevanciájára a gyógyszeranalitika területén. Az azidion rutinszerű vizsgálata elkerülhetetlen bizonyos típusú gyógyszerhatóanyagok esetében. A doktori munkám során feladatom volt ionkromatográfias módszer fejlesztése cilostazol hatóanyagban esetlegesen található nátrium-azid szennyezés meghatározására [74].

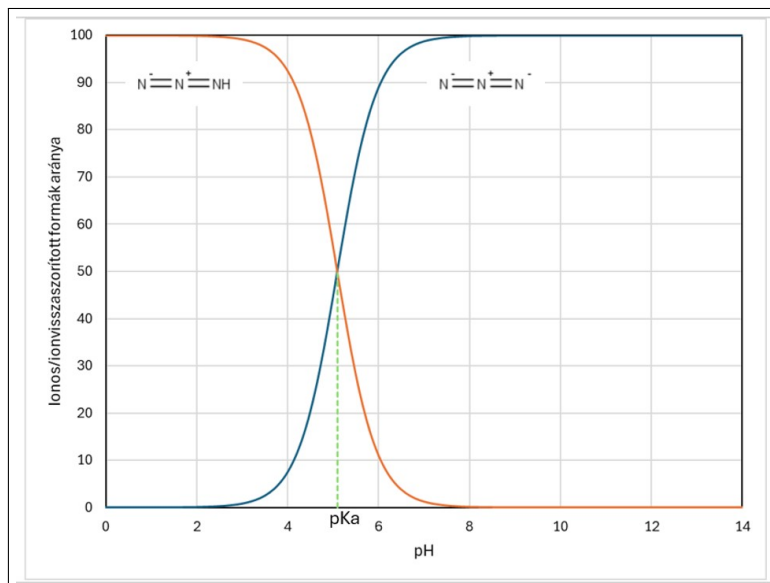
Maga a cilostazol hatóanyag a 3-as típusú foszfodiészteráz-gátló gyógyszerek csoportjába tartozik. Hatását többféleképpen fejt ki, egyrészt bizonyos vérereket tágít, másrészt a vérlemezkék rögzítő aktivitását csökkenti [75]. A cilostazol napi dózisa 200 mg, viszont CYP2C19-gátló gyógyszerek együttes alkalmazása esetén a maximális napi dózisa 100 mg [76].

Cilostazol előállítása (3.2. ábra) során a megfelelő hatás eléréséhez, bizonyos szerkezeti rész (tetrazol-gyűrű) kialakításához szükséges a nátrium-azid, mely potenciális szennyezőként előfordulhat a gyártott végtermékben.



3.2. ábra. Cilostazol hatóanyag lehetséges szintézisútja.

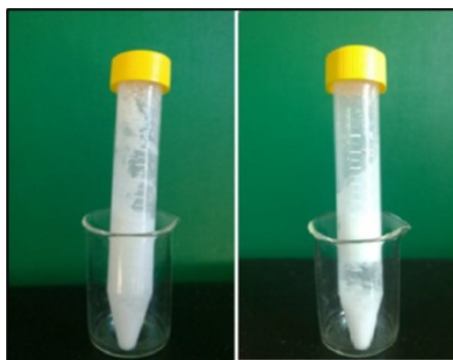
A nátrium-azid (Na-azid) genotoxikus, legalacsonyabb halálos dózisa 10 mg/kg. A nemzetközi irányelveknek megfelelően ezen szennyező analitikai vizsgálata szükséges cilostazol hatóanyagból, mivel a szintézisútjában szerepel a nátrium-azid. A megadott napi dózisokat, valamint az ICH (Nemzetközi Harmonizációs Konferencia) M7(R2) irányelveket figyelembe véve a cilostazol hatóanyagban a maximális megengedett nátrium-azid koncentráció 7,5 ppm [77]. Az azid ionizáltsági állapota látható a 3.3. ábrán, melynek értelmében az azid ionos állapotban van az elválasztás és a vezetőképességi detektálás során is.



3.3. ábra. Azid ionizáltsági állapota a pH függvényében (számított $pK_a = 5,09$).

3.2.1. Mintaelőkészítés

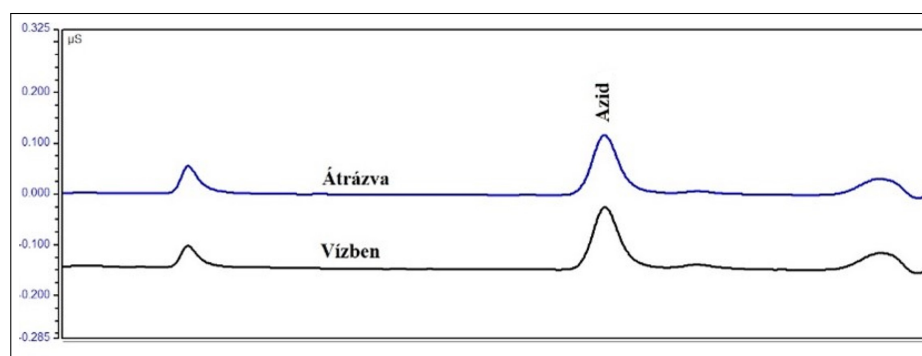
Az adott cilostazol minta azid szennyező vizsgálatához, valamint a helyes és kivitelezhető visszanyeréshez a mintát teljes mértékben fel kell oldani valamilyen oldószerben. Így az oldhatósági vizsgálatok fontos lépései a mintaelőkészítésnek. A cilostazol hatóanyag gyakorlatilag oldhatatlan vízben ($1,678 \text{ mg/dm}^3$), egy zagyot képez (3.4. ábra). Ezzel szemben diklórmetánban, kloroformban, ecetsavban szinte korlátlanul oldódik. A Na-azid nagyon vízdoldékony ($41 \text{ g/100 mL } 17^\circ\text{C-on}$) [78], viszont diklórmetánban szinte oldhatatlan.



3.4. ábra. Cilostazol hatóanyag oldhatósági kísérlet.

Ezen oldhatósági ismeretek alapján folyadék-folyadék extrakciót alkalmaztam. A minta-előkészítés fejlesztéséhez diklórmetán/víz extrakciós elegyet használtam.

A folyadék-folyadék extrakciós vizsgálataim azt mutatták, hogy az extrakció során a cilostazol a diklórmetán vízben való oldhatósága miatt kis koncentrációban megtalálható a vizes fázisban. Az így átoldódott cilostazol azonban, miután a diklórmetán elpárolog a vízből, kiválik az edény falán. Az azid extrakciós hatásfokának megállapításához is az ionkromatográfiás készüléket használtam. Az eredményeim alapján elmondható, hogy az azid több mint 95%-os hatásfokkal a vizes fázisba extrahálható diklórmetánból (3.5. ábra).



3.5. ábra. Az extrakció hatásfokának vizsgálata ionkromatográfiával.

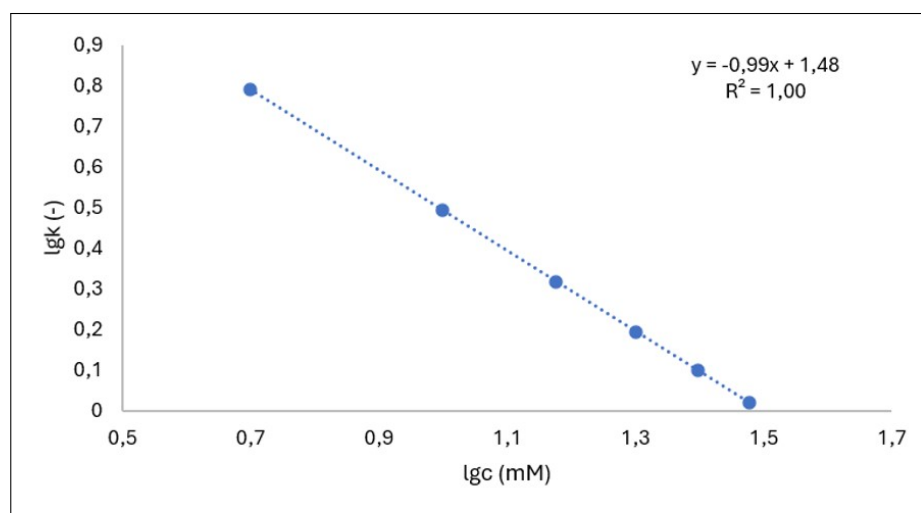
Az alkalmazott oldatokat az alábbiak szerint készítettem el:

- Vak oldat: 5 mL diklórmetánt és 5 mL nagy tisztaságú vizet mértem be egy kb. 20 mL-es headspace mintatartóba és összeráztam. Miután két fázisra vált szét, a felső fázisból kivettem 1,0 mL-t és egy kb. 1,5 mL-es műanyag mintatartóba tettem.
- Referencia törzsoldat: Egy $\approx 75 \mu\text{g/mL}$ -es koncentrációjú nátrium-azid oldatot készítettem dimetil-szulfoxiddal.
- Referencia oldat: 5 mL diklórmetánt mértem be egy kb. 20 mL-es headspace mintatartóba, majd analitikai pontossággal hozzáadtam $50 \mu\text{L}$ referencia törzsoldatot és összeráztam. Az így elkészített elegyhez mértem 5 mL nagy tisztaságú vizet és összeráztam. Miután két fázisra vált szét, a felső fázisból kivettem 1,0 mL-t és egy kb. 1,5 mL-es műanyag mintatartóba tettem. Az így elkészített oldat nátrium-azid tartalma: $\approx 0,75 \mu\text{g/mL}$.
- Mintaoldat: Analitikai pontossággal bemértem 500 mg vizsgálandó mintát egy kb. 20 mL-es headspace mintatartóba, majd 5 mL diklórmetánban oldottam fel. Az így elkészített elegyhez mértem 5 mL nagy tisztaságú vizet és összeráztam. Miután két fázisra vált szét, a felső fázisból kivettem 1,0 mL-t és egy kb. 1,5 mL-es műanyag mintatartóba tettem.

- Adicionált mintaoldat: Analitikai pontossággal bemértem 500 mg vizsgálandó mintát egy kb. 20 mL-es headspace mintatartóba, majd 5 mL diklórmetánban oldottam fel, majd analitikai pontossággal hozzátettem 50 μL referencia törzsoldatot és összeráztam. Az így elkészített elegyhez mértem 5 mL nagy tisztaságú vizet és összeráztam. Miután két fázisra vált szét, a felső fázisból kivettem 1,0 mL-t és egy kb. 1,5 mL-es műanyag mintatartóba tettem.

3.2.2. Azidion retenciós tulajdonságai

A lineáris eluenserősségi modell (1.22 egyenlet) igazolásához ábrázoltam a $\lg k - \lg c$ diagramot. A kapott függvény esetében az egyenes meredeksége a mintakomponens töltésével megegyező, mivel az eluens ellenionja (OH^-) egyértékű ion.

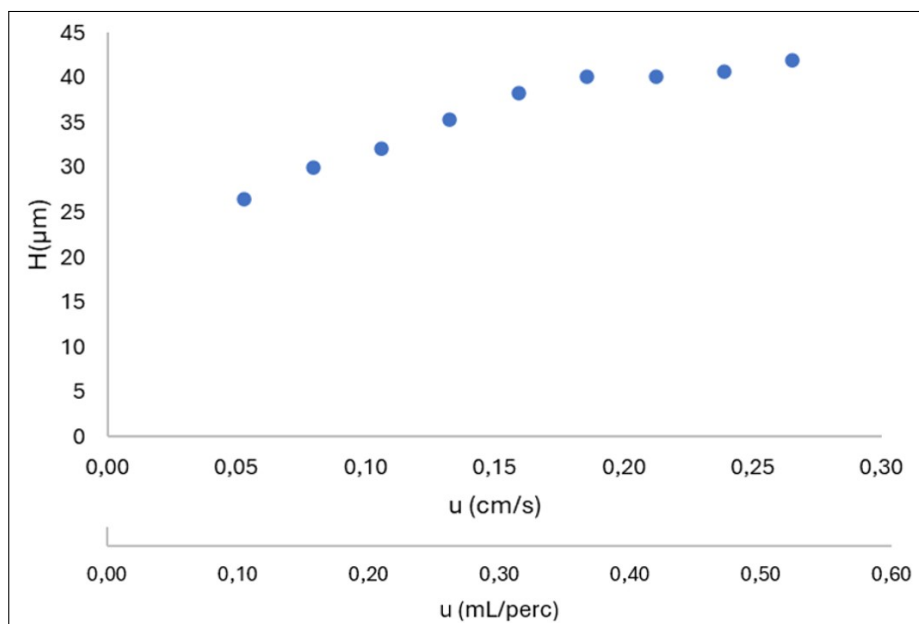


3.6. ábra. Retenciós tényező logaritmusának az eluens koncentráció logaritmusának függvényében.

A 3.6. ábrán látható az egyenes egyenletéből, hogy az azidion egyszeres töltésű ionként van jelen a vizsgálat alatt, így megállapítható, hogy az azidion retenciós viselkedése az egyensúlyi elméletnek megfelelő.

A sebesség elméletet alkalmazva az optimális áramlási sebesség megállapításához ábrázoltam a $H - u$ görbét (3.7. ábra).

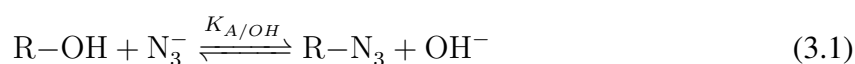
A diagram teljesen korrelál az irodalomban található eredményekkel (1.3. ábra (B) görbéje, [13]), valamint látható, hogy a legnagyobb hatékonysághoz tartozó pont minden bizonnyal a legkisebb mért áramlási sebesség alatt van. Az ionkromatográfias rendszer esetében 0,1 mL/perc térfogatáramlási sebességnél kisebbet nem tudok alkalmazni, mert a rendszer nem tudná reprodukálhatóan biztosítani ezt a kis áramlási sebességet, így ennek értelmében a mérési idő csökkenthető az áramlási sebesség növelésével a hatékonyság jelentős csökkenése nélkül.



3.7. ábra. van Deemter görbe.

A hőmérséklet hatásától függő retenciós idő változással több irodalom is foglalkozik, melyek közül található olyan, mely termodinamikai aspektusból közelít [13], és megállapítja, hogy szervesen ionok esetében nem vonható le egyértelmű összefüggés. Az irodalmi részben is említett Paul R. Haddad és Peter E. Jackson hőmérséklet hatásának vizsgálatai alapján [2] megállapították, hogy például: fluorid, klorid, nitrit esetében nincs hatása a hőmérsékletnek, viszont bromid és nitrát esetében jelentős hőmérsékletfüggés tapasztalható. Annak megállapítására, hogy az azidion hogyan viselkedik a hőmérséklet hatására, vizsgáltam az azidion retenciós viselkedését eltérő hőmérsékletek mellett. A hőmérséklet hatásának vizsgálatához a van't Hoff összefüggést kifejezve az azidion és az eluensben található hidroxidionok egyensúlyi szabadentalpiájából, meghatároztam a ioncserével járó entalpia és entrópia változások különbségét a következők szerint.

Az azidionok elválasztásakor az alábbi ioncsere-egyensúly játszódik le, mely valójában két egyensúlyi folyamat eredője.





Hidroxidionok szabadentalpia változása az alábbi módon írható fel:

$$\Delta G_{\text{OH}} = -R T \ln K_{\text{OH}} = \Delta H_{\text{OH}} - T \Delta S_{\text{OH}} \quad (3.4)$$

míg az azidionok szabadentalpia változása az alábbi módon írható fel:

$$\Delta G_A = -R T \ln K_A = \Delta H_A - T \Delta S_A \quad (3.5)$$

melyekből a teljes ioncsere folyamat szabadentalpia változása kifejezhető.

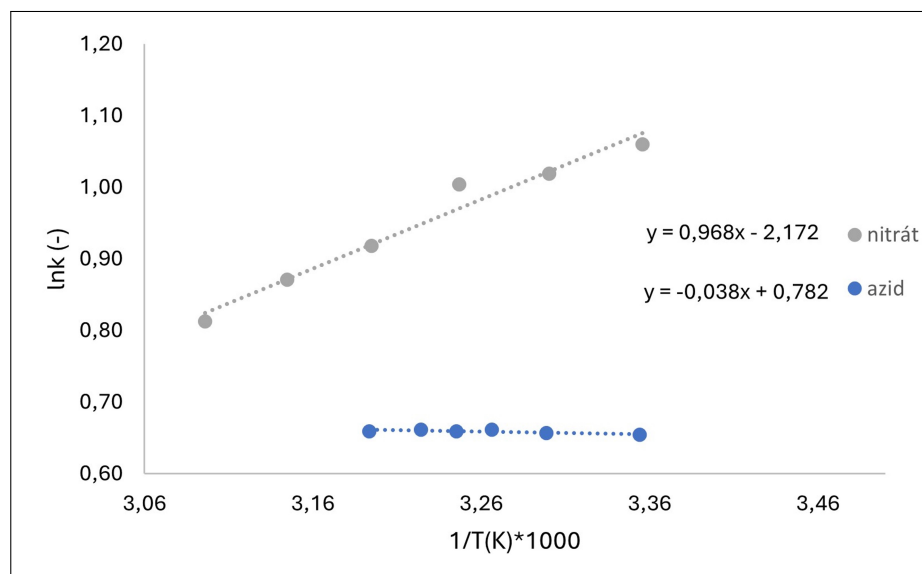
$$\Delta \Delta G = \Delta G_A - \Delta G_{\text{OH}} = -R T \ln K_{A/\text{OH}} \quad (3.6)$$

A (3.6) összefüggésből $\ln K_{A/\text{OH}}$ -t kifejezve, az ioncsere folyamat van't Hoff analízise elvégezhető.

$$\ln K_{A/\text{OH}} = -\frac{\Delta \Delta G}{R T} = -\frac{\Delta \Delta H}{R T} + \frac{\Delta \Delta S}{R} \quad (3.7)$$

A (3.7) összefüggés grafikus megjelenítéséhez hat különböző oszlop hőmérsékletet alkalmaztam 25 °C és 40 °C között. A kapott retenciós tényezők természetes alapú logaritmusának függvényében ábrázoltam az adott hőmérséklet reciprokának ezerszeresét. Az így kapott pontokra illesztett egyenes egyenlete segítségével megadhatóak az entalpia és entrópia értékek. A 3.8. ábra mutatja a kapott eredményt a nitrácion hőmérsékletfüggéséhez [13] viszonyítva.

