

Válasz opponensi bírálatra

Szerző:

Páll Boglárka Zsuzsa

Dolgozat címe:

Gyógyszerhatóanyagok és - szennyezők retenciós tulajdonságainak vizsgálata nagyhatékonyságú ionkromatográfiás rendszerben

Bíráló:

Dr. Ilisz István, Dsc, egyetemi tanár (Szegedi Tudományegyetem)

Tisztelettel köszönöm Dr. Ilisz Istvánnak az aprólékos és lelkiismeretes opponensi munkáját. Külön köszönettel tartozom az előbírálat során megfogalmazott kritikus észrevételekért, amelyek nagyban hozzájárultak a kézirat véglegesítéséhez és annak szakmai színvonalának emeléséhez. Kiemelten hálás vagyok a korrektúrázott dokumentumért is, amely jelentős segítséget nyújtott a sajtóhibák és a magyartalan megfogalmazások javításában.

A bírálatban megfogalmazott kérdésekre az alábbi válaszokat kívánom adni.

1. Hogyan kell érteni a 3.3. táblázatban egy mintára megadott extrém nagy elemzési időket (430 perc, ill. 300 perc)?

Az alábbi táblázatban összefoglaltam, hogy az egyes technikák alkalmazásakor milyen típusú oldatok mérésére, valamint mekkora ismétlésszámra van szükség egy minta analíziséhez. Mindkét technika esetében szükség van a vak oldat egyszeri vizsgálatára, a referenciaoldat hatszori injektálására, a mintaoldatok két független bemérésen alapuló elemzésére, valamint egy ellenőrző referenciaoldat injektálására. Gázkromatográfiás vizsgálat esetén – az áthordás elkerülése érdekében – mindez kiegészül a minták előtti és utáni mosási lépésekkel, amelyek három-három oldószeres injektálást jelentenek. Emellett figyelembe vettem az első injektálás előtti, 30 perces termosztálási időt is, amely a további injektálásoknál már nem szükséges, mivel a készülék a vizsgálati idő optimalizálása érdekében több minta egyidejű termosztálását végzi.

Gázkromatográfiás vizsgálat

Oldat	Ismétlések száma (n)
Vak	1
Referencia	1
Mosó	3
Minta1	2
Mosó	3
Referencia	6

Ionkromatográfiás vizsgálat

Oldat	Ismétlések száma (n)
Vak	1
Referencia	6
Minta1	2
Referencia	1

2. Mit jelentenek a 3.3. táblázatban a DL és QL értékeként zárójelben megadott koncentrációk?

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 tényérszám (N)	11 000	7000	≥ 2000
Szimmetria faktor (A_s)	1,1	1,4	≤ 2,0
Referencia oldat koncentrációk ($\mu\text{g/mL}$)	250	5	
Rendszerprecizitás (RSD%, n=6)	10,7%	2,4%	≤ 20,0%
Ismételhetőség (RSD%, n=6)	6,2%	4,4%	≤ 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 $\mu\text{g/mL}$)	15 ppm (0,015 $\mu\text{g/mL}$)	
QL (S/N = 10)	400 ppm (20 $\mu\text{g/mL}$)	50 ppm (0,05 $\mu\text{g/mL}$)	
Visszanyerés (%)	88,0%	97,5%	75,0%–125,0%
Elemzési idő egy minta esetében (perc)	430	300	
Minta koncentráció (mg/mL)	50	1	

A gyógyszeriparban általánosan alkalmazott gyakorlat szerint a ppm koncentrációt mindig a gyógyszerhatóanyagra vonatkoztatva adjuk meg. Ez azt jelenti, hogy az ICH által meghatározott 5000 ppm-es ecetsav koncentráció esetén az ecetsav szennyezés maximális megengedett mennyisége 5000 mg lehet 1 kg hatóanyagra vetítve. A kapott ppm értékek relatív koncentrációkat tükröznek, így a ténylegesen alkalmazott oldat koncentrációk (tömeg/térfogat mértékegységben) a bemért gyógyszerhatóanyag mennyiségétől függenek.

A 3.3-as táblázatban szereplő gázkromatográfiás QL értéknél a ténylegesen használt oldat koncentrációja 20 $\mu\text{g/mL}$, ami ugyanazon térfogatba bemért 50 mg hatóanyagra vetítve 400 ppm-es relatív koncentrációt jelent, míg az ionkromatográfiás QL értéknél a ténylegesen használt oldat koncentrációja 0,05 $\mu\text{g/mL}$, ami ugyanazon térfogatba bemért 1 mg hatóanyagra vetítve 50 ppm-es relatív koncentrációt jelent.

Az érzékenységek könnyebb összehasonlíthatósága érdekében, valamint Dr. Nádasi Levente előbírálati javaslatát követve, mindkét módszernél a relatív koncentrációk mellett feltüntettem a vonatkozó abszolút koncentrációkat is.

