



Gőztéranalízis és gázkromatográfia (HS-GC, GC-MS)

Dr. Göröcs Noémi

gorocs.noemi@egis.hu

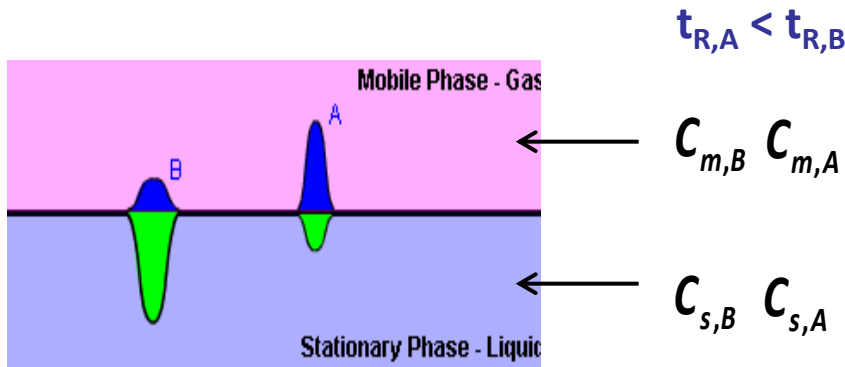
Hatóanyag Analitikai Fejlesztési Laboratórium 1.
Egis Gyógyszergyár Zrt.

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.



Vivőgáz, inertgáz mozgófázis (He, [H₂], N₂, Ar) Nem léphet reakcióba sem az állófázissal, sem a mintával.

Töltött kolonna

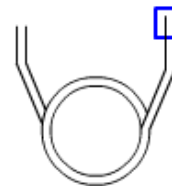
Korai megoldás, nagy belső átmérőjű és rövid.

Az áramlási keresztmetszetet kitölti a töltet.

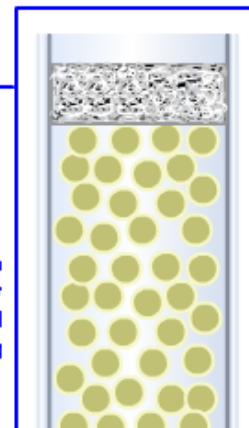
Üvegből, de főleg fémből készül. Iparban még használják

főleg permanensgáz-elemzésekre. Kevésbé hatékony, adott idő alatt kevés és széles csúcsot ad, viszont nagy a kapacitása.

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



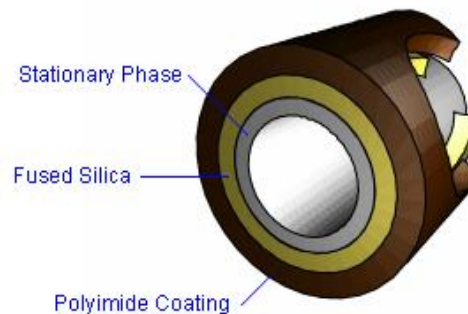
Kapilláris kolonna (open tubular, OT)

Vékony (<1mm) és hosszú (>15m) cső, ált. kvarcüvegből („fused silica”) készül (színtelen). Külső sárgásbarnás poliimid bevonat védi a mechanikai sérülésektől. Az áramlási keresztmetszethez képest jóval kisebb az állófázis (film)vastagság (<10 μm). Ez van egyenletesen „szétkenve” a belső falon filmrétegben. Az állófázis 3 típusa létezik, ahol vagy amiben létrejön az elválasztás. Hatékonyága nagy.

Állófázis: Szilárd (adszorpció)

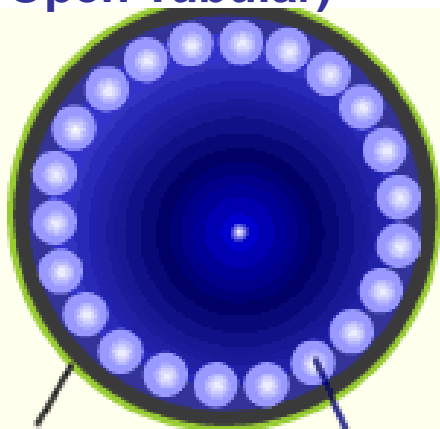
Folyadék (abszorpció)