Az azidion egyenesének meredekségével kiszámítottam a hidroxid-ionok és az azidionok entalpia változásainak (ΔH) különbségét, mely a mérési adatok alapján, kevesebb mint 1 kJ/mol (0,31 kJ/mol), míg az entrópia változásainak (ΔS) különbsége is csupán 6,5 J/mol*K. A hat különböző hőmérsékleten kapott retenciós idők relatív szórása mindössze 0,18%. A mérési eredményeim tehát azt mutatják, hogy a hőmérséklet nincs hatással az azid retenciós idejére.



3.8. ábra. van't Hoff vizsgálat azidion illetve nitrátió [13] esetében.

3.2.3. Validálás

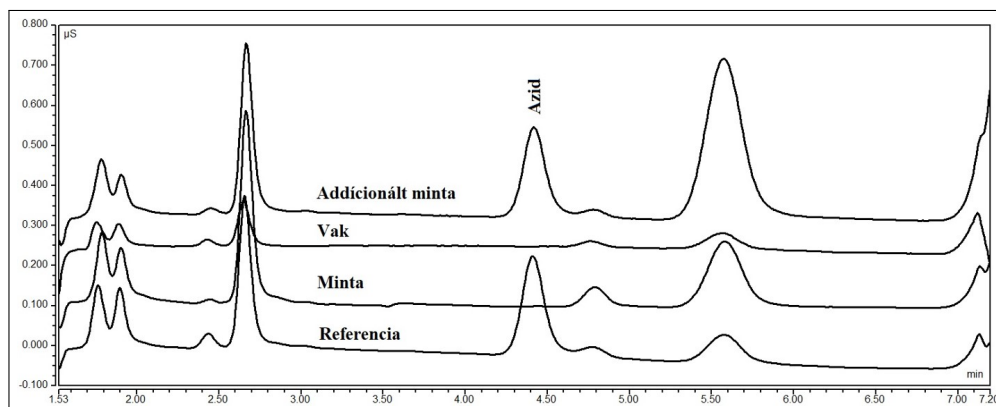
Az azidionok cilostazolból történő meghatározására fejlesztett módszerem leírása a 3.4. táblázatban található.

3.4. táblázat. Ionkromatográfias módszer azidion meghatározására.

Eluens	KOH		
	Idő [perc]	Eluens koncentráció [mM]	Szupresszor áramerősség [mA]
Gradiens program	0	15	19
	5	15	19
	8	80	99
	20	80	99
	23	15	19
	40	15	19
Eluens áramlási sebessége	0,50 mL/perc		
szupresszor	Recycle Mode		
Előtét kolonna	IonPac AG11HC (2 mm x 50 mm)		
Kolonna	IonPac AS11HC (2 mm x 250 mm)		
Oszlop hőmérséklet	40 °C		
Detektor hőmérséklet	35 °C		
Mintaadagoló hőmérséklet	15 °C		
Injektált térfogat	5 µL		
Futási idő	40 perc		

A fejlesztett módszert a nemzetközi szabályozásoknak (ICH guideline) megfelelően limit szinten validáltam [79]. A validálás vizsgálatai a következők voltak, melyek számszerű eredményei a 3.5. táblázatban találhatóak az adott vizsgálatokhoz tartozó követelményekkel együtt:

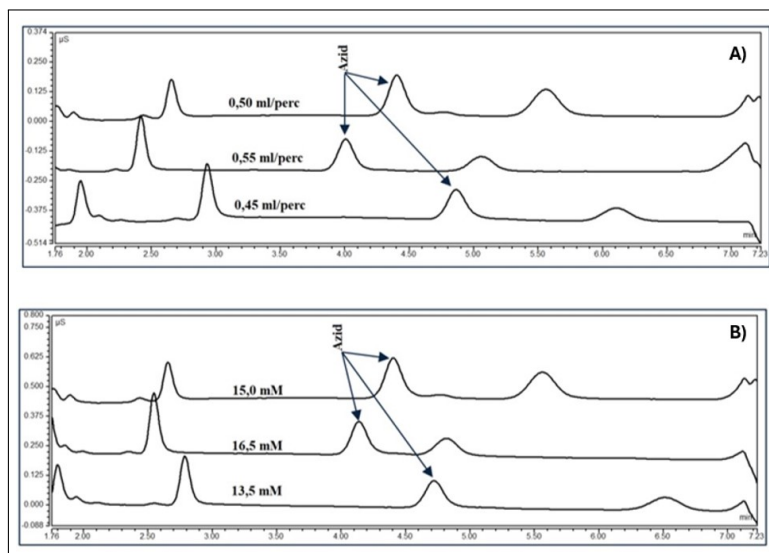
- **Specifikusság/Szelektivitás:** A vizsgálat bizonyítja, hogy az azidion egyértelműen elválasztható az addicionált mintaoldatban lévő egyéb szennyezőktől. Tehát a módszer specifikus/szelektív az adott szennyezés vizsgálatára, valamint az adott rendszeralkalmassági paraméterek teljesülnek. A kapott kromatogramok (3.9. ábra) igazolják, hogy a módszer specifikus/szelektív.



3.9. ábra. Cilostazol hatóanyagban azid meghatározása során felvett kromatogramok.

- **DL, QL:** A kimutatási határ (DL) és a mennyiségi meghatározás határa (QL) az a legkisebb koncentráció, amelynél a vizsgált komponens jele legalább háromszor (DL) és tízszer (QL) nagyobb, mint a mért zaj nagysága. Az azidion jel nagysága háromszorosa a zaj nagyságának 0,52 ppm-es koncentrációnál (DL), míg 1,73 ppm-es koncentrációnál (QL) tízszeres a különbség, így az eredmények megfelelnek a követelményeknek.
- **Rendszerprecizitás:** A precizitás, mint teljesítményjellemző a véletlenszerű hibák nagyságával függ össze. A precizitást a vizsgált eredmények statisztikai elemzésével kell jellemezni, a tapasztalati szórás (SD), relatív szórás (RSD%) és a 95%-os szinten számított megbízhatósági tartomány megadásával. A rendszerprecizitás vizsgálata a limit koncentráció szintjén 6 párhuzamos injektálásból áll. Mind a retenciós időre, mind a területek relatív szórására kapott eredmények megfelelnek az előre meghatározott követelményeknek, így elmondható, hogy limit szinten precíz a vizsgálati módszer.
- **Pontosság (visszanyerés):** A pontosság vizsgálata során a mintát a limit szintnek megfelelő (7,5 ppm) nátrium-aziddal addicionáltam, a kapott eredményekből kiszámítottam a visszanyerést. A kapott eredmény alapján - mely közel 100% - megállapítható, hogy 7,5 ppm-es koncentráció szinten pontos a validált módszer.
- **Stabilitás:** A stabilitás meghatározásához az elkészített oldatokat 24 órán keresztül a mintatartóban tárolva tartottam, majd újrvizsgáltam. Mind a referencia oldatra, mind az addicionált mintaoldatra kapott eredmények azt mutatják, hogy a vizsgált oldatok eltarthatóak temperált mintatartóban legfeljebb 24 óráig.

- Robusztusság: Bizonyos paraméterek (áramlási sebesség, kezdeti eluens koncentráció) megadott mértékű változtatásával igazoltam, hogy az adott szennyezés specifikusan elválasztható (3.10. ábra) a többi szennyezéstől az addicionált mintaoldatban, valamint a megadott rendszeralkalmassági paraméterek teljesülnek.



3.10. ábra. Robusztusság vizsgálat, A) áramlási sebesség változásának hatása és B) a kezdeti eluens koncentráció változásának hatása.

3.5. táblázat. Validálás eredményei.

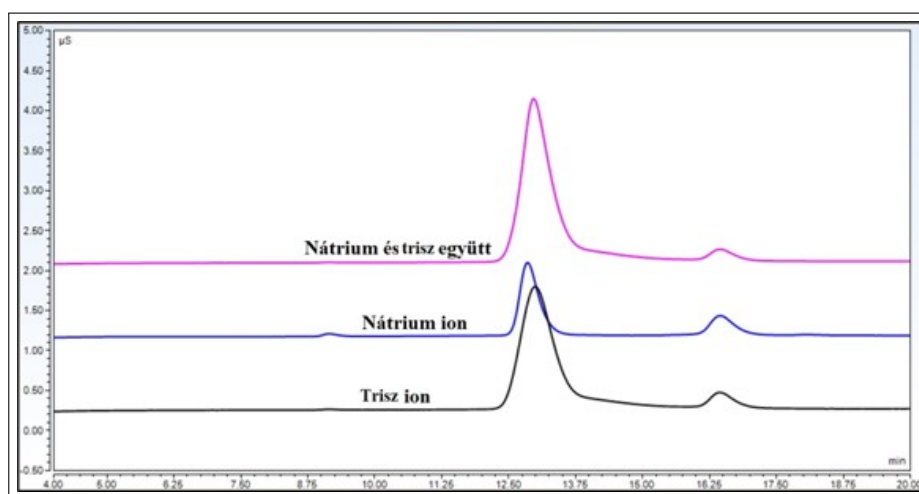
Vizsgálat	Eredmény	Követelmény
Specifikusság (7,5 ppm)		
Retenciósi idő (t_R ,perc)	4,41	
Visszatartási tényező (k ; $t_0=1,5$ perc)	2,94	1-10
Tányérszám (N)	5097	≥ 2000
Szimmetria faktor (A_s)	1,1	$\leq 1,5$
Detektálási határ (S/N)=3	0,52 ppm	2,25 ppm
Mennyiségi meghatározási határ (S/N)=10	1,73 ppm	7,50 ppm
Rendszerprecizitás	7,50 ppm	
Retenciósi idő (RSD%)	0,14%	$\leq 5,0\%$
Terület (RSD%)	16,5%	$\leq 20,0\%$
Visszanyerés (7,50 ppm)		
Visszanyerés (%)	102,4%	75,0%–125,0%
Stabilitás 24h (7,50 ppm)		
Referencia oldat visszanyerés (%)	88,0%	85,0%–115,0%
Addicionált minta visszanyerés (%)	110,1%	85,0%–115,0%

A validálás során, az egyes vizsgálatok eredményei (3.5. táblázat) megfelelnek az előre meghatározott gyógyszergyári követelménynek, így a fejlesztett és validált módszer, cilostazol hatóanyagban található nyomnyi (7,5 ppm) mennyiségű nátrium-azid limit szintű meghatározására alkalmazható.

2. Tézis. *Cilostazol hatóanyag gyártása során alkalmazott nátrium-azid mennyisége meghatározható 7,50 ppm-es koncentrációban ionkromatográfiás módszerrel, folyadék-folyadék extrakciós mintaelőkészítés alkalmazásával. Az azidion és az eluens hidroxid-ionjainak ioncserre folyamatai során meghatározott entalpiaváltozások különbsége elhanyagolható ($<1\text{kJ/mol}$), mely eredményeképpen az azidion retenciója független a hőmérséklettől. A nemzetközi előírásoknak megfelelően limit szinten validált módszer eredményei alapján, a vizsgálat specifikus, robusztus, valamint limit szinten precíz és pontos.*

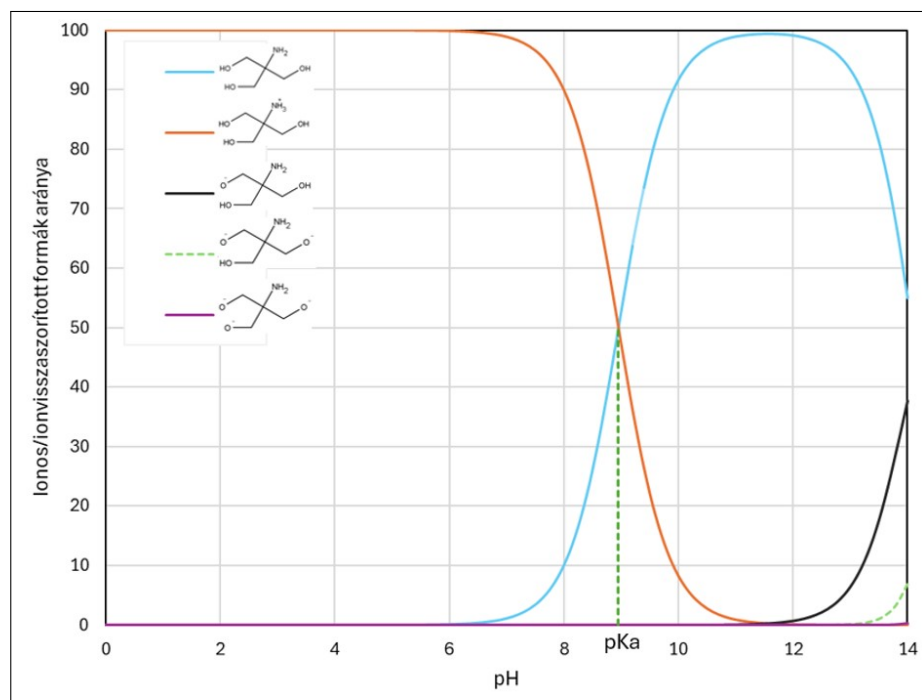
3.3. A mátrixhatás kihasználása a felbontás javítására trisz-és nátrium-kationok között

A trometamint (tris(hidroximetil)-aminometán, továbbiakban: trisz) széleskörűen alkalmazzák puffer-rendszerekben, de fémionokkal komplexet képezhetnek vele, valamint gyógyszerként is használják acidózis kezelésére [80]. Vizsgálata nem minden állófázis esetében egyszerű, de a megfelelő körülmények megválasztásával megoldható [81]. Dionex IonPac CS16-os nagykapacitású állófázison a trisz-és nátrium-kationok nem választhatóak el egymástól (3.11. ábra).



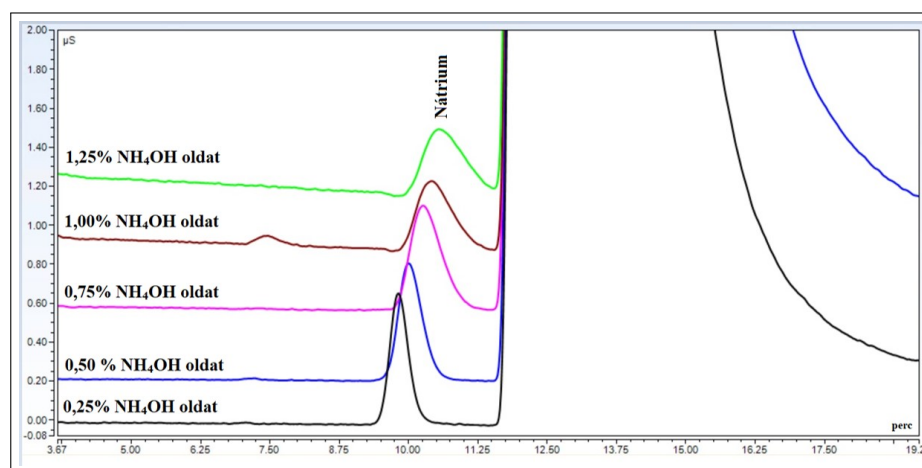
3.11. ábra. Nátrium-és trisz-kation elválasztása vízben.

A trisz-kation ionizáltsági foka a pH függvénye (3.12. ábra), míg a szerves nátriumionnak a pH -tól független. Vizsgáltam, hogy egy meglehetősen bázikus környezet, mely egyéb mátrix ionokkal jelentősen túlterhet, milyen hatással van a két ion retenciós tulajdonságaira.



3.12. ábra. Trisz ionizáltsági állapota a pH függvényében (számított $pK_a = 8,95$).