3. Véleménye szerint a származékképzésen alapuló gázkromatográfiás ecetsav meghatározással elérhető kimutatási határ hogyan viszonyul a közvetlen módszerekkel kapott eredményekhez?

A lángionizációs detektor (FID) érzékeny a szénatomokra, különösen a szénláncok hosszára és szerkezetére. Ez alapján, ha olyan reakciót alkalmazunk, amely ennek a mennyiségét növeli az érzékenység is nőni fog. Az észterezési reakció jól alkalmazható gőztér mintabevitelrel kapcsolt gázkromatográffal (HS-GC) kombinálva, ahol a származékképzés a mintatartó üvegben megy végbe az elemzés ideje alatt. A reakció alkohollal, sav jelenlétében játszódik le. Például ecetsav esetén mintatartó üvegenként 0,5 mL etanol és 3,5 g nátrium-hidrogénszulfát segítségével, 80 °C-on, rázással kombinált termosztálással etil-acetát képződik, mely már érzékenyen (2,38 µg/mL)¹ detektálható FID-del.

A származékképzést más alkohollal (például: metanol) is el lehet végezni kénsav, bór-trifluorid vagy sósav jelenlétében. Ez a módszer egy nagyságrenddel csökkentheti a kimutatási határt, lehetővé téve alacsonyabb koncentrációk megbízható detektálását.

Azonban fontos megemlíteni, hogy a reakciók melléktermékeket is eredményezhetnek, például etil-szulfátot, ami zavaró lehet a mérésnél. Emellett a minta mátrixhatása miatt a reakciók végbemenetele befolyásolhatja a pontos eredményt. Ezért a kísérleti beállítások optimalizálása, a megfelelő reagensek kiválasztása és a minta előkészítése kritikus a sikeres alkalmazáshoz.

¹ Dandan Zhou, Qingxi Hou, Wei Liu, Xiaoli Ren, Rapid determination of formic and acetic acids in biomass hydrolysate by headspace gas chromatography, Journal of Industrial and Engineering Chemistry, Volume 47, 2017, Pages 281-287, ISSN 1226-086X, <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.11.044>.)

4. A 3.2.2. fejezetben, a hőmérséklet retencióra kifejtett hatásának bemutatásakor említi, hogy a szerves ionok eltérőképpen viselkedhetnek. Létezik az ionkromatográfia irodalmában erre magyarázat?

Gyakorlatban előfordulhat, hogy a hőmérséklet emelkedésével elmozdul az adott vizsgálandó ion retenció ideje hol csökkenő, hol növekvő irányba. A hőmérsékletfüggést a van't Hoff összefüggés írja le:

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

Ahol a ΔH és ΔS az adott komponens mozgófázisból az állófázisba történő átjutása során fellépő entalpia-és entrópiaváltozást adják meg.

A teljes ioncsere folyamat során mind az eluens ellenionja, mind pedig a vizsgálandó ion dinamikus cseréje megvalósul az állófázison, így felírható:

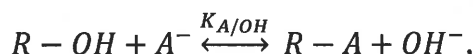
Az eluens (KOH) anionjának ioncsere egyensúlyi folyamata: $R^+ + OH^- \xrightleftharpoons{K_{OH}} R - OH^-$,

míg ennek szabadentalpia változása: $\Delta G_{OH} = -RT \ln K_{OH} = \Delta H_{OH} - T\Delta S_{OH}$

A vizsgálandó anion ioncsere egyensúlyi folyamata: $R^+ + A^- \xrightleftharpoons{K_A} R - A^-$,

míg ennek szabadentalpia változása: $\Delta G_A = -RT \ln K_A = \Delta H_A - T\Delta S_A$

Tehát a teljes ioncsere valójában két egyensúlyi folyamat eredője:



míg a teljes folyamat szabadentalpia változása: $\Delta\Delta G = \Delta G_A - \Delta G_{OH} = -RT \ln K_{A/OH}$

Így az ioncsere hőmérsékletfüggését az alábbi összefüggés írja le:

$$\ln K_{A/OH} = -\frac{\Delta\Delta G}{RT} = -\frac{\Delta\Delta H}{RT} + \frac{\Delta\Delta S}{R}$$

A hőmérséklet emelése a disszociációnak kedvez, mind az eluens-ion mind a vizsgálandó ion ioncsere egyensúlyát balra tolja el. A megkötődés tehát endoterm folyamat. Az, hogy a hőmérséklet növelése csökkenti vagy növeli a mintaionok retencióját attól függ, hogy a mintaion és az eluens ellenion egyensúlyát egymáshoz képest milyen mértékben tolja el a hőmérséklet. Mivel a két egyensúly entalpia és entrópia változása nem egyenlő, ezért a hőmérséklet hatása sem lehet ugyanakkora mértékű. Ebből fakad, hogy az eredő ioncsere egyensúly, ha nem is nagy, de kis mértékben érzékeny a hőmérséklet megváltozására. Amennyiben a mintaion megkötődésének szabadentalpia változása kisebb, úgy a hőmérséklet növelése kedvez a mintaion megkötődésének. Fordított esetben a retenció csökken a hőmérséklet növelésének hatására. Látszólag a hőmérséklet emelése kedvezhet a vizsgálandó ionok megkötődésének, de valójában arról van szó, hogy ezen ionok egyensúlyát kevésbé tolja el a hőmérséklet balra, mint a hidroxidionokét.