Szilárd hordozón folyadék (abszorpció)



Kapilláris kolonnák:

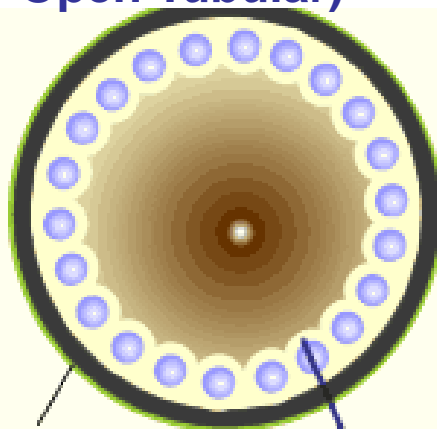
PLOT (Porous Layer Open Tubular)



Poliimid bevonat

Adszorbens

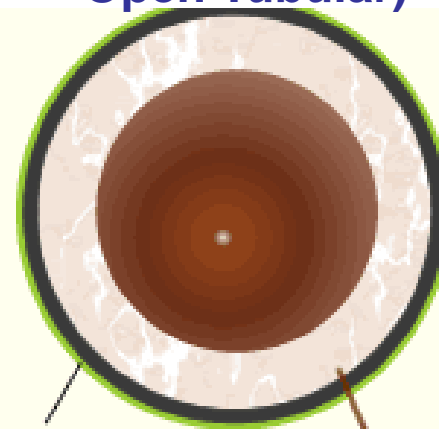
SCOT (Support-Coated Open Tubular)



Poliimid bevonat

Szilárd hordozóra felvitt megosztófolyadék

WCOT (Wall Coated Open Tubular)



Poliimid bevonat

Megosztófolyadék

Gázelemzésekhez főleg:

Bűzelemzés

Földgázelemzés

Erőművi véggázok

Biológiai eredetű gázok

A hordozó megnöveli a bevihető megosztófolyadék mennyiségét, emiatt nő a kolonna kapacitása a nedvesített falú kolonnához képest, nem igazán használatos már

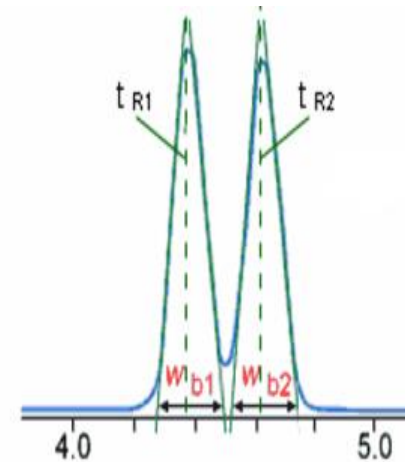
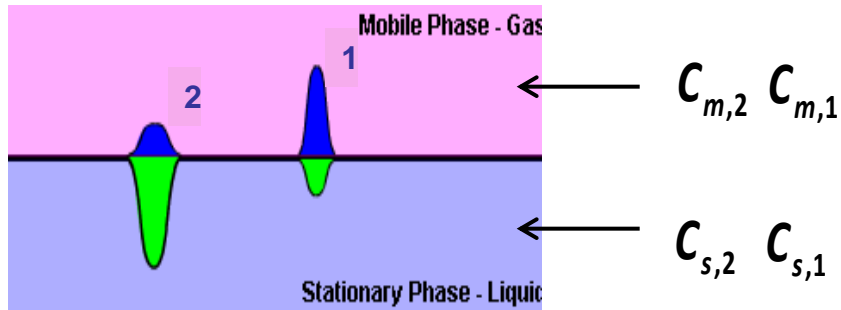
90%-ban ezt használják, sokféle polaritású állófázis létezik a különböző szelektivitást igénylő feladatokhoz

Két fontos paraméter: szelektivitás (α) és felbontóképesség (R_s)