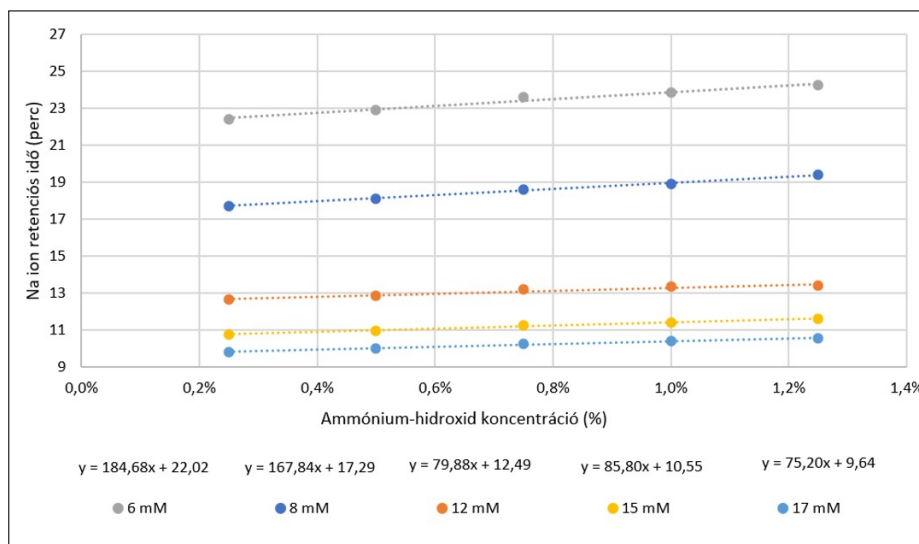
A vizsgálatok alapját képező mátrixként ammónia oldatot használtam. Elsőként vizsgáltam az ammónium-hidroxid koncentráció változtatásának hatását a nátrium-kation viselkedésére. Az eredmények azt mutatták, hogy a nátriumiont nagy koncentrációjú ammónium-hidroxid oldatba téve a szervesen ion retencióját eltolódik egy egyszerű vizes oldathoz képest, mely látható a 3.13. ábrán.



3.13. ábra. Nátriumion kromatogramjai eltérő koncentrációjú ammónium-hidroxid oldatban.

3.3.1. Az eluens koncentrációjának hatása a nátrium-kation viselkedésére

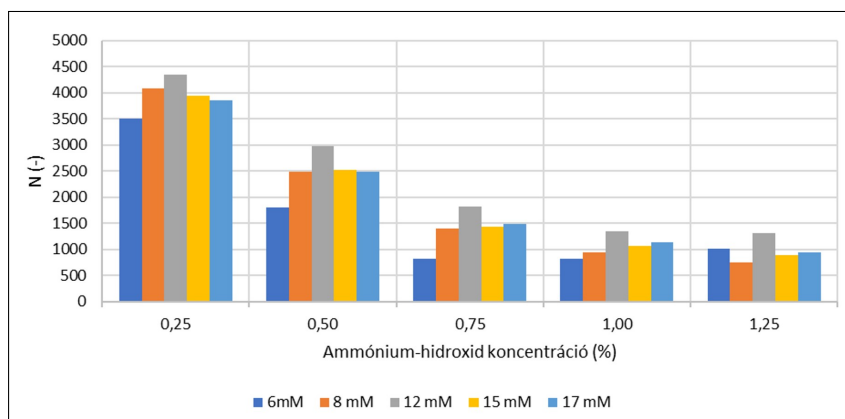
A nátriumion retenciójára nemcsak az alkalmazott ammónium-hidroxid oldat koncentrációjának van hatása, hanem az alkalmazott eluens (metánszulfonsav oldat) koncentrációjának is, így vizsgáltam ezen paraméter hatását is.



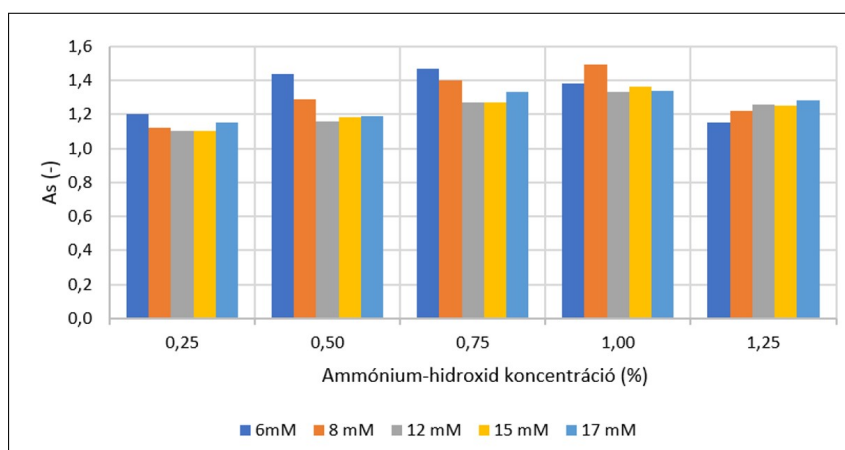
3.14. ábra. Nátriumion retenciós idejének változása eltérő koncentrációjú ammónium-hidroxid oldatban és eltérő eluens (metánszulfonsav) koncentráció esetében. Az eltérő színű egyenesek mutatják az egyes eluens koncentrációkhoz tartozó eredményeket.

Az egyes eluens koncentrációkhoz tartozó retenciós idő változások – az alkalmazott ammónium-hidroxid koncentrációk függvényében – egyenesekkel közelíthető függvényeket adnak. A 3.14. ábrán látható a retenció növekedése az ammónium-hidroxid oldat koncentrációjának növelésével, valamint az is belátható, hogy kisebb eluens koncentrációnál ez a hatás jelentősebb. 8 mM-os metánszulfonsav eluens koncentráció esetében, 1,25%-os ammónium-hidroxid oldatban a nátriumion retenciós ideje 10%-al nagyobb, mint a 0,25%-os ammónium-hidroxid oldatban.

Ezen rendszerben vizsgáltam a nátrium-kation csúcs jellemző paramétereit is, úgy mint elméletitányér-szám és a szimmetria faktor (3.15 – 3.16. ábrák). Ezen jellemzők vizsgálata során kapott eredmények alapján elmondható, hogy a szimmetria faktor közel állandó, míg a tányérszám mértéke jelentősen csökken az ammónium-hidroxid koncentrációjának növelésével.



3.15. ábra. Nátriumion csúcs elméletitányér-számának változása eltérő koncentrációjú ammónium-hidroxid oldatban és eltérő eluens (MSA) koncentráció esetében.



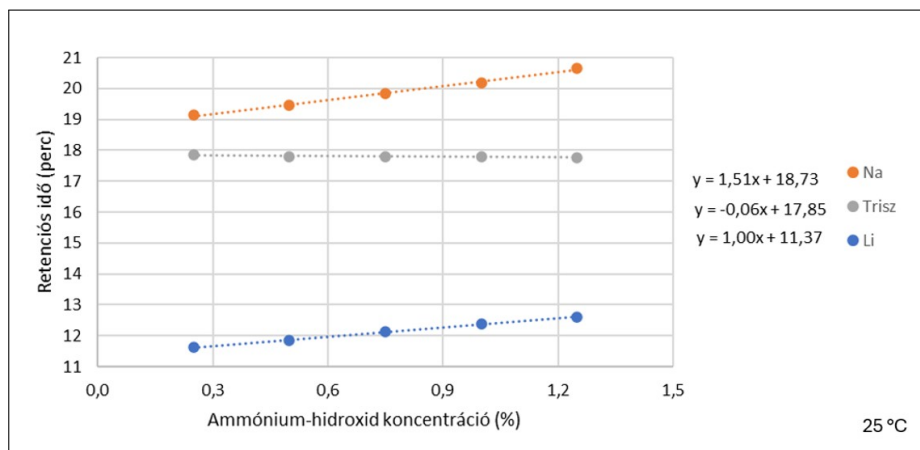
3.16. ábra. Nátriumion csúcsának szimmetria faktor változása eltérő koncentrációjú ammónium-hidroxid oldatban és eltérő eluens (MSA) koncentráció esetében.

3.3.2. Az oszlop hőmérséklet és az injektált térfogat hatása

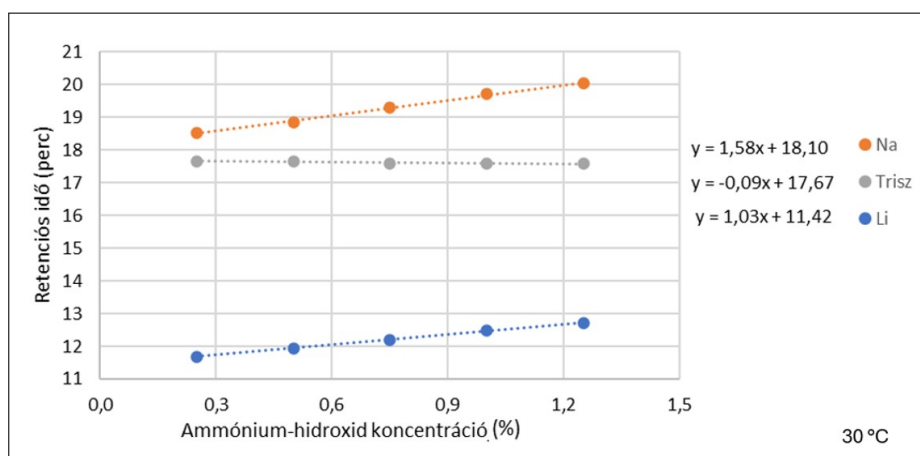
A további vizsgálatokhoz két szervetlen (lítium, nátrium) iont és a trisz-kationt alkalmaztam. A lítium-kation bevonásával igazolható, hogy az ammónium-hidroxid nem specifikusan csak a nátriumion viselkedésére van hatással. Annak megállapítására, hogy van-e további hatása az alkalmazott hőmérsékletnek és az alkalmazott injektált térfogatnak ezen rendszerre, kísérleteket végeztem három hőmérsékleten és három eltérő injektált térfogaton. A vizsgálatok során a retenciós idők mellett a csúcsokra jellemző teljesítményjellemző paramétereket is vizsgáltam. Az adott ammónium-hidroxid oldat koncentrációit a 25%-os ammónium-hidroxid oldat megfelelő hígításával kaptam és ebbe kerültek be a vizsgálandó kationok, az adott koncentrációban: lítium ($c = 0,6 \text{ mg/L}$), nátrium ($c = 0,6 \text{ mg/L}$), trisz ($c = 40 \text{ mg/L}$).

Oszlop hőmérséklet változtatásának hatása

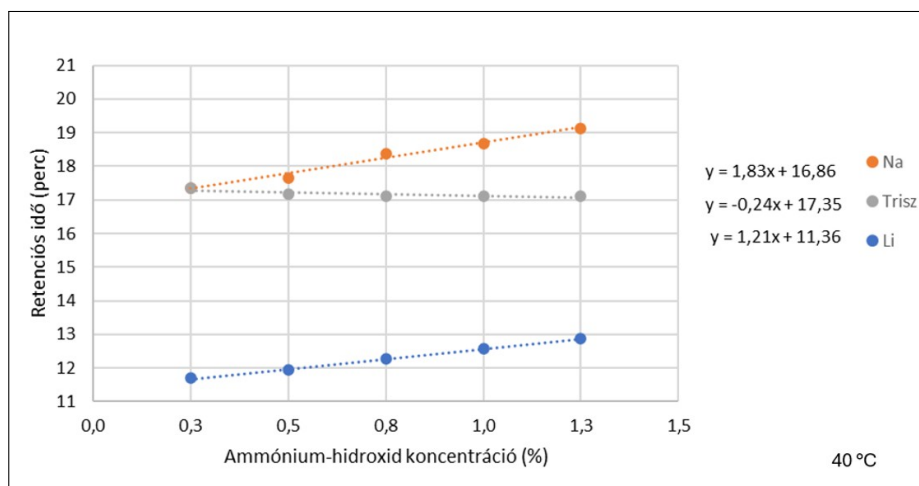
Az eltérő oszlop hőmérséklet (25 °C, 30 °C, 40 °C) hatásának vizsgálata során kapott eredményeim láthatóak a 3.17- 3.19. ábrákon.



3.17. ábra. Kationok (Na, Li, Trisz) retenciósi idejének változása eltérő koncentrációjú ammónium-hidroxid oldatban 25 °C-os oszlop hőmérséklet esetében.



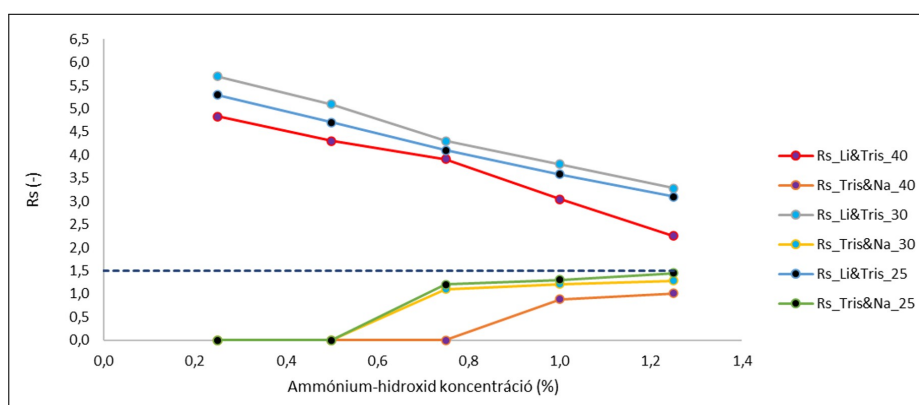
3.18. ábra. Kationok (Na, Li, Trisz) retenciósi idejének változása eltérő koncentrációjú ammónium-hidroxid oldatban 30 °C-os oszlop hőmérséklet esetében.



3.19. ábra. Kationok (Na, Li, Trisz) retenciós idejének változása eltérő koncentrációjú ammónium-hidroxid oldatban 40 °C-os oszlop hőmérséklet esetében.

A kapott eredményekből látható, hogy a szervetlen ionok retenciós ideje nő az alkalmazott ammónium-hidroxid koncentrációjának növelésével és ez a tendencia a hőmérséklet emelésével nő. A szerves ion esetében ellenkező a hatás a retenciós idő tekintetében. Az ábrázolt diagramokról leolvasható, hogy az alacsonyabb hőmérséklet kedvez a nátrium és a trisz közötti felbontásnak.

A felbontásokat ábrázolva, elmondható, hogy ennek a mértéke a lítium-és a trisz-kationok között csökken az emelkedő ammónium-hidroxid koncentrációjával. A trisz-és a nátriumionok közötti felbontás pedig nő az ammónium-hidroxid koncentrációjával, és ez a tendencia alacsonyabb oszlophőmérsékleten nagyobb lehet, melynek eredményeként az alapvonal elválasztás is megközelíthető.



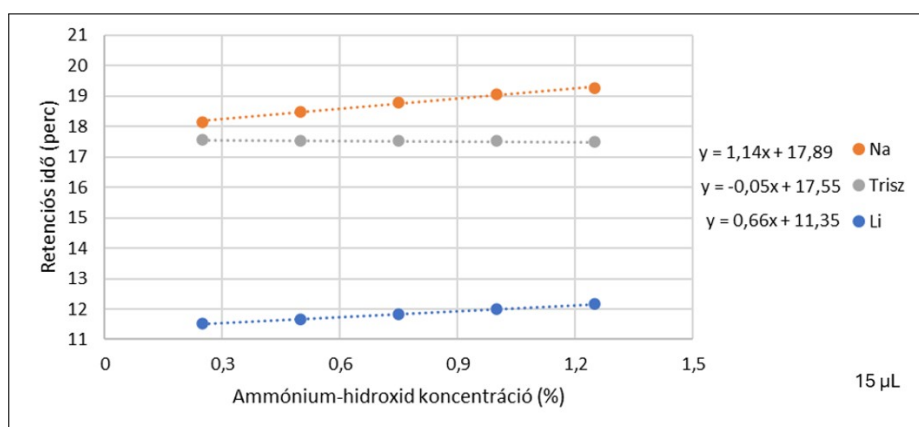
3.20. ábra. Felbontások eltérő oszlop hőmérséklet és ammónium-hidroxid koncentráció esetében.

A szimmetria faktor nő, míg az elméletitányér-szám értékek csökkennek az ammónium-hidroxid koncentrációjának növekedésével a szervetlen ionok esetében, míg a szerves kation

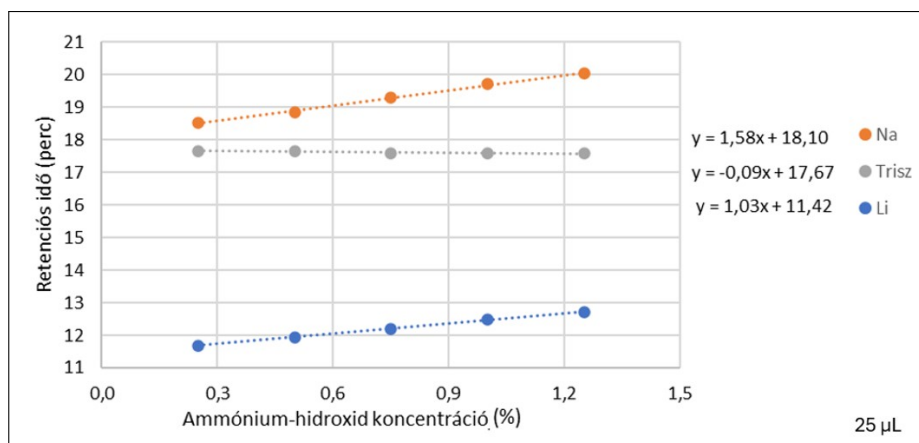
tányérszáma és szimmetria faktora nagyjából konstans, melyeket az eltérő hőmérséklet alkalmazása sem befolyásol.

