

# A gázkromatográfia alkalmazása a gyógyszeranalitikában



**Dr. Göröcs Noémi**

gorocs.noemi@egis.hu

**Hatóanyag Analitikai Fejlesztési Laboratórium 1.**

Egis Gyógyszergyár Zrt.

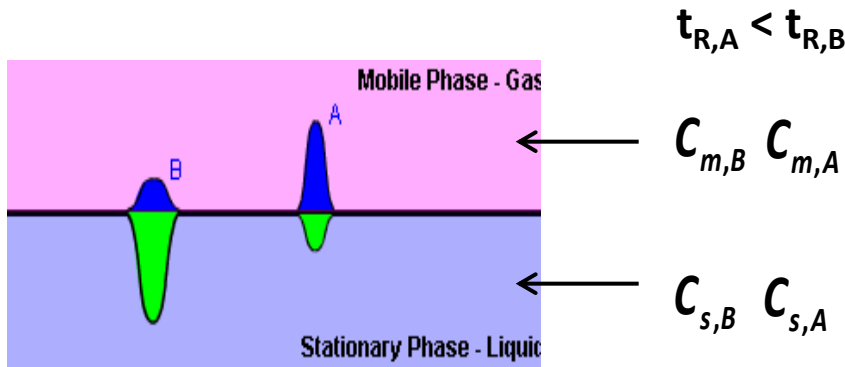


# Gázkromatográfia

Egy helyhez kötött állófázis érintkezik az áramló mozgófázissal

Egy adott komponens mozgófázisbeli áramlásakor megoszlik az álló- ill. mozgófázis között, folyamatos, dinamikus anyagátmenet jön létre

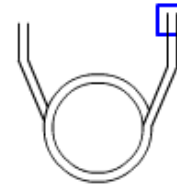
Többkomponensű elegy esetén az anyagátmenet dinamikája az anyagi minőségtől függ, így bizonyos komponensek sokáig időznek az állófázison/ban, míg mások kevesebb időt töltenek el, s gyorsabban haladnak a mozgófázissal.



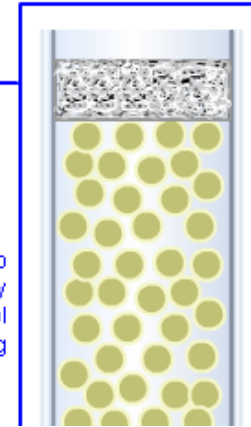
# Gáz mozgófázis (N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, He, Ar)

## Töltött kolonna (korábban)

Typical Packed Column Configuration :  
2m x 2mm i.d. 80/100 mesh support



Pellicular silica particles packed into the glass tube coated with stationary phase film – retained with glass wool plug



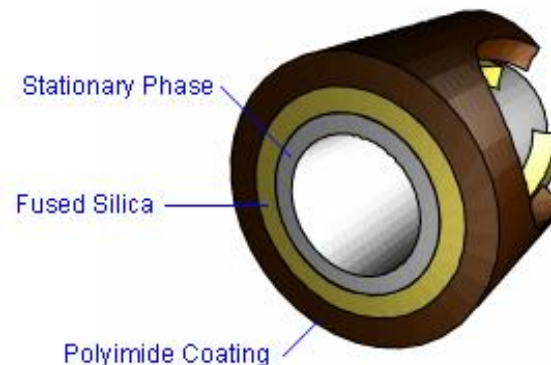
## Kapilláris kolonna (korszerű)

Felépítése: Kvarcüveg vékony cső, belső felületen az állófázissal

Állófázis: Szilárd (adszorpció)

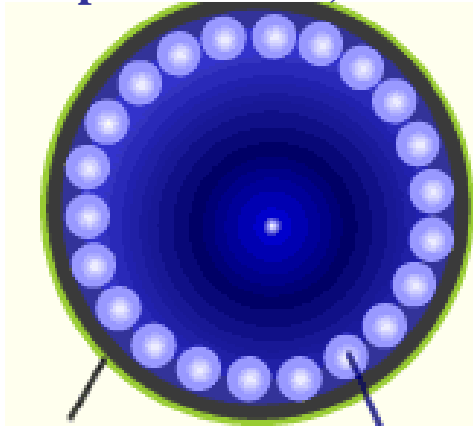
Folyadék (abszorpció)

Szilárd hordozón folyadék (abszorpció)



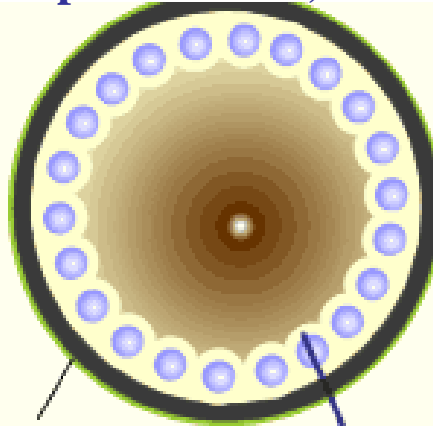
# Kapilláris kolonnák:

**PLOT (Porous Layer Open Tubular)**



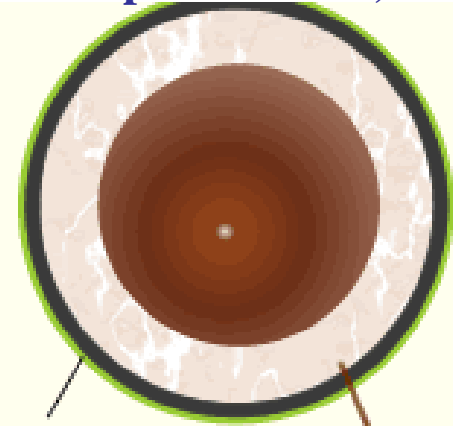
Poliimid bevonat      Adszorbens

**SCOT (Support-Coated Open Tubular)**



Poliimid bevonat      Szilárd hordozóra felvitt megosztófolyadék

**WCOT (Wall Coated Open Tubular)**



Poliimid bevonat      Megosztófolyadék

## Gázelemzések:

Büzelemzés

Földgázelemzés

Erőművi véggázok

Biológiai eredetű gázok

A hordozó megnöveli a bevihető megosztófolyadék mennyiségét, emiatt nő a kolonna kapacitása a nedvesített falú kolonnához képest (rég technika töltött kolonnákhoz)

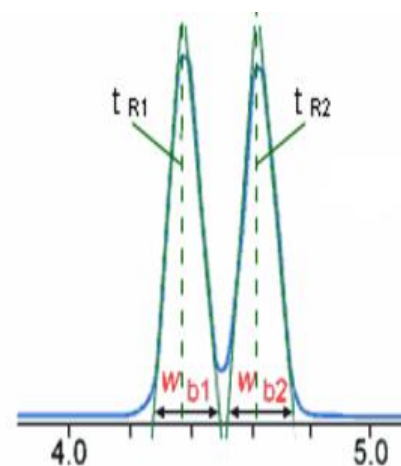
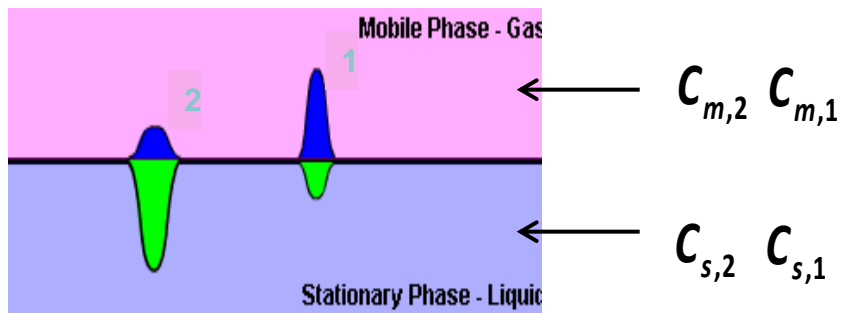
**90%-ban ezt használják**

## Két fontos paraméter: szelektivitás ( $\alpha$ ) és felbontóképesség ( $R_s$ )

$$\alpha = \frac{\frac{C_{s,2}}{C_{m,2}}}{\frac{C_{s,1}}{C_{m,1}}} = \frac{t_{R,2}'}{t_{R,1}'}$$

$$R_s = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{\frac{w_{b1}}{2} + \frac{w_{b2}}{2}} = 2 \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_{b2} + w_{b1}} \geq 1,5$$

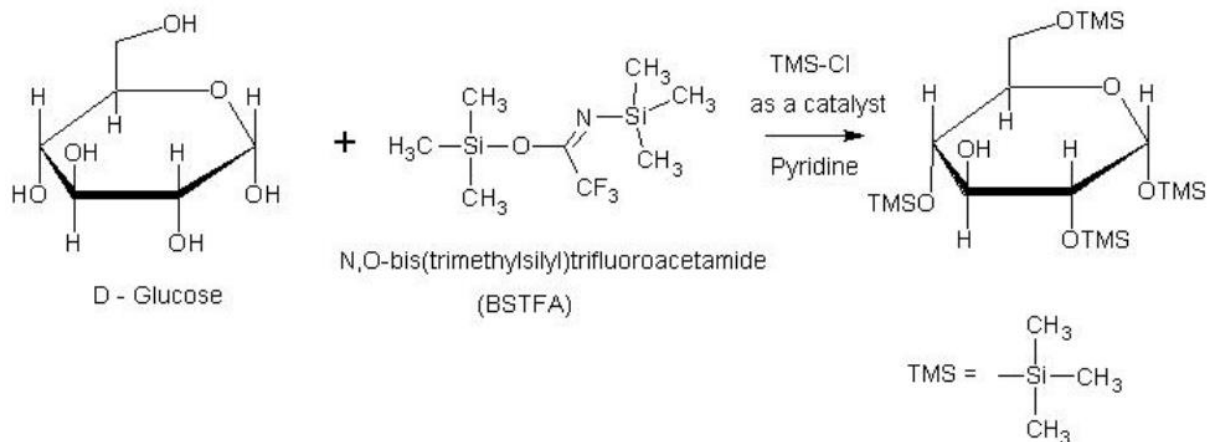
Ha  $t_{R,1} < t_{R,2}$  :



Az  $\alpha$  értéke csak a hőmérséklettől és az állófázis ill. a minta anyagi minőségétől függ, minden egyéb a felbontóképességet változtatja meg!