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

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

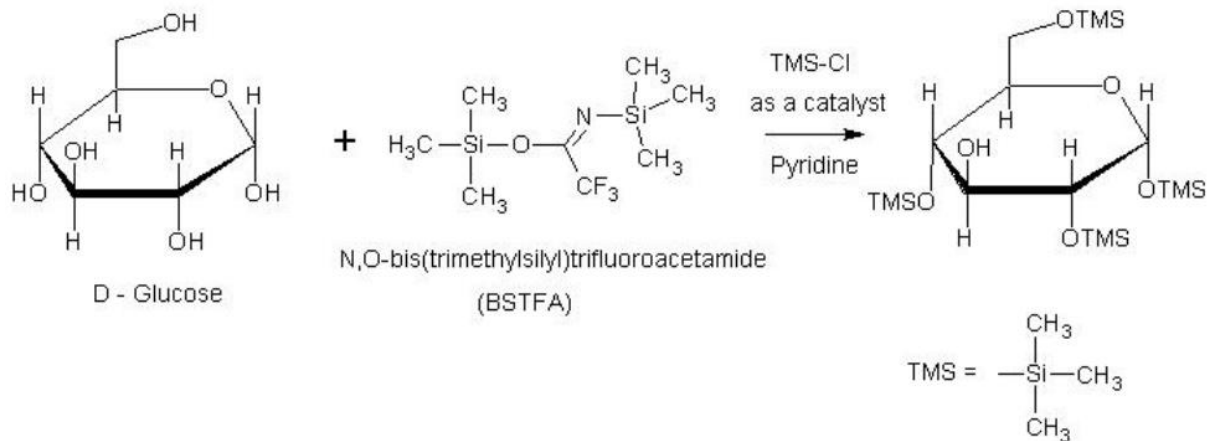
Ha $t_{R,1} < t_{R,2}$:



Az α értéke csak a hőmérséklettől és az állófázis ill. a minta anyagi minőségétől függ, minden egyéb a felbontóképességet változtatja meg (áramlási sebesség, filmvastagság, kolonnahossz)

Gázkromatográfiával mérhető anyagok

- Bomlás nélkül elpárologtatható szerves vegyületek (szerves anyagokat a sóikból fel kell szabadítani).
Fontos, hogy létezik-e légköri nyomáson mért forráshőmérséklet, azaz forráspont.
- Bomlik, de származék képezhető belőle, amely elpárologtatható: pl. a cukrok OH csoportjai szililezőszerrel apoláris csoportokká alakíthatók, melyek már nem bomlanak



- Klasszikus példa: a bomladozó zsírsavak észterezése illékony zsírsav-észterekké.
- Bomlik és nem tudunk illékony származékot képezni, akkor HPLC

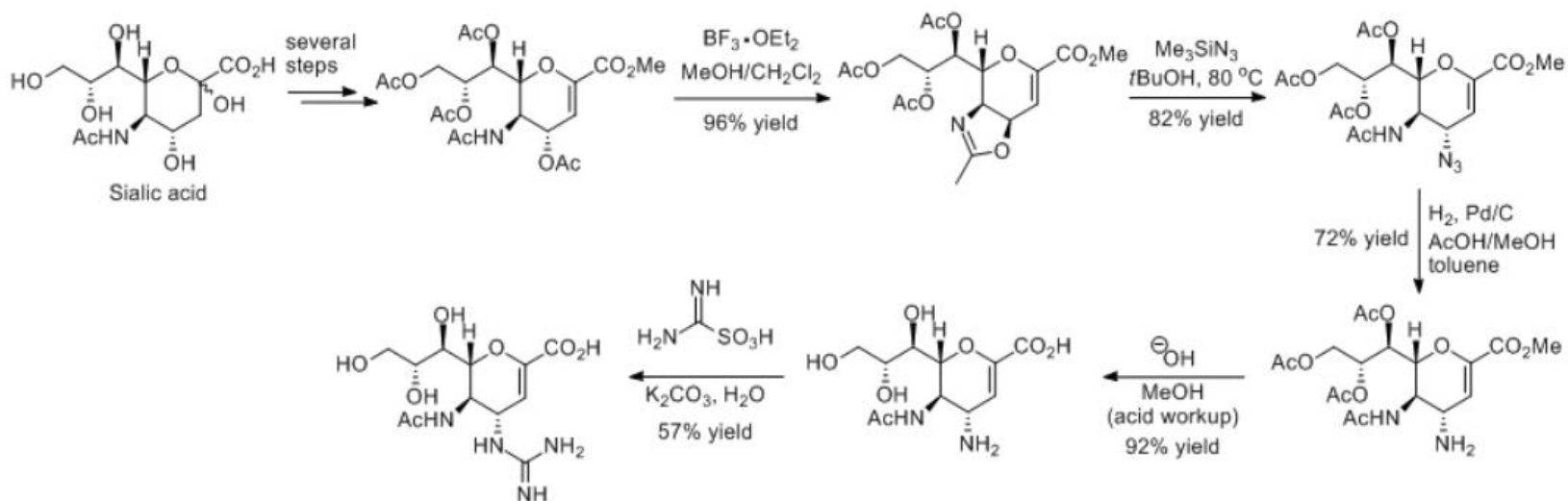
Illékony szennyezők megjelenése a hatóanyagban ill. az intermedierekben a gyógyszergyártás során