Az injektált térfogat változtatásának hatása

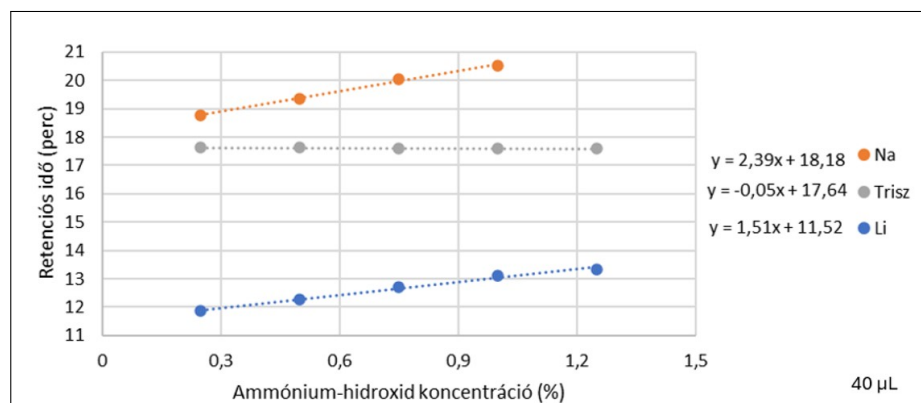
Az injektált térfogat változtatásával is vizsgáltam a különböző koncentrációjú ammónium-hidroxid oldatban oldott lítium-, nátrium- és trisz-kationok retenciós viselkedését. A méréseket 30 °C-os oszlop hőmérsékleten végeztem. A vizsgálatok során kapott eredmények a 3.21 - 3.23. ábrákon láthatóak.



3.21. ábra. Kationok (Na, Li, Trisz) retenciós idejének változása eltérő koncentrációjú ammónium-hidroxid oldatban 15 µL injektált térfogat esetében.



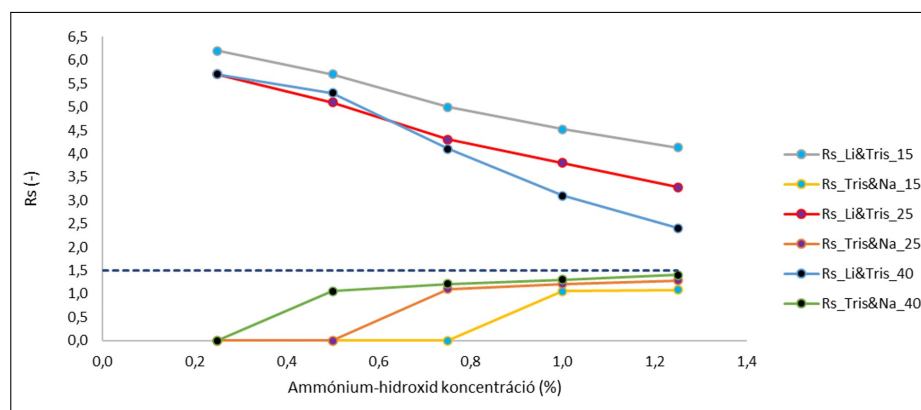
3.22. ábra. Kationok (Na, Li, Trisz) retenciós idejének változása eltérő koncentrációjú ammónium-hidroxid oldatban 25 µL injektált térfogat esetében.



3.23. ábra. Kationok (Na, Li, Trisz) retenciós idejének változása eltérő koncentrációjú ammónium-hidroxid oldatban 40 μ L injektált térfogat esetében.

A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a szervetlen kationok esetében a retenciós idők növekedése a nagyobb injektált térfogattal nőtt, míg a kisebb térfogattal csökkent, a szerves trisz-kation esetében az injektált térfogat nem volt szignifikáns hatással a retenciós időre.

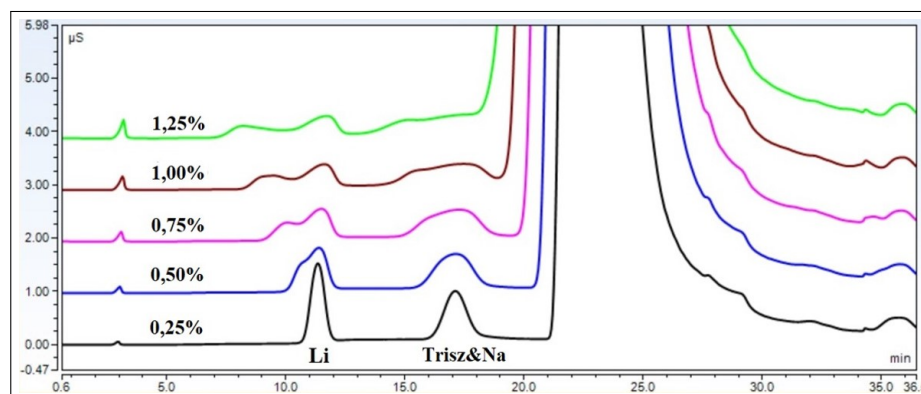
A rendszer teljesítményjellemző paramétereinek vizsgálata során megállapítható, hogy az injektált térfogat növelésével elérhető egy nagyobb felbontás a trisz- és nátrium-kationok között (3.24. ábra), ám ebben az esetben a csúcsalak jelentősen romlik, így mind az elméletitányérszám, mind a szimmetria faktor rosszabb értékeket ad.



3.24. ábra. Felbontások eltérő oszlop hőmérséklet és ammónium-hidroxid koncentráció esetében.

Mátrixionok mennyiségének, valamint a pH hatásának vizsgálata

Az ammóniumion hatásának vizsgálatát elvégeztem ammónium-klorid segítségével is. A vizsgálatok nem vezettek megfelelő eredményre, a kapott csúcsok hasadtak és nem voltak értékelhetőek (3.25).



3.25. ábra. Vizsgált kationok eltérő koncentrációjú ammónium-klorid oldatban.

Ezen viselkedés jól ismert jelenség egy zavaró ionnal meglehetősen túlterhelt rendszer esetében. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a nagy mennyiségben alkalmazott ammónium ionok önmagukban nem okozzák az ammónium-hidroxiddal tapasztalt jelenséget.

A pH hatásának vizsgálatához készítettem ammónium-formiát, ammónium-acetát és ammónium-karbonát oldatokat, melyek ammóniumion tartalma megegyezik a különböző koncentrációjú ammónium-hidroxid oldatokban található ammónium mennyiségével. A mért oldatok pH -ja $\sim 6,5 - 9,1$ között változott. Az eredmények ebben az esetben is hasadt, torz csúcsokat adtak, úgy, mint az ammónium-kloriddal végzett kísérletek során. Ezen eredmények alapján megállapítható, hogy az eltérő pH -nak sincs egyedüli kedvező hatása, így nem egyedül az ammóniumionok jelentős mennyisége okozza a tapasztalt jelenséget.

További pH vizsgálatokat végeztem kálium-hidroxid oldattal, úgy, hogy az ammónium-hidroxid oldatok (0,25%, 0,50%, 0,75%, 1,00%, 1,25%) pH -jának megfelelő pH -jú kálium-hidroxid oldatokat készítettem. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy ez a rendszer sincs olyan hatással a vizsgált ionok retenciójára, valamint teljesítményjellemező paramétereire, mint az ammónium-hidroxidos rendszer, így önmagában a vizsgált minta 11-es pH -n tartása, és a mátrixszal jelentősen terhelt rendszer sem okozza az előzőek során leírt a hatást, tehát a szervetlen kationok (nátrium, lítium) retenció növekedését és a szerves (trisz) ion retenció csökkenését.

Az ammónium-hidroxidos rendszer mátrixfolyamatai

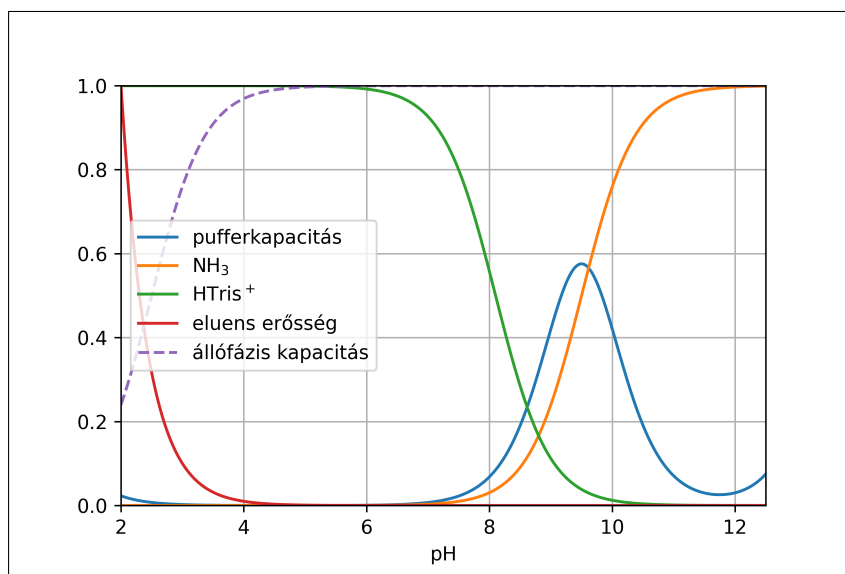
Az előzőekben bemutatott ammónium-hidroxiddal tapasztalt kedvező eredményeket okozó mátrixhatás tehát több hatás eredőjeként tevődik össze, melyek:

- Az eluens gyengülése: Az elválasztás savas körülmények között történik (metánszulfonsav eluens) a vizsgált rendszerben. A H_3O^+ kationok a pozitív töltésű mintaionokkal versenyeznek az ioncserélő egyensúlyban, az állófázis funkciós csoportjaiért. Amikor az erősen bázikus minta injektálásra kerül az oszlopba, helyileg a pH lúgossá válik. Ahogy

a H_3O^+ kationok koncentrációja csökken, úgy nő az oldott anyagok lokális visszatartási tényezője. Következésképpen a vizsgálandó komponensek egy bizonyos időre teljesen „megállhatnak” az oszlop elején. Ennek megfelelően ez a hatás növeli az összes analit visszatartását.

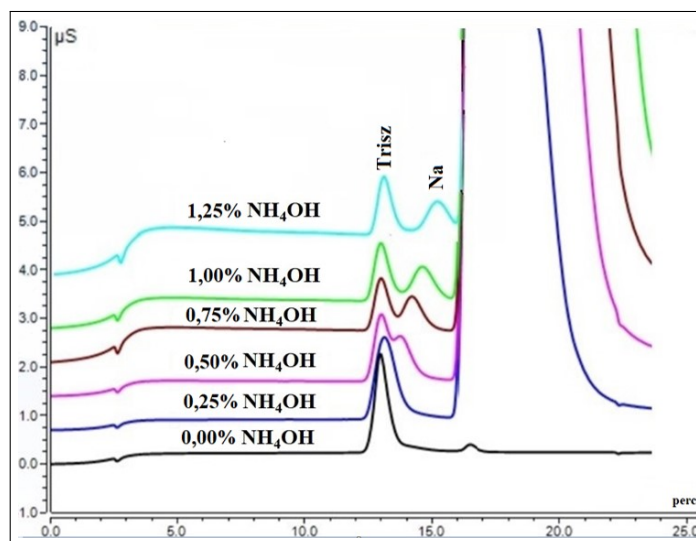
- Trisz disszociációja: A vizsgált rendszerben a trisz a pK_a ($\sim 8,9$) értékének megfelelően a savas elúció és a semleges detektálási körülmények között protonált, tehát kationos formában van. A lúgos pH -jú injektált minta miatt azonban a trisz semleges formában található a rendszerben. Ez a jelenség a trisz csökkent visszatartásához (retenciós idejéhez) vezet.
- Önelúciós hatás és a mátrixionok protonálódása: A nagy koncentrációban beinjektált ammónium kationok az ioncsere-egyensúlyban versenyeznek a minta kationjaival, ami a retenciós tényezők csökkenését eredményezi. Ezt a hatást önelúciónak nevezik [82]. Az injektált minta erősen lúgos pH -ja mellett azonban a mátrix többnyire semleges ammónia formájában van, amely nem mutat önelúciós hatást. Ahogy az eluens pH -ja csökken az elúció során, az ammónium-kation mennyisége növekszik, ami a minta ionjainak csökkent visszatartásához vezet. Az ammónium disszociációja miatt azonban ez a csökkenés nem olyan jelentős, mint egy egyszerű kationmátrix esetében.
- A mátrix pufferkapacitása: A fent felsorolt folyamatok ellentétes hatásait tovább befolyásolja a minta mátrixának (ammónium-hidroxid) jelentős pufferkapacitása az adott pH -n. Ennek eredményeként az eluens pH -ja a vártnál valamivel lassabban tér vissza a savas tartományba, így mindez némileg fokozza a fent említett folyamatok hatását ahhoz képest, mint amikor a mátrix egy erős bázis (pl.: KOH).
- Gyenge kationcserélő ioncserélő kapacitása: A vizsgálatok során alkalmazott ioncserélő állófázis egy gyenge kationcserélő. Ennek megfelelően az ioncserélő kapacitása savas pH -n csökken, míg bázikus pH -n a kapacitása eléri a maximumát. A lúgos minta injektálásával az állófázis helyi ioncserélő kapacitása átmenetileg megnő, növelve a kationok visszatartását. Mivel a trisz az injektálás pH -ján deprotonálódik, ez a hatás a trisz esetében lényegesen kisebb, mint a másik két szerves kation esetében.

A különböző hatások ábrázolása látható a 3.26. ábrán.



3.26. ábra. Az egyes hatások relatív, dimenziómentes ábrázolása a pH függvényében, ahol a piros az a relatív eluenserősség; a szaggatott lila az állófázis relatív ioncserélő kapacitása (feltételezett pK_a : 2,5); ionizáltsági fokok esetében a narancssárga a disszociált (semleges) NH_3 moláris mennyisége míg a zöld a protonált (kationos) trisz moláris mennyisége; a relatív pufferkapacitás a kék, mely az 1,25%-os ammónium-hidroxid oldat pufferkapacitása az oldat koncentrációjához viszonyítva.

A bemutatott visszatartási profilok ezen ellentétes folyamatok nettó eredménye. Ezeket a hatásokat azonban ki lehet használni a koeluálódó vegyületek felbontásának javítására, amint azt a 3.27. ábra mutatja. Látható, hogy a nátrium- és a triszionok nem választhatóak szét az ammónium-hidroxid mátrix jelenléte nélkül. A minta mátrix tartalmának növekedésével azonban az elválasztás egyre kifejezettebbé válik, végezetül az alapvonal elválasztás is elérhető a megfelelő körülmények megválasztásával.

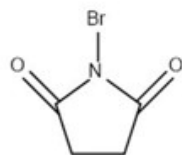


3.27. ábra. Trisz- és nátriumion elválasztása eltérő koncentrációjú ammónium-hidroxid oldatban.

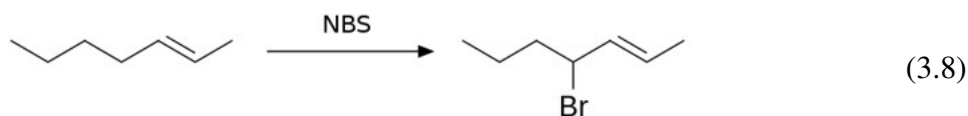
3. Tézis. Kationcserés ionkromatográfia esetében a mátrixhatások figyelembe vehetőek a módszerfejlesztés során a mátrixkomponens előtt, el nem váló szerves és szervetlen kationok megfelelő felbontása érdekében nagy kapacitású gyenge kationcserélő esetében. Adott állófázison (IonPac CS16) az ammónium-kation előtt koeluálódó szerves (trisz) és szervetlen (nátrium) kationok megfelelő elválasztása 1,25%-os ammónium-hidroxid mátrix alkalmazásával alapvonalon elérhető szobahőmérsékleten (25°C). A két csúcs közötti felbontás növekedése az ammónium-hidroxid mátrixhatásainak összetett mechanizmusából ered, amely magában foglalja az eluens lúgosodását, a mátrix pufferkapacitását, a trisz-kation ionizációs állapotának változását, az önelúciót, valamint az alkalmazott oszlop kationcserélő kapacitásának növekedését magas pH-n.

3.4. *N*-brómszukcinimid meghatározása gyógyszerhatóanyagokban

Az *N*-brómszukcinimid (3.28. ábra) széleskörben alkalmazott brómozószer a szerves szintézisek során. Ziegler és munkatársai alkalmazták először az *N*-brómszukcinimidet allil helyzetű brómozási reakcióban (3.8). Az *N*-brómszukcinimid (NBS) elektrofil addíció, elektrofil szubsztitúció, illetve gyökös úton reagálhat a különböző vegyületekkel [83, 84]. A brómozási reakció alatt az NBS stabil, jól visszanyerhető és reaktív inert oldószerben. Alacsony molekulatömegű és kevés mellékreakciót eredményez a használata során [85]. Ezen pozitív tulajdonságai miatt, valamint, hogy könnyebben kezelhető és biztonságosabb, mint az elemi bróm, közkedvelt reagens a vegyipari szintézisek során.



3.28. ábra. *N*-brómszukcinimid szerkezeti képlete.



Az *N*-brómszukcinimid nagy reaktivitása miatt könnyen veszíthet brómot, így potenciálisan genotoxikus hatása van az emberi szervezetre. A bromid felhalmozódva a szervezetben (különösen a pajzsmirigyben, a májban és a vesében) kiszorítja a jódot, és a jód csökkent szintje vezethet különböző rákos elváltozásokhoz (emlő, pajzsmirigy, petefészek vagy prosztata daganat) [86]. A genotoxikus, mutagén, rákkeltő anyagok mennyiségét szigorú nemzetközi előírásoknak megfelelően szükséges ellenőrizni. Az ICH M7(R2) értelmében nem lehetnek ezen szennyezők a gyártott termékben, vagy ha mégis előfordulnak, nem haladhatnak meg bizonyos határt [77]. Ennek a koncentrációnak az értéke függ az alkalmazott készítmény maximális napi dózisától és a terápia időtartamától. A legszigorúbb követelmények az élethosszig tartó terápia esetében vannak, hiszen ekkor a megengedett maximális napi dózisa ezen szennyezőknek 1,5 $\mu\text{g}/\text{nap}$, a legenyhébb esetben, mikor egy hónapnál rövidebb időtartamú a terápia, 120 $\mu\text{g}/\text{nap}$ (3.9).