# Gázkromatográfiával mérhető anyagok

- Bomlás nélkül elpárologtatható szerves vegyületek (szerves sókat fel kell szabadítani)
- Bomlik, de származék képezhető belőle, amely elpárologtatható



- Bomlik és nem tudunk illékony származékot képezni, akkor HPLC

# Illékony szennyezők megjelenése a hatóanyagban ill. az intermedierekben a gyártás során

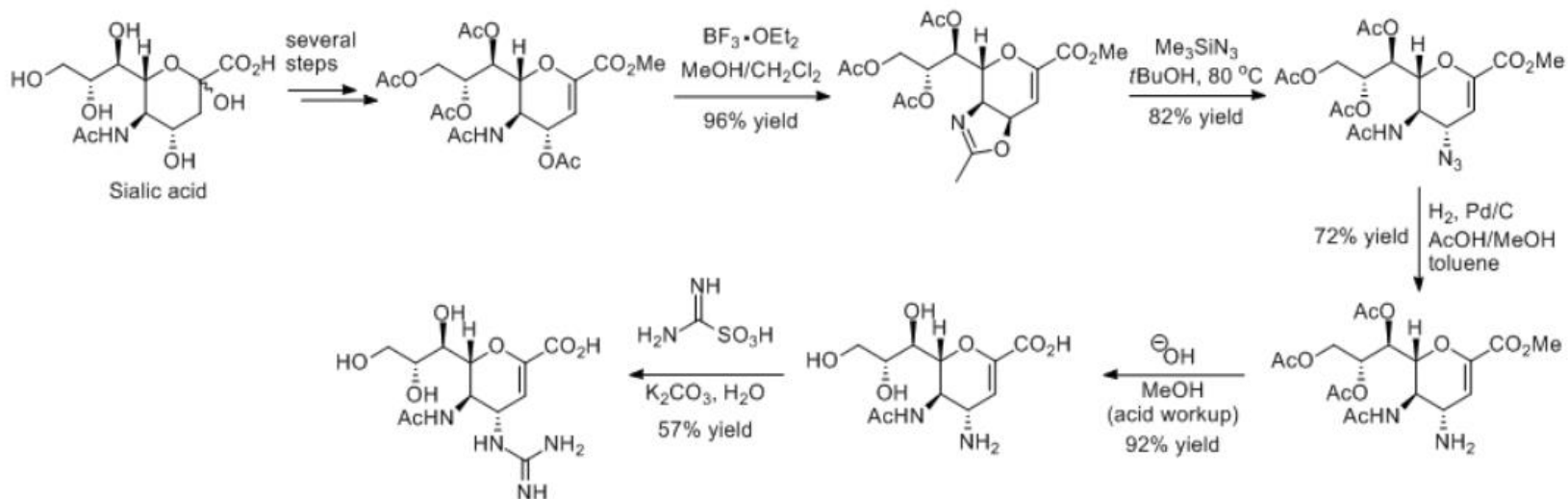
- Alkalmazott oldószerek maradékából
- A használt oldószerek gyártásakor előforduló anyagokból  
(pl. toluol előállításánál benzol)
- Kiindulási anyagként alkalmazott, vagy gyártás során keletkező kisebb molekulatömegű anyagokból
- A kiindulási anyagok gyártásakor alkalmazott anyagokból  
„a kiindulási anyagok kiindulási anyagainak a kiindulási anyagai...”  
kínai, indiai beszállítók, nem feltétlenül GMP környezet



# Bomlás nélkül elpárologtatható szerves vegyületek

## 1. Oldószerek meghatározása

### Pl. Zanamivir



➡ MeOH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $t\text{Bu-OH}$ , toluol (benzol) mérendő

# Az oldószerek megengedett koncentrációhatára

International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (röviden **ICH**)

➔ Guideline for residual solvents alfejezet: **3 oldószerosztály**

**Class 3:** Solvents with low toxic potential (pl. etanol, metil-acetát, DMSO)

egységesen 5000 ppm

**Class 2:** Solvents to be limited (pl. metanol, acetonitril, piridin)

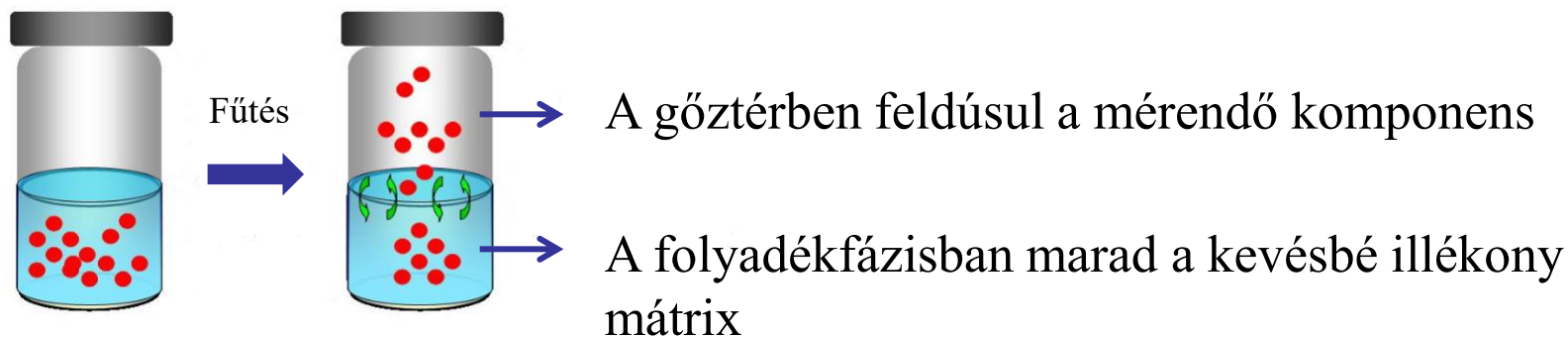
egyedi határértékek ~ 50-4000 ppm között

**Class 1:** Solvents to be avoided

egyedi határértékek, pl. benzol 2 ppm, széntetraklorid 4 ppm

# Oldószerek koncentrációjának a mérése

Headspace gázkromatográfia, gőztéranalízis (HS-GC)



Feltétele: a mátrixban az oldószer és a hatóanyag kevésbé illékony kell legyen, mint a mérendő komponens(ek)