- Alkalmazott oldószerek maradékából
- A használt oldószerek gyártásakor előforduló anyagokból
(pl. toluol előállítása során 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

PI. Zanamivir hatóanyag RoS (Route of Synthesis)



➡ MeOH, CH_2Cl_2 , tBu-OH, toluol (benzol)
méréndő

Az oldószerek megengedett koncentrációhatára hatóanyagokban

International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (röviden ICH): Egy igen erős nemzetközi ajánlás, ha gyógyszereket szeretne egy cég GMP módon gyártani és eladni

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

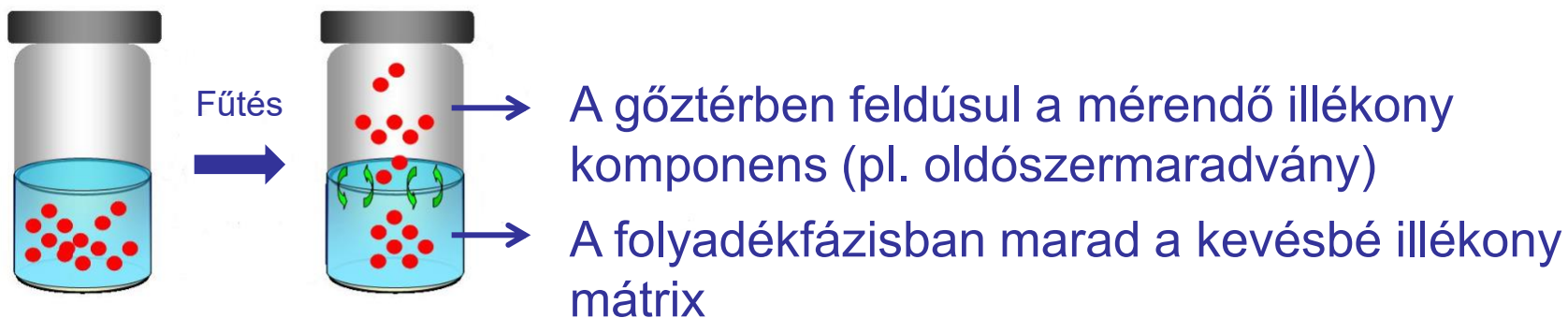
Class 3: Solvents with low toxic potential (pl. etanol, metil-acetát, DMSO)
egységesen 5000 ppm [5000 µg osz. / g hatóanyag]

Class 2: Solvents to be limited (pl. metanol, acetonitril, piridin)
egyedi kisebb határértékek ~ 50-4000 ppm között

Class 1: Solvents to be avoided
egyedi alacsony határértékek, pl. benzol 2 ppm, széntetraklorid
4 ppm

Oldószerek koncentrációjának a mérése

Headspace gázkromatográfia, gőztéranalízis (HS): A hatóanyagok nem illékonyak, melyeket fel tudunk oldani szintén nem illékony oldószerben (dimetil-szulfoxid fp. 189°C, N,N-dimetil-formamid fp. 153°C, stb.). Egy légmentesen lezárt üvegben, adott ideig melegítve (pl. 80°C / 20 perc) a feloldott mintát, kinyerhető az illékony oldószertartalom



Alkalmazhatóságának feltétele: a mátrix, (azaz a választott magas forrpontú oldószer és a hatóanyag) kevésbé illékony kell legyen, mint a mérendő komponens(ek)

Headspace paraméterek

Inkubálási idő

- A gőztér és a folyadékfázis között megoszló illékony 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 hatóanyag szobahőfokon nem oldódik, az inkubálási hőmérsékleten még létrejöhet a kívánt oldódása ...