A maximális koncentráció tehát az alábbiak szerint számítható:

$$c_{\max}[\text{ppm}] = \frac{1,5 \mu\text{g vagy } 120 \mu\text{g}}{\text{napi dózis [g]}} \quad (3.9)$$

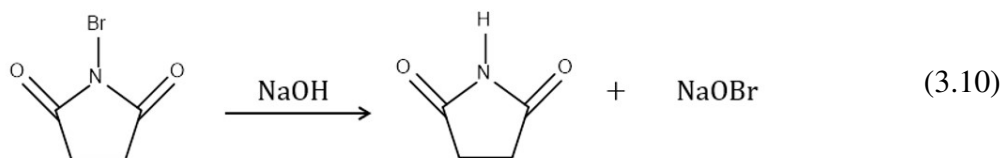
Munkám során két hatóanyag (prasugrel, favipiravir) esetében végeztem el az NBS mennyiségének vizsgálatát [87]. A (3.9) egyenlet alapján a két hatóanyaghoz tartozó maximális koncentráció értékek:

- prasugrel: 25 ppm (60 mg a napi dózis [88], terápia: élethosszig tartó)
- favipiravir: 37,5 ppm (változó dozírozás: első nap 3200 mg, második naptól 1600 mg [89], terápia: rövidebb, mint 1 hónap)

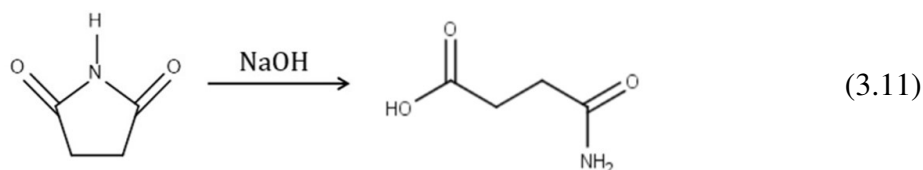
3.4.1. Mintaelőkészítés fejlesztése

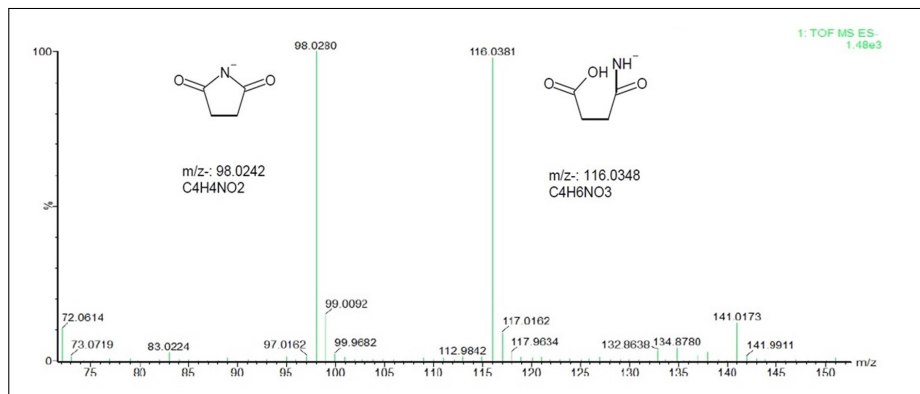
A mintaelőkészítés fejlesztése során a fő célom bromidion képzése volt az NBS-ből. A származékképzéshez lúgkatalizált hidrolízissel végbemenő reakciót alkalmaztam. A lúgos reakciót nátrium-hidroxid oldatban való oldással végeztem.

A származékképzés során az *N*-brómszukcinimiből lúgos (NaOH) oldatban hipobromit keletkezik, valamint szukcinimid (3.10).

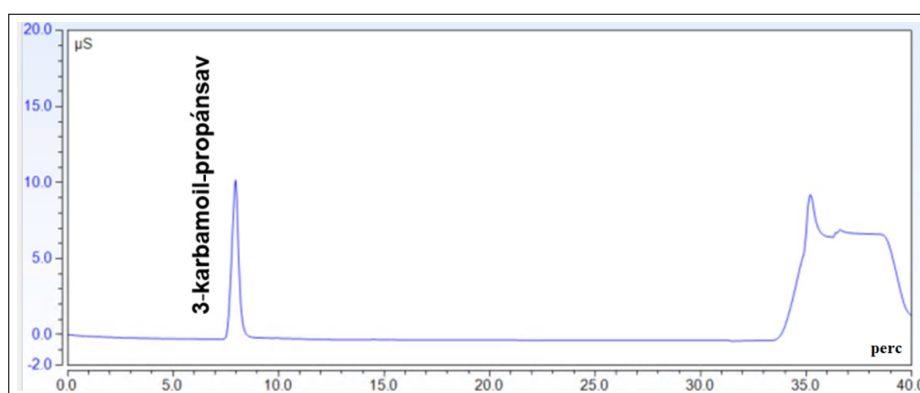


A kísérletek során tapasztaltak szerint a keletkező szukcinimid gyűrű ezen körülmények között kinyílik és szukcinamidsav (3-karbamoil-propánsav) képződik (3.11). 1,5 mM-es NaOH oldatban lévő szukcinimidről (300 mg/L koncentráció) felvett (HPLC-ESI-Q-TOF) tömegspektrum igazolja a 3-karbamoil-propánsav szerkezetét (3.29. ábra), melyet ezen oldatról készített ionkromatográfiás elemzés (3.30. ábra) is alátámaszt.





3.29. ábra. 1,5 mM NaOH oldatban lévő 300 mg/L koncentrációjú szukcinimid tömegspektruma.



3.30. ábra. 300 mg/L koncentrációjú szukcinimidből képződött 3-karbamoil-propánsav kromatogramja 1,5 mM-es NaOH oldatban.

Az alkalmazott nátrium-hidroxidos rendszerhez redukálószerként adva (nátrium-tioszulfát) a hipobromitból bromid képződik (3.12).

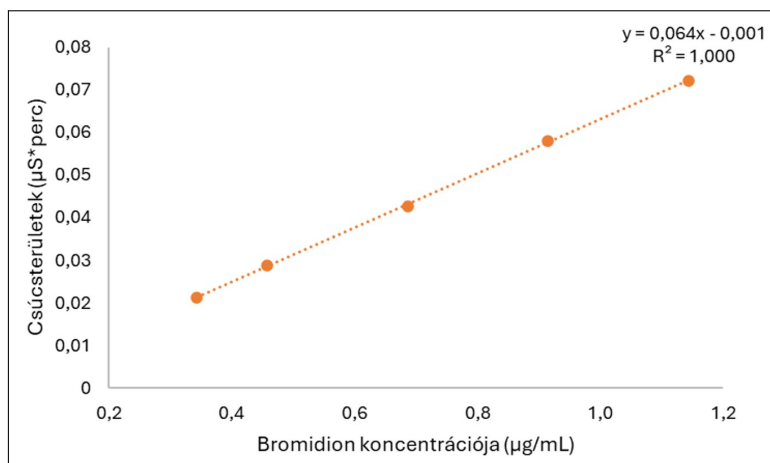


A szukcinamidsav kisebb retencióval eluálódik, így nagyobb a lehetősége a koelúciónak a mintában lévő egyéb szennyezésekkel. A bromidion nagyobb retenciós faktorial rendelkezik, így analízisére egyszerűbben fejleszthető egy specifikus módszer.

Mintaelőkészítés hatásfoka

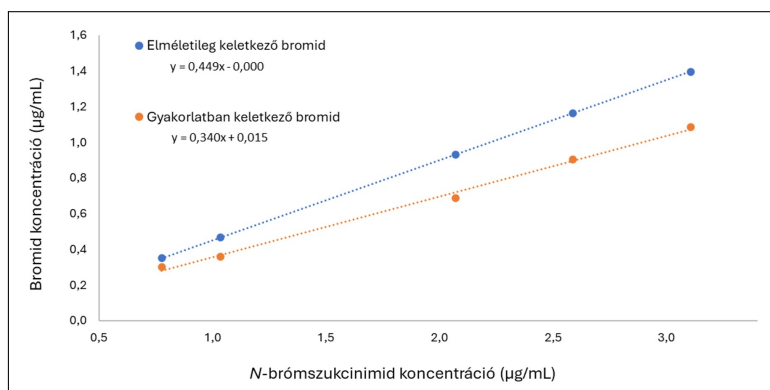
Mindkét hatóanyag (prasugrel, favipiravir) és az NBS is vízzel nem elegyedő szerves oldószerben oldódik. Az oldhatóságoknak megfelelően egy szerves-vizes, folyadék-folyadék extrakciós mintaelőkészítési eljárást fejlesztettem, mellyel megoldható egy lépésben a mátrix eliminációja és a hidrolízis is. Prasugrel hatóanyag esetében az általam választott szerves oldószer a kloro-

form volt, így az extrakciós mintaelőkészítést klorofom és egy lúgos oldószerkelegy (nátrium-tioszulfátos nátrium-hidroxid oldat) alkalmazásával végeztem, amely segítségével a keletkező bromid a felső fázisban található. Vizsgáltam a mintaelőkészítés (extrakció, hidrolízis) hatásfokát is, ennek megállapításához felvettem a bromidion kalibrációs görbét (3.31. ábra) kálium-bromid oldatok (0,34, 0,46, 0,69, 0,91, 1,14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bromid) segítségével.



3.31. ábra. Bromidion kalibrációs görbéje.

A kalibrációs egyenes egyenletével, valamint az *N*-brómszukcinimidből ténylegesen keletkező bromidion területeiből kiszámítottam a gyakorlatilag képződött mennyiségeket. A mért és elvi bromidion mennyiségek összehasonlítása látható a 3.32. ábrán.



3.32. ábra. Az elvi és gyakorlatilag keletkező bromid mennyiségek ábrázolása.

A kapott eredmények alapján látható, hogy az extrakcióval egybekötött hidrolízis hatásfoka közel 80%, ám kisebb koncentráció esetében ennél nagyobb is lehet.

A hatásfok javításának érdekében vizsgáltam az extrakció idejének hatását. A hat vizsgált extrakciós időnél (1, 5, 10, 15, 20, 25 perc) kapott eredmények alapján elmondható, hogy a rázás ideje nincs hatással az extrakció hatásfokára, így a hosszabb extrakciós idő nem ad nagyobb bromid csúcsterületet. Ennek értelmében elegendő akár az 1 perces rázási idő is.

Annak ellenére, hogy a mintaelőkészítés hatásfoka nem 100%, robusztusan reprodukálható a vizsgálatok során.

3.4.2. Oldatkészítések és mérési módszer prasugrel hatóanyag vizsgálata esetében

A prasugrel hatóanyag esetében a következő oldatokat készítettem.

- Vak oldat: 5 mL *oldószert* (60 mg NaOH és 39,5 mg Na₂S₂O₃/ 100 mL víz) és 5 mL kloroformot mértem be egy kb. 20 mL-es headspace mintatartóba és összeráztam. Miután két fázisra vált szét, a felső fázisból kivettem 1,0 mL-t és egy kb. 1,5 mL-es műanyag mintatartóba tettem.
- Referencia oldat: 5 mL *NBS oldatot* (2,5 µg/mL NBS kloroformban) és 5 mL *oldószert* mértem be egy kb. 20-mL-es headspace mintatartóba és összeráztam. Miután két fázisra vált szét, a felső fázisból kivettem 1,0 mL-t és egy kb. 1,5 mL-es műanyag mintatartóba tettem.
- QL oldat: 5 mL *NBS QL oldatot* (0,75 µg/mL NBS kloroformban) és 5 mL *oldószert* mértem be egy kb. 20 mL-es headspace mintatartóba és összeráztam. Miután két fázisra vált szét, a felső fázisból kivettem 1,0 mL-t és egy kb. 1,5 mL-es műanyag mintatartóba tettem.
- DL oldat: 5 mL *NBS DL oldatot* (0,225 µg/mL NBS kloroformban) és 5 mL *oldószert* mértem be egy kb. 20 mL-es headspace mintatartóba és összeráztam. Miután két fázisra vált szét, a felső fázisból kivettem 1,0 mL-t és egy kb. 1,5 mL-es műanyag mintatartóba tettem.
- Mintaoldat: Analitikai pontossággal bemértem 500 mg prasugrelt egy kb. 20 mL-es headspace mintatartóba majd 5 mL kloroformban feloldottam, majd 5 mL *oldószert* mértem hozzá és összeráztam. Miután két fázisra vált szét, a felső fázisból kivettem 1,0 mL-t és egy kb. 1,5 mL-es műanyag mintatartóba tettem.
- Adicionált minatoldat: Analitikai pontossággal bemértem 500 mg prasugrelt egy kb. 20 mL-es headspace mintatartóba majd 5 mL *NBS oldatban* (2,5 µg/mL NBS) feloldottam, majd 5 mL *oldószert* mértem hozzá és összeráztam. Miután két fázisra vált szét, a felső fázisból kivettem 1,0 mL-t és egy kb. 1,5 mL-es műanyag mintatartóba tettem.

Prasugrel hatóanyag esetében a végső ionkromatográfiás mérési módszer a 3.6. táblázatban látható.

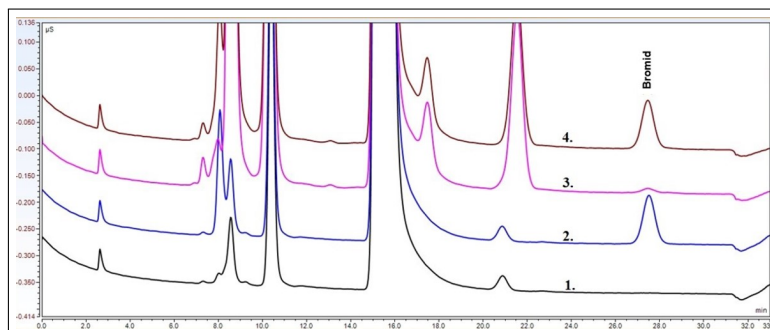
3.6. táblázat. Ionkromatográfias módszer prasugrel hatóanyag vizsgálata során.

Eluens	KOH		
	Idő [perc]	Eluens koncentráció [mM]	Szupresszor áramerőssége [mA]
Gradiens program	0	4,0	3,0
	30	4,0	3,0
	31	50,0	48,0
	35	50,0	48,0
	36	4,0	3,0
	40	4,0	3,0
Eluens áramlási sebssége	0,30 mL/perc		
Szupresszor	Recycle mode		
Előtét kolonna	IonPac AG23 (2 mm x 50 mm)		
Kolonna	IonPac AS23 (2 mm x 250 mm)		
Kolonna hőmérséklet	30 °C		
Mintatartó hőmérséklet	25 °C		
Injektált térfogat	5 µL		
Futási idő	40 perc		

3.4.3. Validálás prasugrel hatóanyagban található NBS vizsgálata esetében

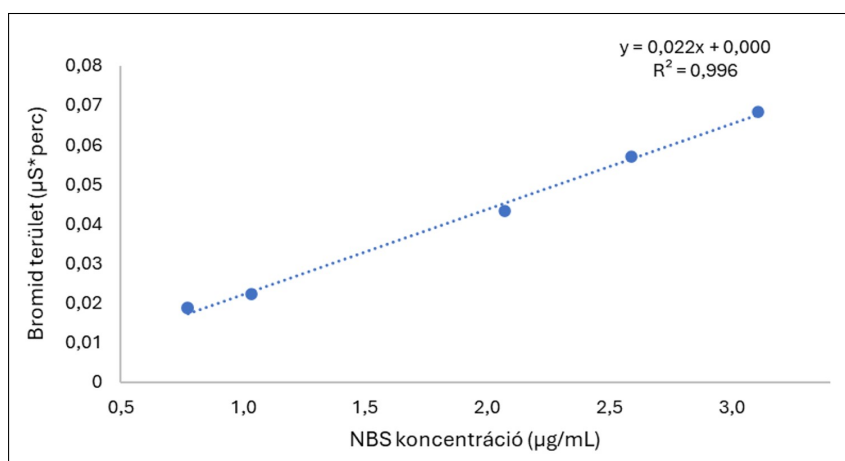
Prasugrel hatóanyag esetében a fejlesztett módszert limit szinten validáltam, több vizsgálatot kiegészítve. A limit validálás az ICH Q2 (R2) nemzetközi szabályozásoknak megfelelően történt [79], mely alapvetően a specifikusságot és detektálási határ meghatározását írja elő, de ezeken kívül egyéb vizsgálatokat is végeztem a módszer alkalmazhatóságának igazolására. A validálás vizsgálatai az alábbiak voltak, melyek számszerű eredményei a 3.7. táblázatban találhatóak az adott vizsgálatokhoz tartozó követelményekkel együtt:

- **Specifikusság/Szelektivitás:** A kapott kromatogramok (3.33. ábra) igazolják, hogy a fejlesztett módszerem specifikus/szelektív.



3.33. ábra. Specifikusság/Szelektivitás vizsgálat (1. Vak oldat, 2. Referencia oldat, 3. Mintaoldat, 4. Addicionált mintaoldat).