# Headspace paraméterek

## Inkubálási idő

- A gőztér és a folyadékfázis között megoszló komponens egyensúlyi koncentráció értékeit el kell érni, egyéb esetben nem ismételtető a mérés a változó csúcsterületek miatt
- Általában 15-30 perc elegendő

## Inkubálási hőmérséklet

- Az oldószer forráspontja alatt kell tartanunk kb. 20-30 °C-kal
- Ha a szilárd mátrix szobahőn nem oldódik, az inkubálási hőmérsékleten még létrejöhet a kívánt oldódás

# A megoszlási hányados

- Adott hőmérsékleten, adott idő alatt kialakul az egyensúlyi koncentráció mind a gőz-, mind a folyadékfázisban
- A két koncentráció aránya a megoszlási hányados, mely csak a hőmérséklettől függő érték

$$K = C_f / C_g$$

**Table I**  
*K Values of Common Solvents in Air-Water Systems at 40°C*

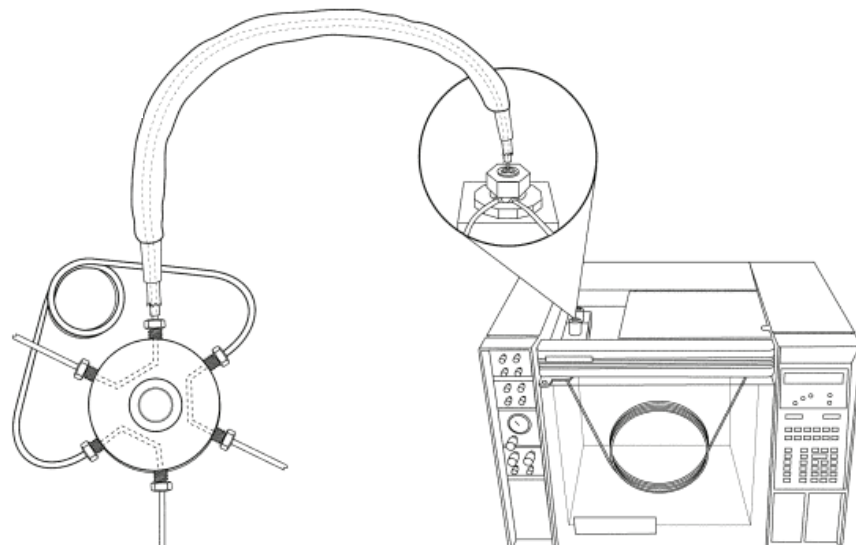
<i>Solvent</i>	<i>K Value</i>
<i>cyclohexane</i>	<i>0.077</i>
<i>n-hexane</i>	<i>0.14</i>
<i>tetrachloroethylene</i>	<i>1.48</i>
<i>1,1,1-trichloromethane</i>	<i>1.65</i>
<i>o-xylene</i>	<i>2.44</i>
<i>toluene</i>	<i>2.82</i>
<i>benzene</i>	<i>2.90</i>
<i>dichloromethane</i>	<i>5.65</i>
<i>n-butyl acetate</i>	<i>31.4</i>
<i>ethyl acetate</i>	<i>62.4</i>
<i>methyl ethyl ketone</i>	<i>139.5</i>
<i>n-butanol</i>	<i>647</i>
<i>isopropanol</i>	<i>825</i>
<i>ethanol</i>	<i>1355</i>
<i>dioxane</i>	<i>1618</i>

- Különböző vegyületek víz és levegő közötti megoszlási hányadosai 40°C-on
- A poláris vízből az apoláris, illékony molekulák könnyen kijutnak a gőztérbe, így nagy lesz az érzékenységük és alacsony a kimutatási határ

# Headspace mintaadagolás

- **Mintabemérő csap**

- A lelke a mintahurok vagy *loop*, mely az adott mintatérfogatot biztosítja
- *Transfer line* köti össze a *loop*-ot az injektorral (szigetelt, inert kapilláris)