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>

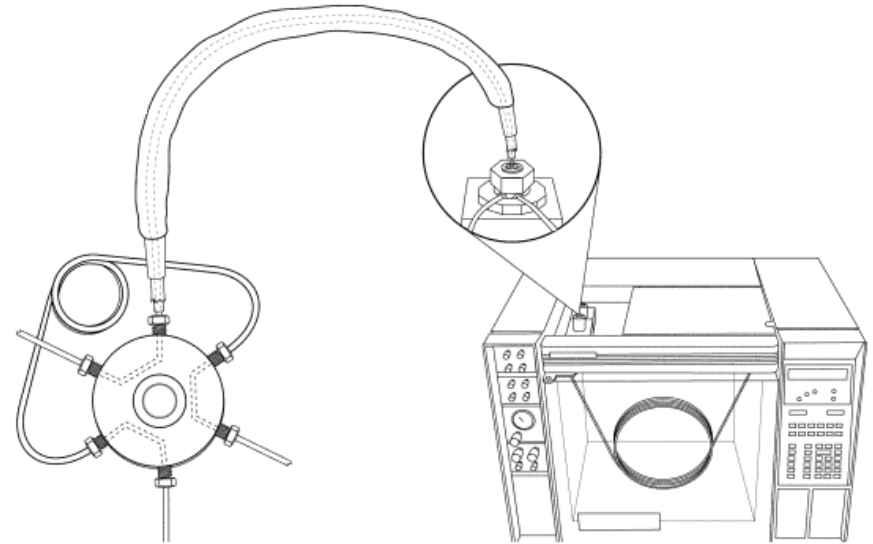
Különböző vegyületek víz és levegő közötti megoszlási hányadosai 40°C-on, tehát mintha vízben oldottunk volna egy hatóanyagot HS méréshez. A poláris vízből az apoláris, illékony molekulák (pl. n-hexán) könnyen kijutnak a gőztérbe, így nagy lesz a módszer érzékenysége és alacsony a kimutatási határ.

A poláris molekulák, melyek szeretik a vizet (pl. etanol) sajnos kevésbé jelennek meg a gőztérben. Oldószer választásnál érdemes ezzel tervezni.

Headspace mintagőz-adagolás

- **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. Az injektált térfogat szabályozható.



Headspace mintaelőkészítés nélküli kromatogramok

HS mintaelőkészítés nélkül, a mintaoldatot közvetlenül injektálva választhatunk illékony oldószert is (pl. diklór-metán). Erre nézve csak az a kritérium, hogy ne éppen azt akarjuk mérni a mintában ill. viszonylag távol eluálódjon a mérendő komponensektől. És persze oldja a mintát.

Közvetlenül injektálva az oldatokat, a hatóanyag *degradálódhat* az injektor hőmérsékletén (~200-300 °C), mely elnyúló, megemelkedett alapvonalat eredményezhet, s elnyomhatja a számunkra hasznos jelet.