- DL, QL: A QL szint értéke nem lehet nagyobb, mint a riportálási határ (limit koncentráció 30%-a). A kapott eredmények esetében a DL koncentráció szinthez (2,2 ppm) tartozó jel nagysága nyolcszorosa, míg a QL koncentráció (7,2 ppm) nagyságához tartozó jel nagysága huszonhatszorosa a zaj nagyságának, valamint a QL értéke nagyobb, mint a limit 30%-a, így megfelelnek a követelményeknek.
- Linearitás: A méréseket öt koncentráció szinten végeztem az QL (7,2 ppm) és a névleges koncentráció 120%-a (30 ppm) között. A kalibrálási görbe a 3.34. ábrán látható. A vizsgálat során kapott determinációs együttható (r^2) értéke megfelel a követelményeknek, tehát lineáris kapcsolat van az alkalmazott NBS koncentráció és a keletkező (mért) bromid válaszjele között.



3.34. ábra. *N*-brómszukcinimid kalibrációs görbéje.

- Rendszerprecizitás: A rendszerprecizitás vizsgálatát két koncentráció szinten (limit, QL) végeztem el 6-6 párhuzamos injektálással. A kapott RSD% eredmények alapján megállapítható, hogy a fejlesztett módszer precíz.
- Pontosság (visszanyerés): A pontosság vizsgálata során a mintát a limit szintnek megfelelő (25 ppm) NBS-el addicionáltam és a kapott eredményekből meghatároztam a visszanyerést. Az eredmények azt mutatják, hogy limit szinten pontos a vizsgálati módszer.
- Stabilitás: Az elvégzett vizsgálat alapján mind a referencia oldat, mind az addicionált mintaoldat eltartható temperált mintatartóban legfeljebb 24 óráig.

3.7. táblázat. Prasugrel hatóanyagban található NBS szennyezés meghatározására fejlesztett módszer validálásának eredményei.

Vizsgálatok	Koncentráció	Eredmények	Követelmények
Specifikusság	25 ppm		
Retenciós idő ($t_{R,perc}$)		27,5	
Retenciós tényező ($k;t_0=2,6$ perc)		9,44	
Tányérszám		11578	≥ 1000
Szimmetria faktor (A_s)		1,0	$\leq 2,0$
Detektálási határ (S/N)	2,2 ppm	8	≥ 3
Mennyiségi meghatározási határ (S/N)	7,2 ppm	26	≥ 10
Linearitás (r^2)	7,2 ppm - 30 ppm	0,996	$\geq 0,990$
Rendszerprecizitás limit szinten	25 ppm		
Retenciós idő (RSD%)		0,05	$\leq 5,0\%$
Terület (RSD%)		2,6	$\leq 20,0\%$
Rendszerprecizitás QL szinten	7,2 ppm		
Retenciós idő (RSD%)		0,03	$\leq 5,0\%$
Terület (RSD%)		1,5	$\leq 20,0\%$
Visszanyerés	25 ppm		
Visszanyerés (%)		96,4	75,0%–125,0%
Stabilitás 24h	25 ppm		
Referencia oldat visszanyerés (%)		105,2	85,0%–115,0%
Addicionált minta visszanyerés (%)		104,2	85,0%–115,0%

Mint a táblázatban is látható, a kapott eredmények megfelelnek a követelményeknek, így a módszer egyértelműen alkalmazható prasugrel hatóanyagban esetlegesen található *N*-brómszukcinimid szennyezés meghatározására.

3.4.4. Favipiravir hatóanyagban található *N*-brómszukcinimid meghatározása

A fejlesztett mintaelőkészítési eljárás alkalmazhatóságához egy másik hatóanyag (favipiravir) vizsgálatát is elvégeztem, melynek szintézis útja szintén tartalmazza az *N*-brómszukcinimidet [90]. A favipiravir antivirális szer, melyet a COVID-19 vírus fertőzés esetén a tünetek enyhítésére használtak [91]. Favipiravir hatóanyag esetében a maximális koncentráció mennyisége 37,5 ppm. Maga a minta előkészítése eltér a prasugrel hatóanyagéhoz képest, mivel ebben az esetben a kloroform nem használható oldószerként. Az extrakció megtartásához a lúgos oldattal nem elegendő etil-acetát oldószert alkalmaztam. Az méréseim során használt oldatok készítése a továbbiakban látható.

Oldatkészítés

- Vak oldat: 1 mL *oldószert* (60 mg NaOH és 39,5 mg Na₂S₂O₃/ 100 mL víz) és 10 mL etil-acetátot mértem be egy kb. 20 mL-es headspace mintatartóba és összeráztam. Miután két fázisra vált szét, az alsó fázisból kivettem egy kb. 1,5 mL-es műanyag mintatartóba. 5 perces nitrogénes átbuborékolatás után tisztított vízzel a felére hígítottam egy kb. 0,7 mL-es műanyag mintatartóba.
- Limit oldat: 10 mL *NBS oldatot* (0,56 µg/mL NBS etil-acetátban) és 1 mL *oldószert* mértem be egy kb. 20 mL-es headspace mintatartóba és összeráztam. Miután két fázisra vált szét, az alsó fázisból kivettem egy kb. 1,5 mL-es műanyag mintatartóba. 5 perces nitrogénes átbuborékolatás után tisztított vízzel a felére hígítottam egy kb. 0,7 mL-es műanyag mintatartóba.
- QL oldat: 10 mL *NBS QL oldatot* (0,11 µg/mL NBS etil-acetátban) és 1 mL *oldószert* mértem be egy kb. 20 mL-es headspace mintatartóba és összeráztam. Miután két fázisra vált szét, az alsó fázisból kivettem egy kb. 1,5 mL-es műanyag mintatartóba. 5 perces nitrogénes átbuborékolatás után tisztított vízzel a felére hígítottam egy kb. 0,7 mL-es műanyag mintatartóba.
- Mintaoldat: Analitikai pontossággal bemértem 150 mg favipiravirt egy kb. 20 mL-es headspace mintatartóba és feloldottam 10 mL etil-acetátban majd 1 mL *oldószert* mértem hozzá és összeráztam. Miután két fázisra vált szét, az alsó fázisból kivettem egy kb. 1,5 mL-es műanyag mintatartóba. 5 perces nitrogénes átbuborékolatás után tisztított vízzel a felére hígítottam egy kb. 0,7 mL-es műanyag mintatartóba.
- Addicionált minatoldat: Analitikai pontossággal bemértem 150 mg favipiravirt egy kb. 20 mL-es headspace mintatartóba és feloldottam 10 mL *NBS oldatban* (0,56 µg/mL NBS etil-acetátban) majd 1 mL *oldószert* mértem hozzá és összeráztam. Miután két fázisra vált szét, az alsó fázisból kivettem egy kb. 1,5 mL-es műanyag mintatartóba. 5 perces nitrogénes átbuborékolatás után tisztított vízzel a felére hígítottam egy kb. 0,7 mL-es műanyag mintatartóba.

Az etil-acetát és a lúgos oldószerkeverék együttes alkalmazása következtében keletkező ecetsav, valamint a favipiravir hatóanyagban található egyéb anion szennyezés miatt az állófázis minőségének cseréjére volt szükség a megfelelő szelektivitás eléréséhez.

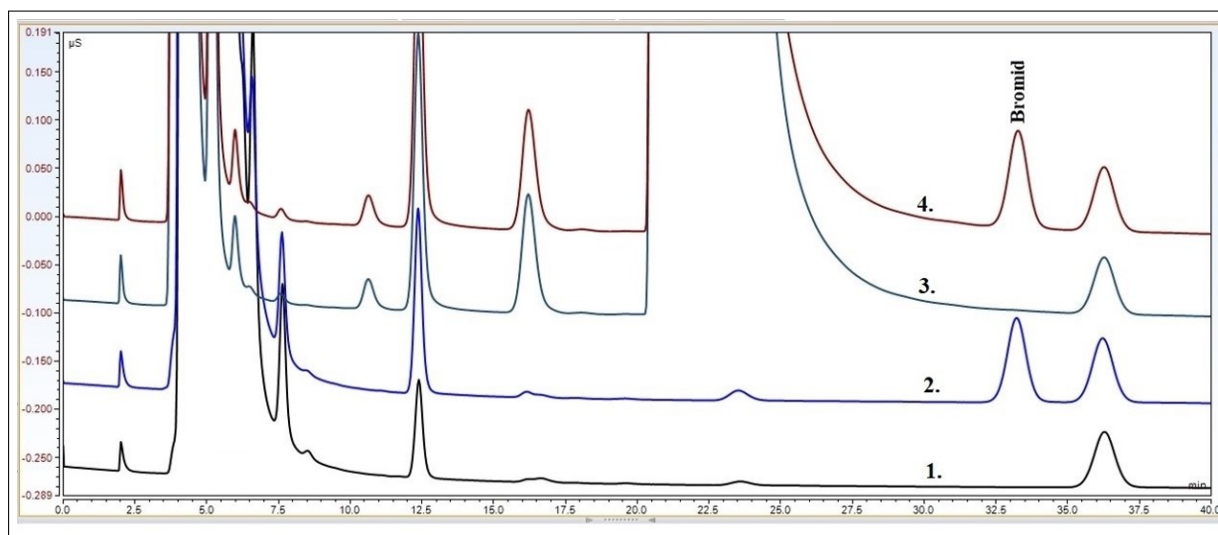
Mérési módszer

A 3.8. táblázat tartalmazza az ionkromatográfias mérési módszert.

3.8. táblázat. Ionkromatográfias módszer favipiravir hatóanyag vizsgálata során.

Eluens	KOH		
	Idő [perc]	Eluens koncentráció [mM]	Szupresszor áramerőssége [mA]
Gradiens program	0	2,0	2,0
	38	2,0	2,0
	40	50,0	48,0
	48	50,0	48,0
	50	2,0	2,0
	60	2,0	2,0
Eluens áramlási sebssége	0,40 mL/perc		
Szupresszor	Recycle mode		
Előtét kolonna	IonPac AG11HC (2 mm x 50 mm)		
Kolonna	IonPac AS11HC (2 mm x 250 mm)		
Kolonna hőmérséklet	23 °C		
Mintatartó hőmérséklet	20 °C		
Injektált térfogat	5 µL		
Futási idő	60 perc		

Ezen hatóanyag esetében nem készítettem validálást, de a kísérleti adatok alapján kiszámoltam a mennyiségi meghatározási határt és a limit szintű visszanyerést, valamint vizsgáltam az analitikai módszer specifikusságát (3.35. ábra).

**3.35. ábra.** Specifikusság/Szelektivitás vizsgálat: 1. Vak oldat, 2. Referencia oldat, 3. Minta-oldat, 4. Addicionált mintaoldat.

Mint a kapott kromatogramok mutatják a fejlesztett módszer favipiravir hatóanyag esetében is specifikus. A további vizsgálatok eredményei: a QL mennyisége 7,5 ppm, valamint a visszanyerés eredménye 114,7%.

A fent bemutatott fejlesztett módszerek eredményei egyértelműen bizonyítják, hogy a lúgos

hidrolízis segítségével *N*-brómszukcinimid meghatározása sikerrel véghez vihető, valamint az eltérő hatóanyagok esetében fejlesztett eltérő mintaelőkészítés egy lépésben megoldja a származékképzést és a mátrix eliminációját is néhány perc alatt.

4. Tézis. *Az N-brómszukcinimid (NBS) kis kimutatási határú meghatározása két egymástól eltérő hatóanyagban (prasugrel, favipiravir) ionkromatográfia segítségével sikeresen megvalósítható az NBS-ből hidrolízis során nátrium-tioszulfát jelenlétében felszabadított bromidionok vizsgálatán keresztül. Prasugrel hatóanyagban a módszer 25 ppm-es szinten is megbízhatóan alkalmazható folyadék-folyadék extrakciót követően, míg favipiravir esetében az NBS maximumán megengedhető 37,5 ppm-es koncentrációja pontosan mérhető etil-acetátos extrakcióval. Prasugrel hatóanyag esetén a módszer validálása igazolta annak specifikusságát, pontosságát, precizitását és linearitását a vizsgált koncentrációtartományban.*

4. Összefoglalás

A doktori munkám célja gyógyszerhatóanyagok és szennyezőinek retenciós viselkedésének ioncsere-kromatográfiás vizsgálata mellett olyan robusztus, precíz, pontos és reprodukálható módszerek kidolgozása volt, melyek segítik a gyógyszeranalitikai elemzéseket adott gyógyszerhatóanyagok/készítmények szennyezés profiljának felderítése során. Szerves hidrofil savak vizsgálatához a leoptimálisabb választás a kromatográfiás technikák közül az ioncsere-kromatográfia, mely megállapítás igazolására elvégeztem ecetsav közvetlen meghatározását egy adott hatóanyagban gázkromatográfiás (lángionizációs detektor) és ionkromatográfiás technikával. Mindkét módszert a nemzetközi elvárások szerint limit szinten validáltam kiegészítve számos vizsgálattal (rendszerprecizitás - limit szinten, ismételhetőség - addicionált mintákkal, pontosság - limit szinten, stabilitás). A két módszer elemzési idejét és a szükséges hatóanyag minta mennyiségét is összevetettem. A vizsgált paraméterek közül az ecetsav csúcs jellemzői (N , A_s) tekintetében elmondható, hogy a gázkromatográfia adott jobb tényérszám és szimmetria értékeket, de ez nagyrészt a technikák közötti különbségekből eredeztethető. A gyakorlati szempontból releváns összehasonlítási pontok (precizitás, pontosság, elemzési idő, mintaigény) esetében az ioncsere-kromatográfia adta a kedvezőbb eredményeket.

Gyógyszerkészítmények/hatóanyagok során genotoxikus szennyezők mennyiségi meghatározása elengedhetetlen feladat. A szintézis során alkalmazott reagensek közül a nátrium-azid vizsgálata így szükségszerű a gyártott hatóanyagban. Munkám során olyan módszert dolgoztam ki, mely alkalmas cilostazol hatóanyagban található nátrium-azid mennyiségének meghatározására 7,5 ppm-es koncentrációban. A fejlesztett módszert a nemzetközi előírásoknak megfelelően limit szinten validáltam. Az elvégzett vizsgálatok eredményei megfelelték az elvárt értékeknek. A validálás mellett vizsgáltam a nátrium-azid retenciós viselkedését a hőmérséklet hatására, valamint a kromatográfiás módszer hatékonyságát is. Az eredmények azt mutatják, hogy az azidion retenciója független az alkalmazott oszlop hőmérsékletétől, valamint a hatékonyság megtartásával az áramlási sebesség növelése lehetséges, így az elemzési idő csökkenthető.

További munkám során a trisz, nátrium- és lítiumionok retenciós idejének viselkedését vizsgáltam nagy koncentrációjú ammónium-hidroxid oldatban. Ezen hatásokat több változó mellett is megfigyeltem, melyek a következők voltak: az ammónium-hidroxid oldat koncentrációja,

az eluens koncentrációja, az alkalmazott oszlop hőmérséklete, valamint az injektált térfogat. A kapott eredményeim alapján a különböző változók helyes összehangolásával megadható egy optimális állapot, mely segítségével a kezdetben (vizes rendszerben) koeluálódó csúcspárok közötti felbontás elérheti a 1,5-es értéket, azaz alapvonal elválasztás lehetséges a trisz- és nátriumkation között. A vizsgálatok során tapasztalt jelenség az alkalmazott ammónium-hidroxid mátrixhatásának köszönhető, mely több hatás nettó eredményeként írható le. A hatások, melyek a megfigyelt jelenséget okozták a következők: az eluens (metánszulfonsav) gyengülése a beinjektált minta magas pH-jának hatására, a trisz ionizációjának változása a pH-val, önelúciós hatás, a mátrix (ammónium-hidroxid) pufferkapacitása, valamint a gyenge kationcserélő állófázis kapacitásának pH függése. A kísérletek során kihasznált jelenség segítségével megoldható olyan elválasztás, mely alapesetben nem kivitelezhető egy IonPac CS16-os állófázison. Gyakorlatban ez olyan előnnyel járhat, hogy az adott vizsgáló laboratóriumban nem szükséges egy vagy maximum két kationcserélő oszlopnál többet tartani, melyek segítségével vegyületek széles köre meghatározható.

Az ioncsere-kromatográfiás elemzések számos esetben megoldást nyújthatnak olyan vegyületek vizsgálatára is melyek nem, vagy nehezen (pl.: extrém körülmények, bonyolult mintaelőkészítés) határozhatóak meg más technikával. Bizonyos esetekben egy tömegspektrometriás elemzés alternatívájaként is használható. Az *N*-brómszukcinimid meghatározása is példa egy ilyen vizsgálatra. Prasugrel hatóanyagban esetlegesen található *N*-brómszukcinimid vizsgálatát végeztem el. Olyan mintaelőkészítési eljárást fejlesztettem, mely segítségével néhány perc alatt bromidion képezhető a hatóanyag eliminációjával. Az ionkromatográfiás készülékkel a bromidion specifikusan, precízen és pontosan mérhető limit szinten. A prasugrel hatóanyagtól kémiaiilag eltérő egyéb hatóanyag (favipiravir) esetében is alkalmaztam a mintaelőkészítésnél használt lúgos oldószerkeveréket *N*-brómszukcinimid meghatározásához. Az eredményeimnek megfelelően favipiravir hatóanyag esetében is használható a folyadék-folyadék extrakció a nátrium-tioszulfátos/nátrium-hidroxid oldattal.