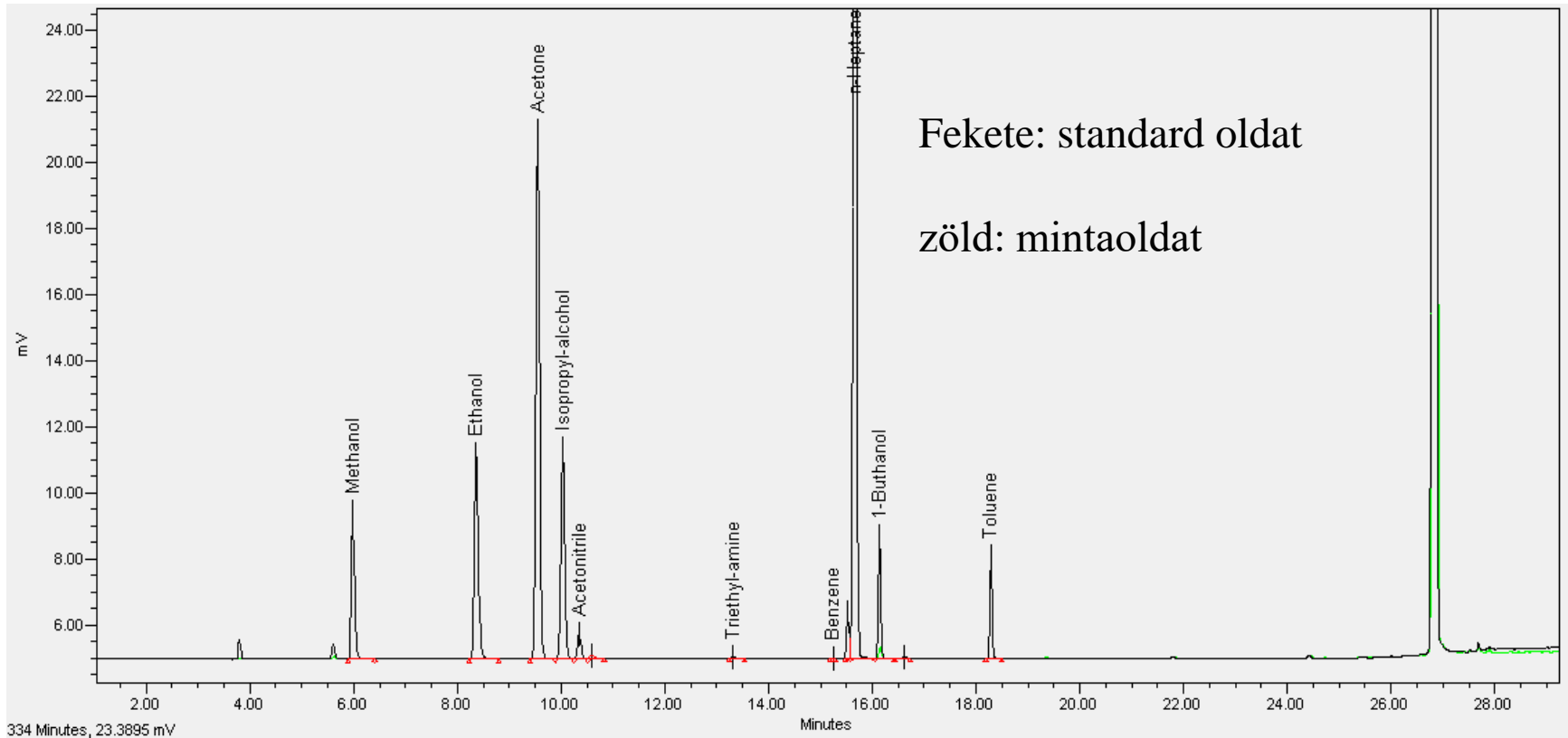


- **Fecskendő megoldás**

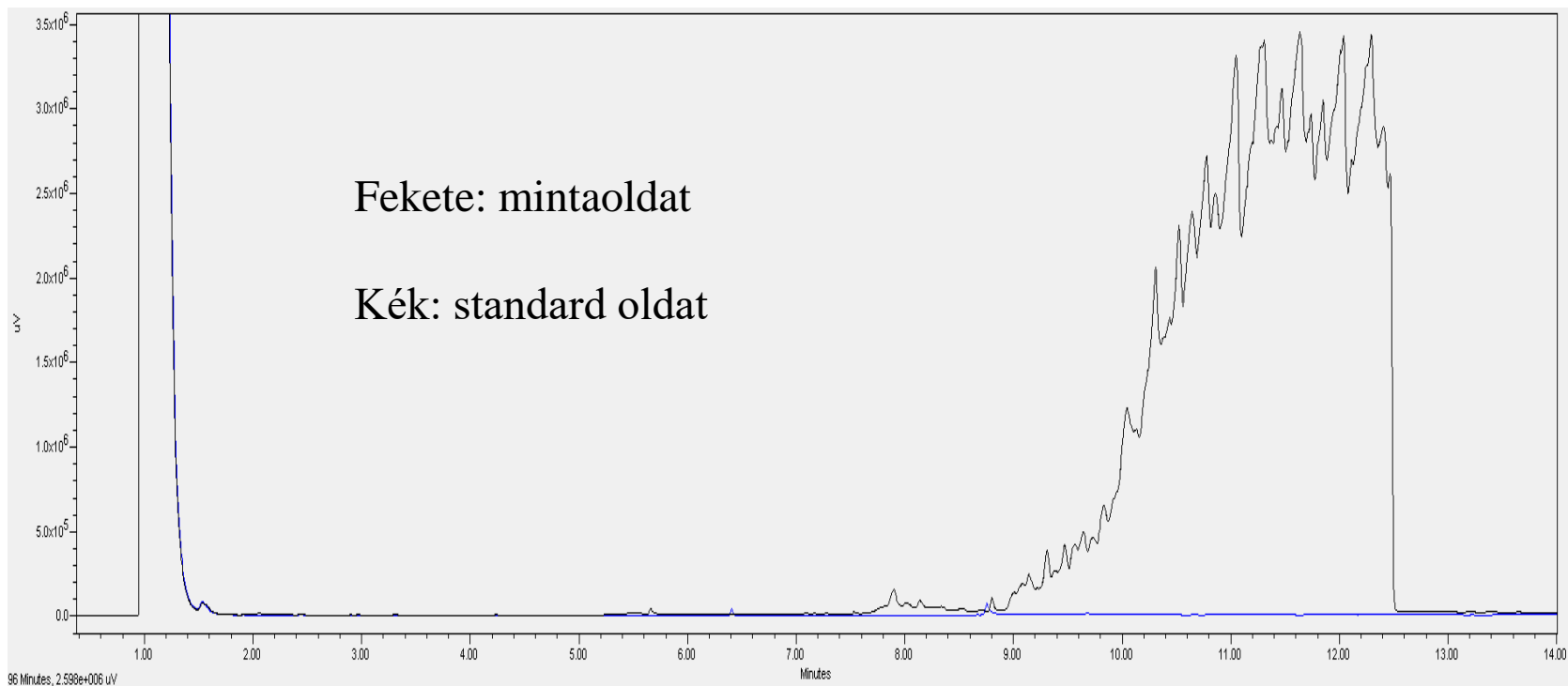
Nagy térfogatú (0,5-2,5 mL-es), fűtött, gáztömör fecskendő végzi az adagolást



# Headspace kromatogram



Headspace mintaelőkészítés nélkül, közvetlenül injektálva az oldatokat, a hatóanyag *degradálódhat* az injektor hőmérsékletén (~200-300 °C)





## 2. Kiindulási anyagok/gyártás során keletkező vegyületek

Sok közülük **mutagén/genotoxikus** szennyezés: Olyan anyagok, amelyek reagálnak a DNS-sel, az örökítőanyag károsodását, ezáltal rákot okozhatnak

Határértékek számítása ICH M7 alapján, toxikológussal, fejlesztő üzemmérnökkel, orvosszakértővel...

