



GYÓGYSZERHATÓANYAGOK ÉS - SZENNYEZŐK RETENCIÓS TULAJDONSÁGAINAK VIZSGÁLATA NAGYHATÉKONYSÁGÚ IONKROMATOGRÁFIÁS RENDSZERBEN

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Készítette:

Páll Boglárka Zsuzsa
okleveles vegyészmérnök

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

2025

Bevezetés, célkitűzés

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

A dolgozatom első része egy rövid irodalmi áttekintést ad a kromatográfia alapjairól és azon összefüggésekről, melyeket alkalmaztam a kísérletek során. Ebben a részben röviden és tömören bemutatom az ioncsere-kromatográfiát, valamint a mérés során alkalmazott készülék részeit. A továbbiakban még csoportosítom az ioncsere-kromatográfiával mérhető vegyületeket meghatározásuk szerint.

Az eredményeim bemutatásánál az első pont ecetsav meghatározása gázkromatográfia és ionkromatográfia segítségével. A fejlesztett módszereimet összehasonlítottam egy limit szintű validáláson keresztül annak megállapítására, hogy melyik technika alkalmazása jár előnyökkel ecetsav meghatározása során egy adott hatóanyagból.

Feladatomból volt nátrium-azid meghatározása mely kulcsfontosságú egy olyan hatóanyag esetében, ahol felhasználásra kerül a szintézisút során a tetrazol gyűrű kialakításához. A hatóságok által megszabott szigorú feltételeknek való megfeleléshez bemutatom cilostazol hatóanyagban történő meghatározását, valamint a vizsgálati módszer fejlesztését, mely magában foglalja a módszer hatékonyságának vizsgálatát és az azidion retenciós viselkedését a hőmérséklet változásának hatására. Végül a fejlesztett módszert limit szinten a megfelelő nemzetközi előírások szerint validáltam.

További vizsgálataim során foglalkoztam a trisz-, nátrium-, valamint lítium-kationok retenciós viselkedésével egy meglehetősen mátrixterhelt rendszerben, majd igazoltam, hogy ezen rendszer alkalmas felbontás javítására a trisz-és nátriumion között.

Végül foglalkoztam *N*-brómszukcinimid meghatározásával prasugrel hatóanyagban. Az általam fejlesztett mintaelőkészítési lépést a prasugreltől egy teljesen eltérő szerkezetű hatóanyag esetében is alkalmaztam, annak igazolására, hogy a mintaelőkészítés, vagy annak bizonyos elemei (lúgos oldószer, extrakció) általánosan is alkalmazhatóak bromidion képzésére az *N*-brómszukcinimidből. Prasugrel hatóanyag esetében validáltam a fejlesztett módszert limit szinten.

Felhasznált eszközök

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. 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 $\text{M}\Omega\text{cm}$) az Elga PureLab Option víztisztító rendszer szolgáltatta. A vizsgálataimhoz alkalmazott vegyszerek mindegyike analitikai tisztaságú volt. 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) gőztérmintadagolóval és lángionizációs (FID) detektorral hajtottam végre.

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

Az elválasztások során Dionex (Thermo Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) kromatográfiás oszlopokat alkalmaztam. Az anionos vizsgálatokhoz nagykapacitású AS11-HC oszlopot (2×250 mm, $d_p = 13$ μm) a hozzá megfelelő előtét oszloppal (AG11-HC, 2×50 mm, $d_p = 13$ μm), továbbá AS23 oszlopot (2×250 mm, $d_p = 13$ μm) a hozzá megfelelő előtét oszloppal (AG23, 2×50 mm, $d_p = 13$ μm) használtam. Mindkét típusú állófázis alkanol kvaterner 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) (nitrotereftálsav-polietilénlikol) típusú állófázist használtam.

Tudományos eredmények összefoglalása

Az elért eredményeim az alábbiak szerint foglalhatóak össze.

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 ismételhetség esetében másfélszer kisebb eredmények) érhetőek el, továbbá legalább 30%-al csökkenthető az analízis ideje, 10%-al jobb visszanyerés mellett ötvenszer 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 koncentrációtartományban.

Publikációk, előadások

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., Veszprém. <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 Kollokvium*, 2022. április 28., Kecskemét. <https://mgyt.hu/wp-content/uploads/2022/04/Analitika-program-2022.pdf>