Joachim Weiss Ionkromatográfia Kézikönyvéből vett példák (fluorid, klorid, nitrit, ortofoszfát, szulfát) esetében a retenció független a hőmérséklettől és a szorpciós entalpiaváltozások különbségének értéke kicsi vagy akár nulla. Kutatásaik rámutatnak arra, hogy a szorpciós folyamatokat nemcsak az entalpia, hanem jelentős mértékben az entrópia (keveredési, orientációs, konfigurációs) változásai is irányítják, különösen a víz hidratációs viselkedése és a mátrix szerkezetének konfigurációs dinamikája révén².

² Joachim Weiss, Handbook of ion chromatography: Fourth, completely revised and enlarged edition, 2016. doi:10.1002/9783527651610.

5. Azt tapasztalta, hogy az injektált térfogat nagysága (már relatíve kicsi térfogatok esetén is) befolyásolja a nátriumionok retencióját. Ez a vizsgált rendszerre specifikus jelenség vagy gyakran előfordul ionkromatográfiában? Van esetleg valamilyen irodalmi feltételezés ennek magyarázatára?

A tapasztalt retenció változása nem az injektált térfogatnak köszönhető közvetlenül, hanem a mellette lévő ammóniumion mátrix mennyiségének növekedésének tulajdonítható. Ezért ez a jelenség specifikusan a mátrixterhelt rendszerekre jellemző. Ilyen esetekben az analit retenciós idejének változása elsősorban a nagy mennyiségű mátrix önelúciós hatásának következménye, amelynek részletes magyarázatát a következőkben ismertetem.

Ioncsere-kromatográfia esetén az állófázis kötőhelyeiért verseny alakul ki az eluens ellenionjai és a vizsgálandó ionok között. Amennyiben azonban a mintában nagy mennyiségű mátrix (egyéb) ion is jelen van, a versengés már három szereplő között zajlik.

Ilyen esetben az egyensúlyok a következők:



Felírható (Q) a kötőhelyek (negatív) koncentrációja, vagyis az állófázis ioncserekapacitása.

$$Q = x(E^{x+}) + y(A^{y+}) + z(M^{z+}) + (R^-)$$

A fentiekből pedig az analit térfogat-eloszlási együtthatója (D_A), mely az analit álló-és mozgófázisbeli koncentrációja:

$$D_A = \frac{(A^{y+})_s}{(A^{y+})_m} = K_A \left(\frac{Q}{1 + (E^+)_m K_E + (M^+)_m K_M} \right)^y$$

ahol K_E , K_A és K_M az eluens, az analit és a mátrixionok szorpciós egyensúlyi állandói az állófázisban³. Tehát nagy mátrixion-koncentrációjú minták esetén az analitionok retenciós viselkedése döntően a mátrix- és az eluens ionok állófázishoz viszonyított relatív affinitásától, valamint a mátrixionok koncentrációjától függ. Amennyiben a mátrixionok affinitása számottevően meghaladja az eluens ionokét a mátrixionok önelúciós hatása megakadályozza, hogy más ionok az állófázisban maradjanak, ami a retenciós idők jelentős csökkenéséhez vezet. Ezzel ellentétben, ha a mátrixion affinitása az állófázishoz kisebb, mint az eluens ionoké, az analitionok erősebben kötődnek az állófázishoz, ezáltal retenciójuk növekszik.

Ammónium-mátrix esetén az önelúciós hatást tovább erősítik a dolgozatban is részletezett további tényezők, mint például a pH-változás (az eluens lúgosodása, a trisz kation ionizációs állapotának változása), a pufferkapacitás, valamint az alkalmazott oszlop kationcserélő kapacitásának módosulása.

³ Péter Hajós, Krisztián Horváth, Equilibrium-based approach for prediction of matrix-related interferences in anion chromatography, Journal of Chromatography A, Volumes 1198–1199,2008, Pages 101-106, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.011>.

Végül ismételten köszönöm Dr. Ilisz István opponensi munkáját, akitől tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Budapest, 2025.06.04.

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized cursive letters, positioned above a horizontal dotted line.

Páll Boglárka Zsuzsa