Általános esetben **1,5 $\mu$ g maximális napi bevétel** összesen (max. dózissal)

Nem élethosszig tartó alkalmazás esetén pl. magasabb a határérték (Dr. Frigyes Dávid)



max. 800mg/nap Quetiapine



max. 1mg/nap Anasztrozol

# A kimutatási határ (LD) és a mennyiségi mérés alsó határa (LQ)

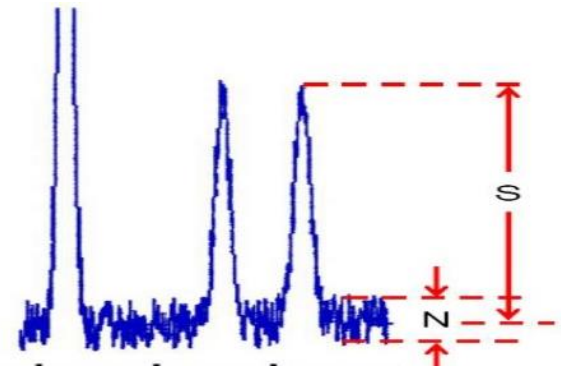
## Gyógyszeripari számítás:

$$3 \geq \frac{2S_{LD}}{N}$$

$S_{LD}$ : az LD koncentrációnak megfelelő csúcsmagasság

$$10 \geq \frac{2S_{LQ}}{N}$$

$S_{LQ}$ : az LQ koncentrációnak megfelelő csúcsmagasság



1,5 µg/nap maximális genotox szennyező dózis mellett:

- 1mg max. hatóanyag dózissnál: 0,15% ➡ Viszonylag könnyű mérni
- 1g max. hatóanyag dózissnál: 1,5ppm ➡ „Viszonylag” nehéz mérni

Nagyobb határértékek: „sima” GC-FID detektálás

Kis határértékek: GC-ECD (halogéntartalmú vegyületekre)

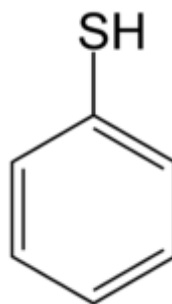
GC-MS (univerzális)

## 2.1. Kevésbé illékony anyagok

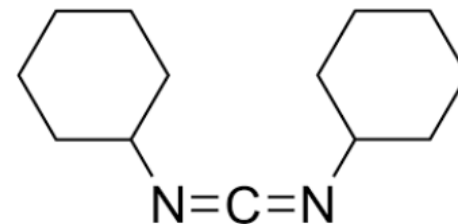
*Semi volatile organic compounds (SVOC)*

Pl.

Tiofenol (fp: 169 °C)



N,N-diciklohexil-karbodiimid (fp: 122 °C, 6 Hgmm)



➔ A nagy fp miatt gőztéranalízis nem jöhet szóba

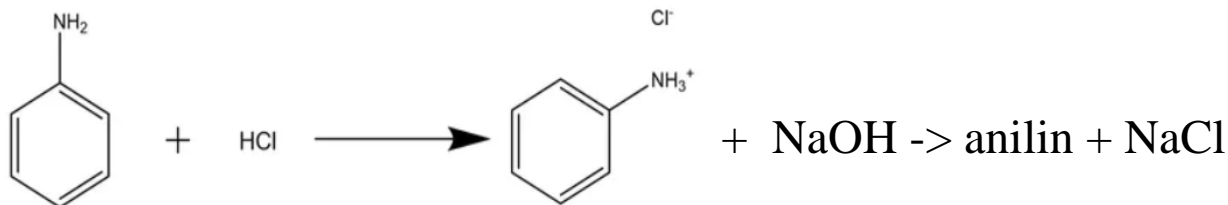
## Mérési lehetőségeik:

- Direkt injektálás, ha a mátrix nem bomlik
- Folyadék-folyadék extrakció, ha a mátrix nem megy át az extraháló oldószerbe
- GC-MS mérés: Szelektív ionkövetéssel a mintamátrix gyakorlatilag láthatatlan a kromatogramon!