A munkám során elvégzett vizsgálatok igazolják, hogy az ionkromatográfiának, azon belül, az ioncsereinek jelentős helye van gyógyszerhatóanyagok/készítmények vizsgálata során, így a különböző kromatográfiás technikák egymást kiegészítve adnak teljes képet (hatóanyagtartalom, szennyezésprofil) a gyártott termékről.

Irodalomjegyzék

- [1] P. György, S. Janisz, *Analitkai kémia I.*, Műegyetemi Kiadó, 2003.
- [2] P. R. Haddad, P. E. Jackson, *Ion chromatography*, Elsevier, 1990.
- [3] G. Guiochon, A. Felinger, D. G. Shirazi, *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*, Elsevier, 2006.
- [4] M. C. Ringo, C. E. Evans, Pressure-dependent retention and selectivity in reversed-phase liquid chromatographic separations using β -cyclodextrin stationary phases, *Analytical Chemistry* 69 (4) (1997) 643–649. doi:10.1021/ac960818w.
- [5] C. E. Evans, J. A. Davis, Effect of pressure-induced ionization, partitioning, and complexation on solute retention in reversed-phase liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta* 397 (1) (1999) 163–172. doi:https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00401-8.
- [6] V. L. McGuffin, S.-H. Chen, Theoretical and experimental studies of the effect of pressure on solute retention in liquid chromatography, *Analytical Chemistry* 69 (5) (1997) 930–943, PMID: 21639230. doi:10.1021/ac960589d.
- [7] M. Fallas, U. Neue, M. Hadley, D. McCalley, Investigation of the effect of pressure on retention of small molecules using reversed-phase ultra-high-pressure liquid chromatography, *Journal of chromatography. A* 1209 (2008) 195–205. doi:10.1016/j.chroma.2008.09.021.
- [8] M. M. Fallas, U. D. Neue, M. R. Hadley, D. V. McCalley, Further investigations of the effect of pressure on retention in ultra-high-pressure liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1217 (3) (2010) 276–284. doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.041.
- [9] A. Felinger, B. Boros, R. Ohmacht, Effect of pressure on retention factors in hplc using a non-porous stationary phase. *chromatographia*, *Chromatographia* 56 (1) (2002) S61–S64. doi:https://doi.org/10.1007/BF02494114.

- [10] A. J. P. Martin, R. L. M. Synge, A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins, *Biochem. J.* 35 (12) (1941) 1358–1368. doi:10.1042/bj0351358.
- [11] K. Tibor, T. Kornél, *Elválasztászechnikai módszerek elmélete és gyakorlata*, Akadémiai Kiadó, 2017.
- [12] J. van Deemter, F. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chemical Engineering Science* 5 (6) (1956) 271–289. doi:https://doi.org/10.1016/0009-2509(56)80003-1.
- [13] J. Weiss, *Handbook of ion chromatography: Fourth, completely revised and enlarged edition*, 2016. doi:10.1002/9783527651610.
- [14] U. P. (USP), <621>chromatography, <https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/gen-chapter/harmonization-november-2021-m99380.pdf> (December 1, 2022).
- [15] J. Fekete, R. Kormany, S. Fekete, *Modern folyadékkromatográfia*, Dunakeszi: KromKorm Kft., 2017.
- [16] H. Small, T. S. Stevens, W. C. Bauman, Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection, *Analytical Chemistry* 47 (11) (1975) 1801–1809.
- [17] H. Small, *Ion Chromatography*, Springer US, Boston, MA, 1989. doi:10.1007/978-1-4899-2542-8_2.
- [18] T. B. Hoover, Multiple eluent and ph effects on ion chromatography of phosphate and arsenate, *Separation Science and Technology* 17 (2) (1982) 295–305. doi:10.1080/01496398208068540.
- [19] D. R. Jenke, G. K. Pagenkopf, Optimization of anion separation by nonsuppressed ion chromatography, *Analytical Chemistry* 56 (1) (1984) 85–88. doi:10.1021/ac00265a024.
- [20] M. Maruo, N. Hirayama, T. Kuwamoto, Ion chromatographic elution behaviour and prediction of the retention of inorganic monovalent anions using a phosphate eluent, *Journal of Chromatography A* 481 (1989) 315–322. doi:https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)96774-3.

- [21] D. R. Jenke, Prediction of retention characteristics of multiprotic anions in ion chromatography, *Analytical Chemistry* 66 (24) (1994) 4466–4470. doi:10.1021/ac00096a012.
- [22] P. Hajos, O. Horvath, V. Denke, Prediction of retention for halide anions and oxoanions in suppressed ion chromatography using multiple species eluent, *Analytical Chemistry* 67 (2) (1995) 434–441. doi:10.1021/ac00098a032.
- [23] G. Révész, P. Hajós, H. Csiszár, Mixed-mode liquid chromatography of carboxylic acids and inorganic anions on a latex-based pellicular stationary phase, *Journal of Chromatography A* 753 (2) (1996) 253–260. doi:https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00644-9.
- [24] K. Horváth, P. Hajós, Retention profiles and mechanism of anion separation on latex-based pellicular ion exchanger in ion chromatography, *Journal of Chromatography A* 1104 (1) (2006) 75–81. doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.064.
- [25] M. C. Bruzzoniti, P. Hajos, K. Horvath, C. Sarzanini, Ion chromatographic retention mechanism of inorganic anions on macrocycle based stationary phase., *Acta Chimica Slovenica* 54 (1) (2007).
- [26] D. Gjerde, G. Schmuckler, J. Fritz, Anion chromatography with low-conductivity eluents. ii., *Journal of Chromatography A* 187 (1) (1980) 35–45. doi:https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)87871-1.
- [27] P. Haddad, C. Cowie, Computer-assisted optimization of eluent concentration and ph in ion chromatography, *Journal of Chromatography A* 303 (1984) 321–330. doi:https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)96088-1.
- [28] N. Avdalovic, Y. Liu, Chapter 12 - Capillary ion chromatography, Vol. 13 of *Separation Science and Technology*, Academic Press, 2021, pp. 303–322. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813075-9.00015-7.
- [29] P. E. Jackson, C. A. Pohl, Advances in stationary phase development in suppressed ion chromatography, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 16 (7) (1997) 393–400. doi:https://doi.org/10.1016/S0165-9936(97)00050-2.
- [30] S. C. Moldoveanu, V. David, Chapter 6 - stationary phases and their performance, in: S. C. Moldoveanu, V. David (Eds.), *Essentials in Modern HPLC Separations*, Elsevier, 2013, pp. 191–362. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385013-3.00006-9.

- [31] R. Hu, Y. Weng, L. Lai, J. Chen, Q. Lin, Electrochemically generated multifunctional suppressor for ion chromatography, *Chromatographia* 57 (2003) 471–474.
- [32] T. F. S. Inc., Thermo scientific dionex eluent suppressors for ion chromatography-product specification, <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/PS-70690-IC-Eluent-Suppressors-PS70690-EN.pdf> (2017).
- [33] W. Buchberger, Detection techniques in ion chromatography of inorganic ions, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 20 (6) (2001) 296–303. doi:[https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(01\)00068-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(01)00068-1).
- [34] L. Terborg, S. Nowak, S. Passerini, M. Winter, U. Karst, P. R. Haddad, P. N. Nesterenko, Ion chromatographic determination of hydrolysis products of hexafluorophosphate salts in aqueous solution, *Analytica Chimica Acta* 714 (2012) 121–126. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.056>.
- [35] Y. Lee, Carbohydrate analyses with high-performance anion-exchange chromatography, *Journal of Chromatography A* 720 (1) (1996) 137–149. doi:[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00222-7](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00222-7).
- [36] L. Bhattacharyya, J. Rohrer, Applications of Ion Chromatography for Pharmaceutical and Biological Products, 2012. doi:[10.1002/9781118147009](https://doi.org/10.1002/9781118147009).
- [37] O. DrugBank, Potassium chloride, <https://go.drugbank.com/drugs/DB00761> (June 13, 2005).
- [38] V. P. Hanko, J. S. Rohrer, Determination of tobramycin and impurities using high-performance anion exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40 (4) (2006) 1006–1012. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.08.009>.
- [39] V. Hanko, J. Rohrer, Determination of neomycin sulfate and impurities using high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43 (1) (2007) 131–141. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.06.024>.
- [40] V. P. Hanko, J. S. Rohrer, Determination of streptomycin, dihydrostreptomycin and impurities using anion-exchange chromatography with electrochemical detection, *LC GC Europe* 20 (03 2007).

- [41] B. De Borba, V. Hanko, J. Rohrer, Determination of paromomycin in a bulk pharmaceutical formulation using HPAE-IPAD, LC GC Europe (03 2008).
- [42] R. D. Rocklin, C. A. Pohl, Determination of carbohydrates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection, *Journal of Liquid Chromatography* 6 (9) (1983) 1577–1590. doi:10.1080/01483918308064876.
- [43] T. Scientific-Dionex, Determination of bethanechol by ion chromatography, <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-148-IC-Bethanechol-LPN1510-EN.pdf>, Application Note 148 (2016).
- [44] R. Kornfeld, V. Hanko, J. Rohrer, Rapid and rugged determination of glucosamine in dietary supplements using HPAE-PAD, *Lc Gc North America* (2008) 62–62.
- [45] F. Abballe, M. Lombardi, I. Maccone, G. Palazzo, A. Severoni, S. Travaini, A. Venturini, New method for low molecular weight heparin quantification in tablets by suppressed conductivity detection and cryptand column, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48 (2) (2008) 467–471, rDPA 2007. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.04.009>.
- [46] E. W. Tsai, S. D. Chamberlin, R. J. Forsyth, C. Bell, D. P. Ip, M. A. Brooks, Determination of bisphosphonate drugs in pharmaceutical dosage formulations by ion chromatography with indirect UV detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 12 (8) (1994) 983–991. doi:[https://doi.org/10.1016/0731-7085\(94\)00047-6](https://doi.org/10.1016/0731-7085(94)00047-6).
- [47] L. A. Kaine, D. T. Heitkemper, D. S. Jackson, K. A. Wolnik, Use of ion chromatography for the verification of drug authenticity, *Journal of Chromatography A* 671 (1) (1994) 303–308, *International Ion Chromatography Symposium 1993*. doi:[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)80254-8](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)80254-8).
- [48] M.-J. Rocheleau, Analytical methods for determination of counter-ions in pharmaceutical salts, *Current Pharmaceutical Analysis* 4 (2008) 25–32. doi:10.2174/157341208783497560.
- [49] T. Scientific-Dionex, Application Note 190 Determination of sulfate counter ion and anionic impurities in aminoglycoside drug substances by ion chromatography with suppressed conductivity detection (2007).
URL <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:53313432>
- [50] J. Waterworth, Validation of ion chromatographic methods for the trace analysis of ions in pharmacopoeial grades of water, *Journal of Chromatography A* 770 (1) (1997) 99–104,

- international Ion Chromatography Symposium 1996 Reading. doi:[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00981-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00981-8).
- [51] V. Parekh, V. Rathod, A. Pandit, 2.10 - substrate hydrolysis: Methods, mechanism, and industrial applications of substrate hydrolysis, in: M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, second edition Edition, Academic Press, Burlington, 2011, pp. 103–118. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00094-5>.
- [52] T. Yuan, D. Merai, M. J. Gunsch, R. Peters, S. Lohani, F. Bernardoni, M. A. Zompa, I. H. Ahmad, E. L. Regalado, C. A. Pohl, Universal ion chromatography method for anions in active pharmaceutical ingredients enabled by computer-assisted separation modeling, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 241 (2024) 115923. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115923>.
- [53] G. Taylor, Determination of impurities in clodronic acid by anion-exchange chromatography, *Journal of Chromatography A* 770 (1) (1997) 261–271, international Ion Chromatography Symposium 1996 Reading. doi:[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00149-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00149-0).
- [54] S. A. Cassidy, C. W. Demarest, P. B. Wright, J. B. Zimmerman, Development and application of a universal method for quantitation of anionic constituents in active pharmaceutical ingredients during early development using suppressed conductivity ion chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 34 (2) (2004) 255–264. doi:[https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00522-3](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00522-3).
- [55] G. Zachariadis, A. Lyratzi, J. Stratis, Ion chromatographic method for the determination of cations of group ia and iia in water samples, pharmaceuticals and energy drinks by non-suppressed conductometric detection, *Central European Journal of Chemistry* 9 (2011) 941–947. doi:[10.2478/s11532-011-0077-8](https://doi.org/10.2478/s11532-011-0077-8).
- [56] J. Hu, T. Christison, J. Rohrer, Determination of dimethylamine and nitrite in pharmaceuticals by ion chromatography to assess the likelihood of nitrosamine formation, *Heliyon* 7 (2) (2021) e06179. doi:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06179>.
- [57] R. Boetzel, J. Schlingemann, S. Hickert, C. Korn, G. Kocks, B. Luck, G. Blom, M. Harrison, M. François, L. Allain, Y. Wu, Y. Bousraf, A nitrite excipient database: A useful tool to support N-nitrosamine risk assessments for drug products, *Journal of Pharmaceutical Sciences* (04 2022). doi:[10.1016/j.xphs.2022.04.016](https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.04.016).

- [58] K. Zhu, M. Kerry, B. Serr, M. Mintert, Parts per billion of nitrite in microcrystalline cellulose by ion chromatography mass spectrometry with isotope labeled internal standard, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 235 (2023) 115648. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115648>.
- [59] S. A. Cassidy, C. W. Demarest, P. B. Wright, J. B. Zimmerman, Development and application of a universal method for quantitation of anionic constituents in active pharmaceutical ingredients during early development using suppressed conductivity ion chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 34 (2) (2004) 255–264. doi:[https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00522-3](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00522-3).
- [60] B. DeBorba, J. Rohrer, L. Bhattacharyya, Development and validation of an assay for citric acid/citrate and phosphate in pharmaceutical dosage forms using ion chromatography with suppressed conductivity detection, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 36 (2004) 517–24. doi:[10.1016/j.jpba.2004.07.003](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.07.003).
- [61] P. Annable, Determination of alkyl sulfonic acids in pharmaceuticals by ion chromatography, *Journal of Chromatography A* 724 (1) (1996) 199–206. doi:[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00923-X](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00923-X).
- [62] L. A. Kaine, D. T. Heitkemper, D. S. Jackson, K. A. Wolnik, Use of ion chromatography for the verification of drug authenticity, *Journal of Chromatography A* 671 (1) (1994) 303–308, *international Ion Chromatography Symposium 1993*. doi:[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)80254-8](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)80254-8).
- [63] W. Corp., High sensitivity analysis of potential mutagenic boronic acids using Xevo™ TQ absolute tandem quadrupole mass spectrometer with an ACQUITY™ Premier System, <https://www.waters.com/content/dam/waters/en/app-notes/2022/720007562/720007562-en.pdf> (March, 2022).
- [64] N. K. Jagota, A. J. Chetram, J. B. Nair, Ion chromatography of amylamine and tert-butylamine in pharmaceuticals, *Journal of Chromatography A* 739 (1) (1996) 343–349, *international Ion Chromatography Symposium 1995*. doi:[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(96\)00046-5](https://doi.org/10.1016/0021-9673(96)00046-5).
- [65] B. De Borba, J. Rohrer, Determination of N-Methylpyrrolidine in cefepime using reagent-free ion chromatography, *LC GC Europe* 21 (12 2008).
- [66] Z. Lewis, B. A. Jackson, A. Crampton, A. D. Ray, S. W. Holman, Towards a generic method for ion chromatography/mass spectrometry of low-molecular-weight amines in pharmaceutical drug discovery and development, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 34 (S4) (2020) e8680. doi:<https://doi.org/10.1002/rcm.8680>.

- [67] K. Karthikeyan, P. Shanmugasundaram, R. Ramadhas, K. C. Pillai, Development and validation of rapid ion-chromatographic method with conductivity detection for trace level determination of allylamine in sevelamer drug substances, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 54 (1) (2011) 203–207. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.07.017>.
- [68] N. Subramanian, M. Parthasarathi, R. Jeevan, G. Radhakrishnan, Ion chromatographic determination of residual phase transfer catalyst in active pharmaceutical ingredient, *Journal of chromatographic science* 47 (2009) 540–4. doi:[10.1093/chromsci/47.7.540](https://doi.org/10.1093/chromsci/47.7.540).
- [69] L. Terborg, S. Nowak, S. Passerini, M. Winter, U. Karst, P. R. Haddad, P. N. Nesterenko, Ion chromatographic determination of hydrolysis products of hexafluorophosphate salts in aqueous solution, *Analytica Chimica Acta* 714 (2012) 121–126. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.056>.
- [70] J. Welch, Organic chemistry, synthesis, in: R. A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition)*, third edition Edition, Academic Press, New York, 2003, pp. 497–515. doi:<https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00542-1>.
- [71] V. Theodorou, K. Skobridis, A. G. Tzakos, V. Ragoussis, A simple method for the alkaline hydrolysis of esters, *Tetrahedron Letters* 48 (46) (2007) 8230–8233. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.09.074>.
- [72] P. Lignier, J. Estager, N. Kardos, L. Gravouil, J. Gazza, E. Naffrechoux, M. Draye, Swift and efficient sono-hydrolysis of nitriles to carboxylic acids under basic condition: Role of the oxide anion radical in the hydrolysis mechanism, *Ultrasonics Sonochemistry* 18 (1) (2011) 28–31. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.04.006>.
- [73] U. S. E. P. Agency, Method 8260c Volatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), <https://19january2017snapshot.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8260c.pdf> (August, 2006).
- [74] B. Páll, Z. Gyenge, R. Kormány, K. Horváth, Determination of genotoxic azide impurity in cilostazol API by ion chromatography with matrix elimination, *Separations* 8 (10) (2021). doi:[10.3390/separations8100162](https://doi.org/10.3390/separations8100162).