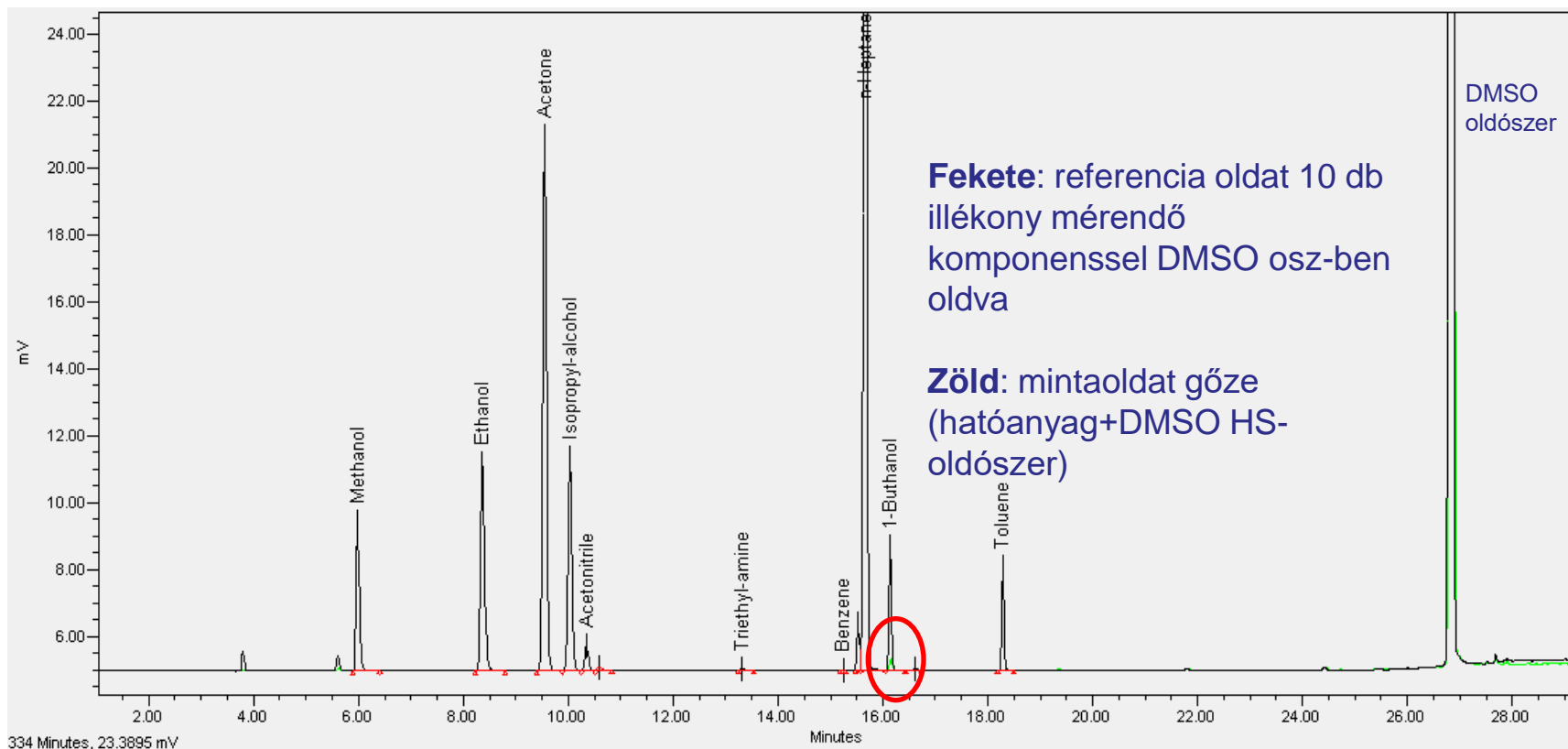


Headspace mintaelőkészítés utáni kromatogramok

Ugyanazt a mintát pl. DMSO-ban feloldva, majd csak 80°C-on melegítve a zöld színű kromatogramot kapjuk. Nincsen elnyúló bomlási csúcs, az alapvonal szép lapos.

A referencia oldatban a mérendő komponensek szép, egyenes alapvonal mellett eluálódnak.

A mintaoldatban lehet látni, hogy a 10 potenciális szennyezőből 1-butanol van jelen (zöld kis csúcs).



2. Kiindulási anyagok/gyártás során keletkező mutagén/genotoxikus vegyületek mérése

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

Határértékeik számítása **ICH M7** alapján, toxikológussal, fejlesztő üzemmérnökkel, orvosszakértővel...

Általános esetben **a maximális genotox napi bevitel $1,5\mu\text{g}$** lehet összesen, ezt mindig a maximálisan beszedhető napi hatóanyag dózissra vetítjük ki, hogy még az a páciens se találkozzon nagy kockázattal, aki a lehető legtöbbet szedi be a gyógyszerből.