# Folyadék-folyadék extrakció: Például bázikus karakterű anyagok extrakciója

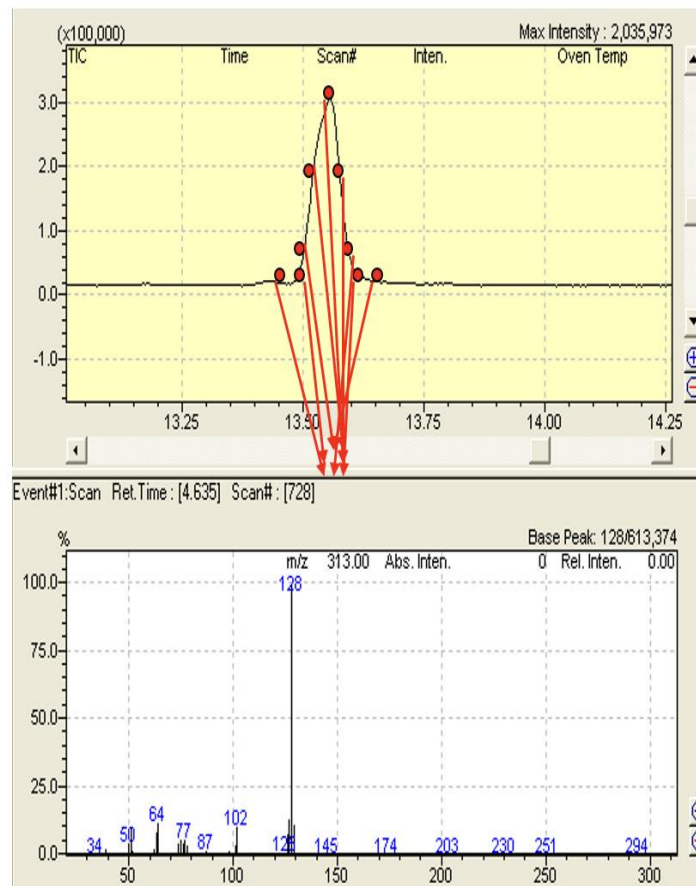
**Adott egy gyógyszer hatóanyag mátrix, amelyben anilint kell vizsgálni, s savas vízben oldódik**

- Anilines mátrix + 1M sósav -> feloldódik savas vízben, anilin só képződik, ami nem mérhető
- Sósav + NaOH oldat sztöchiometriai feleslegben -> az oldat lúgos lesz, a hatóanyag kicsapódik (visszanyerés vizsgálat adszorpció lehetőség miatt!)
- Lúgos oldat + ciklohexán -> az ionvisszaszorított állapotú anilin szívesen megy szerves fázisba



# GC-MS mérés: hogyan lesz a tömegspektrumból kromatogram?

- A detektor adott mintavételi frekvenciával folyamatosan vesz fel tömegspektrumokat
- Spektrumkönyvtárbeli kereséshez a normált, relatív intenzitásokat tartalmazó tömegspektrumokat használjuk
- A kromatogram felépítéséhez a abszolút ionáramokat alkalmazó spektrumokat vesszük figyelembe
- Egy pont a kromatogramon a hozzá tartozó tömegspektrum összionáram-intenzitás értékét adja meg
- Az MS kromatogram diszkrét pontokból áll, melyre a szoftver illeszt folytonos görbét



# GC-MS Kromatogram felvételi technikák

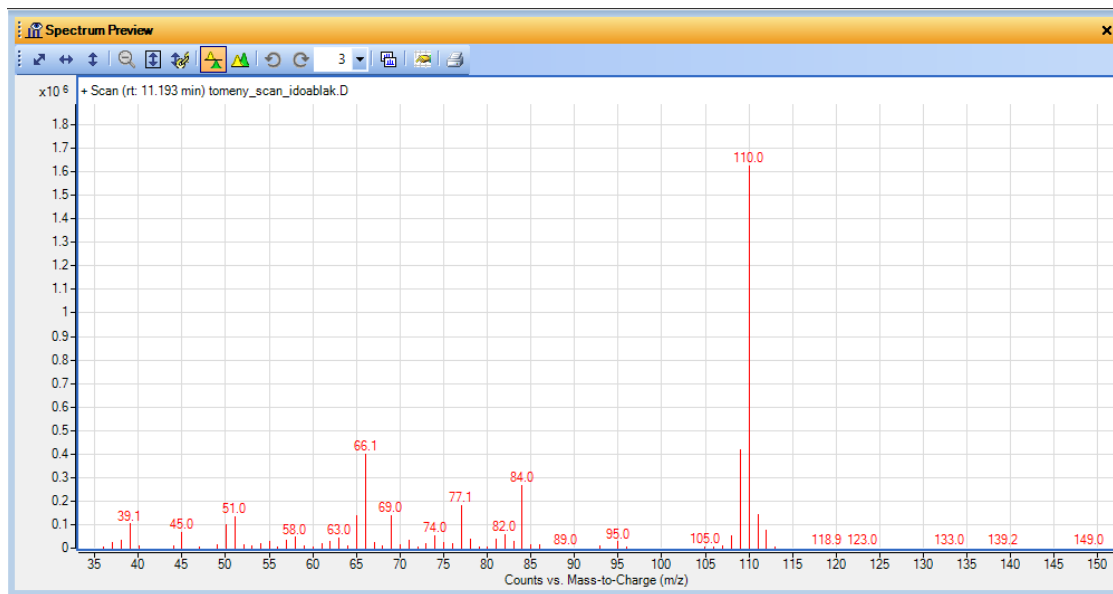
## SCAN mód

- Egy adott tömegtartományban minden iont mér (pásztáz, szkennel)
- Eredménye a TIC (*Total Ion Chromatogram*)
- Minőségi és mennyiségi elemzésre alkalmas
- Nagyobb kimutatási határ a rosszabb jel/zaj viszony miatt

## SIM mód

- Egy vagy két iont mér
- Eredménye a SIM (*Selected Ion Monitoring*) kromatogram
- Csak mennyiségi elemzésre alkalmas
- Adott specifikus iont mérve nagyon kicsi a háttér
- Ha az ionunk nagy intenzitású is, kiemelkedő jel/zaj viszony érhető el a SCAN technikához képest