- [75] A. Kleemann, *Cardiovascular Drugs*, John Wiley & Sons, Ltd, 2008. doi:https://doi.org/10.1002/14356007.a05_289.pub2.
- [76] E. M. Agency, European medicines agency recommends restricting use of cilostazol-containing medicines—Article-31 referral, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/cilostazol-containing-medicines> (September 11, 2013).
- [77] I. Guideline, ICH Guidance for Industry M7(R2), Assasment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk, in: International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH): Geneva, 2023.
- [78] N. C. for Biotechnology Information, Pubchem compound summary for CID 33557, Sodium azide, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-azide> (Accessed 15 November, 2024.).
- [79] I. Guideline, ICH Guidance for Industry Q2(R2), validation of analytical procedures: Text and methodology, in: International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH): Geneva, 2023.
- [80] R. Kallet, R. Jasmer, J. M. Luce, L. H. Lin, J. D. Marks, The treatment of acidosis in acute lung injury with tris-hydroxymethyl aminomethane (THAM), *American journal of respiratory and critical care medicine* 161 (2000) 1149–53. doi:10.1164/ajrccm.161.4.9906031.
- [81] B. Páll, R. Kormány, K. Horváth, Utilization of matrix effect for enhancing resolution in cation exchange chromatography, *Molecules* 29 (15) (2024). doi:10.3390/molecules29153637.
- [82] P. Hajós, K. Horváth, Equilibrium-based approach for prediction of matrix-related interferences in anion chromatography, *Journal of Chromatography A* 1198-1199 (2008) 101–106. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.011>.
- [83] J. Isac-García, J. A. Dobado, F. G. Calvo-Flores, H. Martínez-García, Chapter 11 - microscale experiments, in: J. Isac-García, J. A. Dobado, F. G. Calvo-Flores, H. Martínez-García (Eds.), *Experimental Organic Chemistry*, Academic Press, 2016, pp. 371–408. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803893-2.50011-5>.
- [84] R. Filler, Oxidations and dehydrogenations with N-bromosuccinimide and related N-haloimides, *Chemical Reviews* 63 (1) (1963) 21–43. doi:10.1021/cr60221a002.

- [85] Z. Wang, *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, 3 Volume Set, Wiley & Sons, 2009.
- [86] J. du Toit, N. Casey, Iodine as an alleviator of bromine toxicity in thyroid, liver and kidney of broiler chickens, *Livestock Science* 144 (3) (2012) 269–274. doi:10.1016/j.livsci.2011.12.011.
- [87] B. Páll, I. Kapui, R. Kormány, K. Horváth, Development of analytical methods for the determination of N-bromosuccinimide in different active pharmaceutical ingredients by high-performance ion chromatography with suppressed conductivity detection, *Separations* 10 (1) (2023). doi:10.3390/separations10010015.
- [88] F. Bonhomme, P. Fontana, J.-L. Reny, How to manage prasugrel and ticagrelor in daily practice, *European Journal of Internal Medicine* 25 (3) (2014) 213–220. doi:10.1016/j.ejim.2014.01.016.
- [89] S. Joshi, J. Parkar, A. Ansari, A. Vora, D. Talwar, M. Tiwaskar, S. Patil, H. Barkate, Role of favipiravir in the treatment of COVID-19, *International Journal of Infectious Diseases* 102 (2021) 501–508. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.069.
- [90] Q. Guo, M. Xu, S. Guo, F. Zhu, Y. Xie, J. Shen, The complete synthesis of favipiravir from 2-aminopyrazine, *Chemical Papers* 73 (5) (2019) 1043–1051. doi:10.1007/s11696-018-0654-9.
- [91] T. Manabe, D. Kambayashi, H. Akatsu, K. Kudo, Favipiravir for the treatment of patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis, *BMC Infectious Diseases* 21 (1) (2021). doi:10.1186/s12879-021-06164-x.

4. Tézispontok

1. Adott hatóanyagban található ecetsav mennyiségének közvetlen meghatározására az ionkromatográfia kedvezőbb a lángionizációs detektort alkalmazó gázkromatográfiánál. Az ionkromatográfias technika segítségével hatóanyagokban található ecetsav szennyezés kisebb kimutatási határral meghatározható kevesebb hatóanyag mennyiségből. Az alkalmazott ionkromatográfias vizsgálati paraméterek függvényében jelentősen kedvezőbb relatív szórás értékek (rendszerprecizitás esetében ötször, míg ismételhetőség esetében másfélszer kisebb eredmények) érhetőek el, továbbá legalább 30%-al csökkenthető az analízis ideje, 10%-al jobb visszanyerés mellett ötször kevesebb mennyiségű hatóanyagból.
2. Cilostazol hatóanyag gyártása során alkalmazott nátrium-azid mennyisége meghatározható 7,50 ppm-es koncentrációban ionkromatográfias módszerrel, folyadék-folyadék extrakciós mintaelőkészítés alkalmazásával. Az azidion és az eluens hidroxid-ionjainak ioncsere folyamatai során meghatározott entalpiaváltozások különbsége elhanyagolható ($<1\text{kJ/mol}$), mely eredményeképpen az azidion retenciója független a hőmérséklettől. A nemzetközi előírásoknak megfelelően limit szinten validált módszer eredményei alapján, a vizsgálat specifikus, robusztus, valamint limit szinten precíz és pontos.
3. Kationcserés ionkromatográfia esetében a mátrixhatások figyelembe vehetőek a módszerfejlesztés során a mátrixkomponens előtt, el nem váló szerves és szervetlen kationok megfelelő felbontása érdekében nagy kapacitású gyenge kationcserélő esetében. Adott állófázison (IonPac CS16) az ammónium-kation előtt koeluálódó szerves (trisz) és szervetlen (nátrium) kationok megfelelő elválasztása 1,25%-os ammónium-hidroxid mátrix alkalmazásával alapvonalon elérhető szobahőmérsékleten (25°C). A két csúcs közötti felbontás növekedése az ammónium-hidroxid mátrixhatásainak összetett mechanizmusából ered, amely magában foglalja az eluens lúgosodását, a mátrix pufferkapacitását, a trisz-kation ionizációs állapotának változását, az önelúciót, valamint az alkalmazott oszlop kationcserélő kapacitásának növekedését magas $p\text{H}$ -n.

4. Az *N*-brómszukcinimid (NBS) kis kimutatási határú meghatározása két egymástól eltérő hatóanyagban (prasugrel, favipiravir) ionkromatográfia segítségével sikeresen megvalósítható az NBS-ből hidrolízis során nátrium-tioszulfát jelenlétében felszabadított bromidionok vizsgálatán keresztül. Prasugrel hatóanyagban a módszer 25 ppm-es szinten is megbízhatóan alkalmazható folyadék-folyadék extrakciót követően, míg favipiravir esetében az NBS maximálisan megengedhető 37,5 ppm-es koncentrációja pontosan mérhető etil-acetátos extrakcióval. Prasugrel hatóanyag esetén a módszer validálása igazolta annak specifikusságát, pontosságát, precizitását és linearitását a vizsgált koncentrációterományban.

4. Theses

- I. Ion chromatography is preferable to gas chromatography using a flame ionisation detector (FID) for the direct determination of acetic acid in an active pharmaceutical ingredient (API). The ion chromatography technique allows the determination of acetic acid contamination in the API with a lower limit of detection from less sample amount. Depending on the applied ion chromatographic analytical parameters, significantly better relative standard deviation values (five times lower for system precision and one and a half times lower for repeatability) can be achieved, and the analysis time can be reduced by at least 30% with 10% better recovery from 50 times less API.
- II. The amount of sodium azide used in the manufacture of the cilostazol API can be determined at a concentration of 7,50 ppm by ion chromatography using liquid-liquid extraction sample preparation. The difference in enthalpy changes determined during the ion exchange processes between the azide ion and the hydroxide ions of the eluent is negligible ($<1\text{kJ/mol}$), resulting in a temperature-independent retention behavior of the azide ion. The results of the method, validated at limit level according to international standards, show that the analysing method is specific, robust, and precise and accurate at limit level.
- III. In case of cation-exchange ion chromatography, matrix effects can be taken into account in method development for high-capacity weak cation exchangers to ensure adequate resolution of organic and inorganic cations that do not separate before the matrix component. On a given stationary phase (IonPac CS16), baseline separation of organic (tris) and inorganic (sodium) cations coeluting before the ammonium cation is achieved by using a 1.25% ammonium hydroxide matrix at room temperature (25°C). The increase in resolution between the two peaks results from a complex mechanism of matrix effects of ammonium hydroxide, which includes alkalization of the eluent, buffer capacity of the matrix, change in the ionization state of the tris-cation, self-elution, and increase in the cation exchange capacity of the column used at high $p\text{H}$.
- IV. The low limit of detection of *N*-bromosuccinimide (NBS) in two different APIs (prasugrel, favipiravir) can be successfully achieved by ion chromatography through the analysis

of bromide ions released from NBS during hydrolysis in the presence of sodium thiosulfate. For the Prasugrel API, the method can be reliably applied at the 25 ppm level after liquid-liquid extraction, while for favipiravir API the maximum allowable concentration of 37,5 ppm of NBS can be accurately measured by ethyl acetate extraction. For the Prasugrel, validation of the method demonstrated its specificity, accuracy, precision and linearity over the concentration range investigated.

4. A szerző tudományos munkássága

Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó publikációk

1. Páll B, Gyenge Z, Kormány R, Horváth K. Determination of Genotoxic Azide Impurity in Cilostazol API by Ion Chromatography with Matrix Elimination. *Separations*. 2021; 8(10):162. <https://doi.org/10.3390/separations8100162>
2. Páll B, Kapui I, Kormány R, Horváth K. Development of Analytical Methods for the Determination of N-Bromosuccinimide in Different Active Pharmaceutical Ingredients by High-Performance Ion Chromatography with Suppressed Conductivity Detection. *Separations*. 2023; 10(1):15. <https://doi.org/10.3390/separations10010015>
3. Páll, B., Kormány, R., Horváth, K. Az ionkromatográfia alkalmazhatóságának lehetőségei a gyógyszeranalitikában [Potential applications of ion chromatography in drug analysis]. *Scientia et Securitas* 3, 3, 227-233, Available From: AKJournals <https://doi.org/10.1556/112.2022.00110>
4. Páll B, Kormány R, Horváth K. Utilization of Matrix Effect for Enhancing Resolution in Cation Exchange Chromatography. *Molecules*. 2024; 29(15):3637. <https://doi.org/10.3390/molecules29153637>

Az értekezés témájához kapcsolódó konferencia előadások és posztterek

Nemzetközi konferencián bemutatott előadások és posztterek

1. **Páll B.**, Kapui I., Kormány R., Horváth K.: Development of an Analytical Method for the Determination of N-bromosuccinimide in Two Different Active Pharmaceutical Ingredients by High-performance Ion Chromatography with Suppressed Conductivity Detection, *33rd International Symposium on Chromatography – ISC 2022*, 2022. szeptember.18-22., Budapest. <https://isc2022.hu/programme/>

2. **Páll B.**, Kormány R., Horváth K.: Matrix effects in cation exchange chromatography, *13th Balaton Symposium*, 2023.09.04-06., Siófok. <https://2023.balatonsymposium.hu/>
3. **Páll B.**, Gyenge Zs., Kormány R., Horváth K.: Determination of Genotoxic Azide Impurity in Cilostazol API by Ion Chromatography with Matrix Elimination, *CONGRESSUS PHARMACEUTICUS HUNGARICUS XVII. AND EUFEPS ANNUAL MEETING 2024*, 2024.05.23-25., Debrecen. https://clubservice-event.hu/pdf-egyeb/abstracts_CPH2024.pdf

Hazai konferencián bemutatott előadások és poszterek

1. **Páll B.**, Gyenge Zs., Kormány R., Horváth K.: Genotoxikus azid szennyezés meghatározása cilostazol hatóanyagból mátrix eliminációval, *Műszaki Kémiai Nap 2021 online konferencia*, 2021. április 21., Veszprém. <https://mkn.mik.uni-pannon.hu/index.php/hu/program-2021.html>
2. **Páll B.**, Gyenge Zs., Kormány R., Horváth K.: Genotoxikus azid szennyezés meghatározása cilostazol hatóanyagból mátrix eliminációval, *METT25 jubileumi konferencia*, 2021.10.18-20, Egerszalók. <https://mett25.hu/tudomanyos-program/>
3. **Páll B.**, Kapui I., Kormány R., Horváth K.: Gyógyszerhatóanyagban található N-brómszukcinimid szennyezés meghatározása nagyhatékonyságú ionkromatográfiás módszerrel, *Műszaki Kémiai Napok 2023*, 2023. április 18-20., Veszprém. <https://mett25.hu/tudomanyos-program/>
4. **Páll B.**, Kormány R., Horváth K.: Gyógyszerhatóanyagban található ecetsav szennyezés gáz- és ionkromatográfiás meghatározásának összehasonlítása, *XLVI. Gyógyszeranalitikai Továbbképző Kollokvium*, 2023. április 20-22., Nyíregyháza. <https://mgyt.hu/wp-content/uploads/2023/03/Nyi%CC%81regyhaza-program-2023-03-13.pdf>
5. **Páll B.**, Kormány R., Horváth K.: Mátrixhatás kationcserés ionkromatográfiában, *Műszaki Kémiai Napok 2024*, 2024.04.16-18., Veszprém. https://mk.uni-pannon.hu/images/Dokumentumok/MKN2024_Book_of_Abstracts.pdf
6. **Páll B.**, Kormány R., Horváth K.: Az ionkromatográfia alkalmazási lehetőségei a gyógyszeranalitikában, *Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2024*, 2024. november 7-9., Visegrád. <https://2024.mettvandorgyules.hu/program/>

Az értekezés tématerületét érintő konferencia előadások és poszterek

Nemzetközi konferencián bemutatott előadások és poszterek

1. **Páll B.**, Kormány R., Horváth K.:The Role of Sample Preparation Techniques in Liquid Chromatography Analysis of Pollutants of Active Pharmaceutical Ingredients, *33rd International Symposium on Chromatography – ISC 2022*, 2022. szeptember.18-22., Budapest. <https://isc2022.hu/programme/>

Hazai konferencián bemutatott előadások és poszterek

1. **Páll B.**, Kormány R., Horváth K.:A mintaelőkészítés szerepe a gyógyszerhatóanyagok folyadékkromatográfiás vizsgálatában, *XLV. Gyógyszeranalitikai Továbbképző Kolokvium*, 2022. április 28., Kecskemét. <https://mgyt.hu/wp-content/uploads/2022/04/Analitika-program-2022.pdf>

4. Köszönetnyilvánítás

Talán már nem számít kuriózumnak, hogy munka és család mellett (nem huszonévesen) kezdje el valaki a doktori tanulmányait, ám ezzel is számos nehézség jár együtt, így nem árulok el nagy titkot, ha azt mondom soha nem kezdtem volna el, ha a két témavezetőm nem győzött volna meg. Köszönettel tartozom tehát a két témavezetőmnek **Dr. Horváth Krisztiánnak** és **Dr. Kormány Róbertnek**, hiszen, ebben az esetben szó szerint igaz, hogy nélkülük ez biztos nem jött volna létre, valamint rendkívül hálás vagyok a folyamatos emberi és szakmai támogatásukért.

Természetesen ahhoz, hogy elkezdhessem a munkát kellett a munkahelyem (Egis Gyógyszergyár Zrt.) engedélye is. Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Volk Baláznak**, aki a Hatóanyagfejlesztési Igazgatóság részéről engedélyezte a tanulmányomat és segítséget nyújtott a KDP-2020 pályázat beadásához, **Dr. Császma Ivettnek** a Hatóanyag Analitikai Fejlesztési Laboratórium 1 vezetőjének, mindkettőjük a kezdetektől fogva bátorított és elismerte munkámat. Továbbá köszönetet mondok a szakmai segítségért **Dr. Kapui Imrének**, valamint kollégáimnak (**Dr. Göröcs Noémi, Tóth-Malik Adrienn, Kalauz Andrea, Varholné-Tóth Erzsébet**) az elmúlt évek során nyújtott támogatásukért, segítségükért.

Köszönöm **Dr. Lukács Diánának** aki nagy segítséget jelentett számomra az egyetemi tenivalókkal kapcsolatban és fáradhatatlanul intézett mindent.

Tiszta szívvel köszönöm férjem (**Gesztesi Péter**) kitartó türelmét, támogatását és a mindennapi feladatokban nyújtott segítségét, valamint gyermekeimnek (**Gesztesi Péter, Gesztesi Dorottya**) a sok-sok biztatást, türelmet. Itt szeretnék még köszönetet mondani barátaimnak (**Lugosi és Kreis család**) és szüleimnek (**Pállné Hangyál Zsuzsa és Páll Csaba**) akik elfogadták, ha lemondtam egy-egy programot, vagy laptoppal a kezemben töltöttük a közös délutánokat.

Köszönettel tartozom továbbá a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatalnak - 2020. évi Kooperatív Doktori Program ösztöndíjáért, melynek köszönhetően számos konferencián, továbbképzésen gazdagíthattam szakmai ismereteimet.