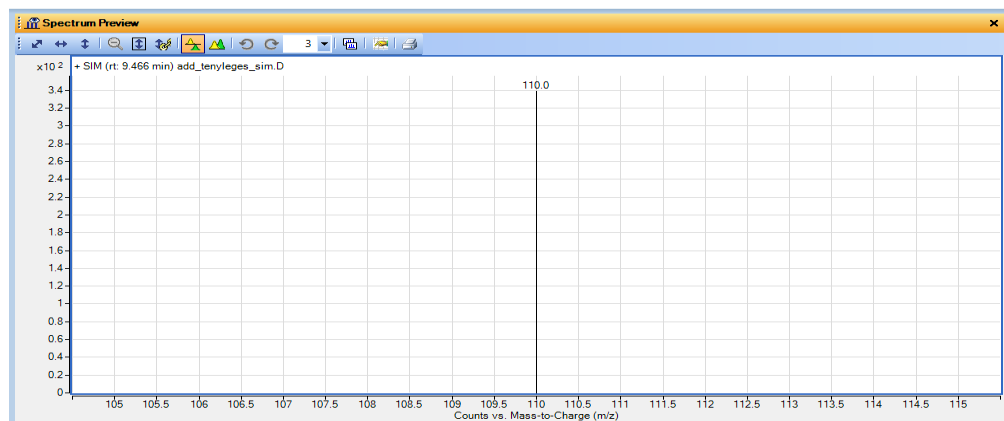
## - SCAN



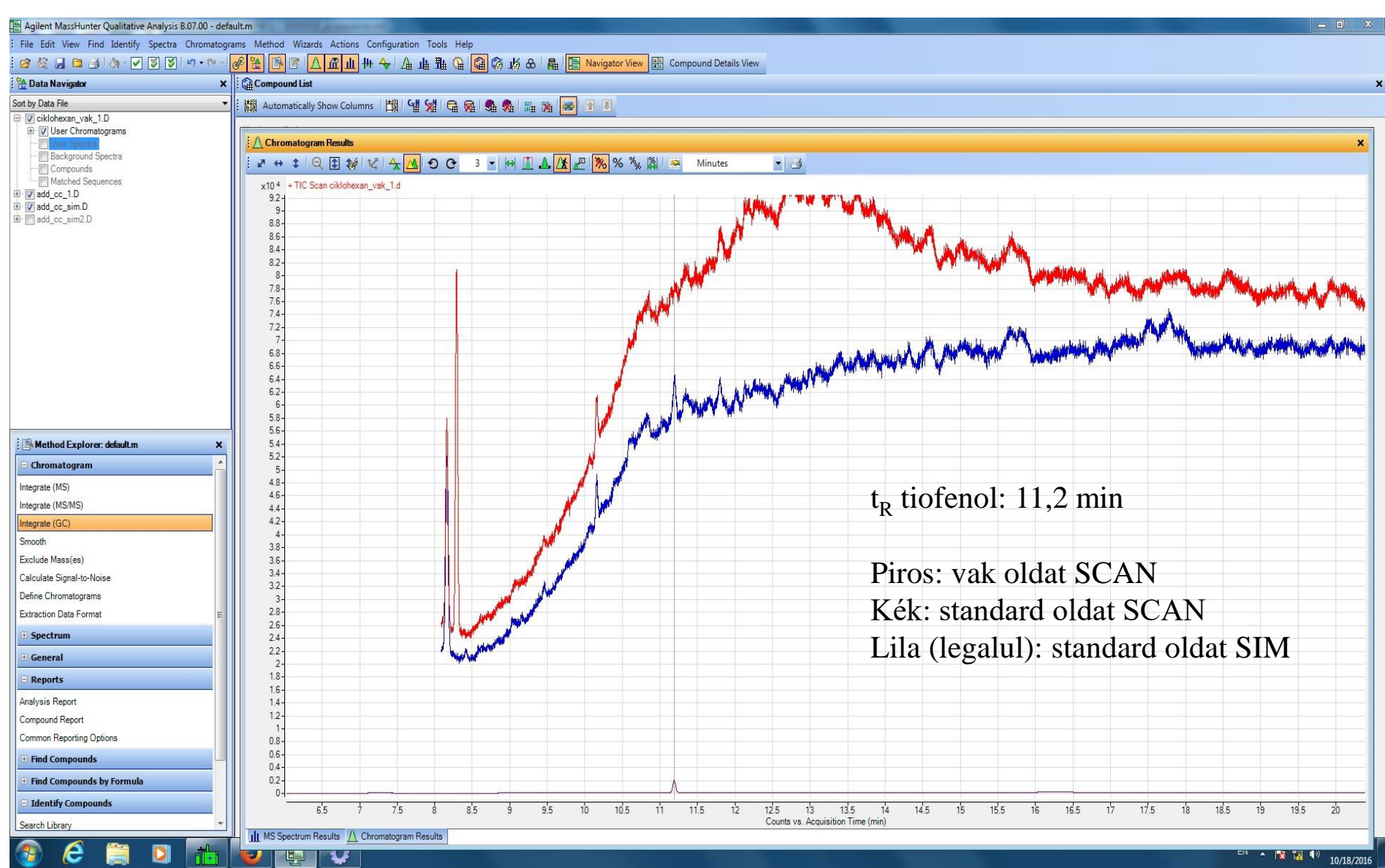
Tiofenol  
tömegspektruma

Bázision: 110 m/z

- SIM: csak a kiválasztott ion(oka)t méri, melyek intenzívek a keresett komponensben, de a mátrixban, háttérben elenyészőek







## Olvasnivaló a témához:

**Gyógyszeranalitika a fejlesztő szemével**, *BABJÁK Mónika, CZIPÓNÉ TAKÁCS Tímea és MESZLÉNYI Gábor*

Magyar Kémiai Folyóirat, **122.** évfolyam, 2-4. szám, 2016. p. 134-142.