Pl. quetiapine hatóanyagból a napi beszedhető dózis maximum 800mg, míg az anasztrozol hatóanyagból ez az érték már csak 1mg. A két érték között két nagyságrend különbség van, mely komoly analitikai feladatot jelenthet.

Azt is figyelembe kell/lehet venni, hogy nem élethosszig tartó alkalmazás esetén nagyobb lehet a genotoxikus bevitel, míg folyamatosan szedett gyógyszer esetén nagyobb a kockázat.

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

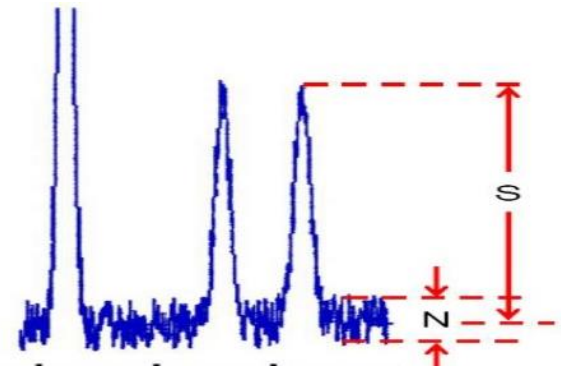
Gyógyszeripari számítás:

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

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
- 1000mg max. hatóanyag dózissnál: 1,5ppm ➡ Viszonylag nehéz mérni

Nagyobb határértékek esetén elegendő lehet a lánionizációs detektálás (FID), míg kis határértékeknél kisebb kimutatási határra van szükség. Ezt biztosíthatjuk elektronbefogási detektorral (ECD) halogéntartalmú vegyületekre, illetve tömegspektrometriás detektorral (MS) univerzálisan minden komponensre.

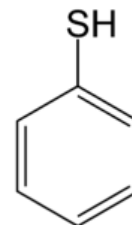
ZH kérdés lehet a FID és az ECD működésének leírása pár mondatban.

2.1. Kevésbé illékony anyagok meghatározása

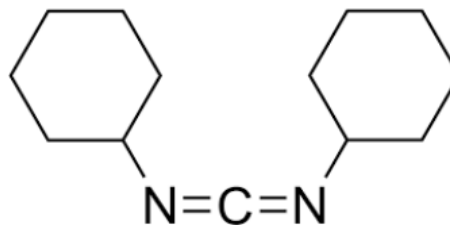
Semi Volatile Organic Compounds (SVOC)

Pl.

Tiofenol (forráspont: 169 °C légköri nyomáson)



N,N-diciklohexil-karbodiimid (forráshőm.: 122 °C vákuumban): igen, néha ilyen vegyület is elpárologtatható, mert elég apoláris



➔ A nagy fp miatt gőztéranalízis nem jöhet szóba

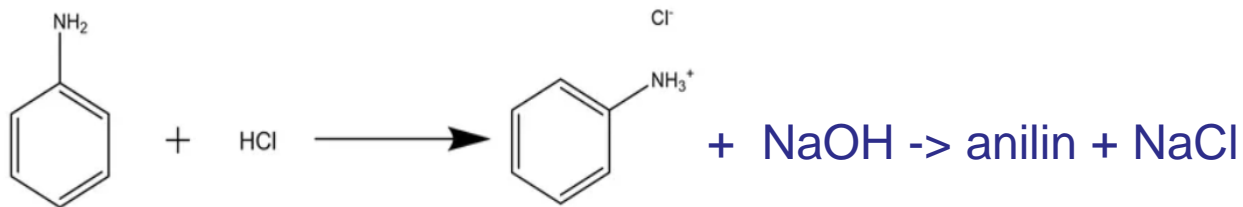
Mérési lehetőségeik:

- Direkt injektálás: ha a hatóanyag mátrix nem bomlik az injektor hőmérsékletén (Isd. 14. dia)
- Folyadék-folyadék extrakció: Szelektívnek kell lennie, a mátrix nem mehet át az extraháló oldószerbe
- GC-MS mérés: Szelektív ionkövetéssel a mintamátrix gyakorlatilag láthatatlan a kromatogramon

Folyadék-folyadék extrakció: Például bázikus karakterű anyagok extrakciója

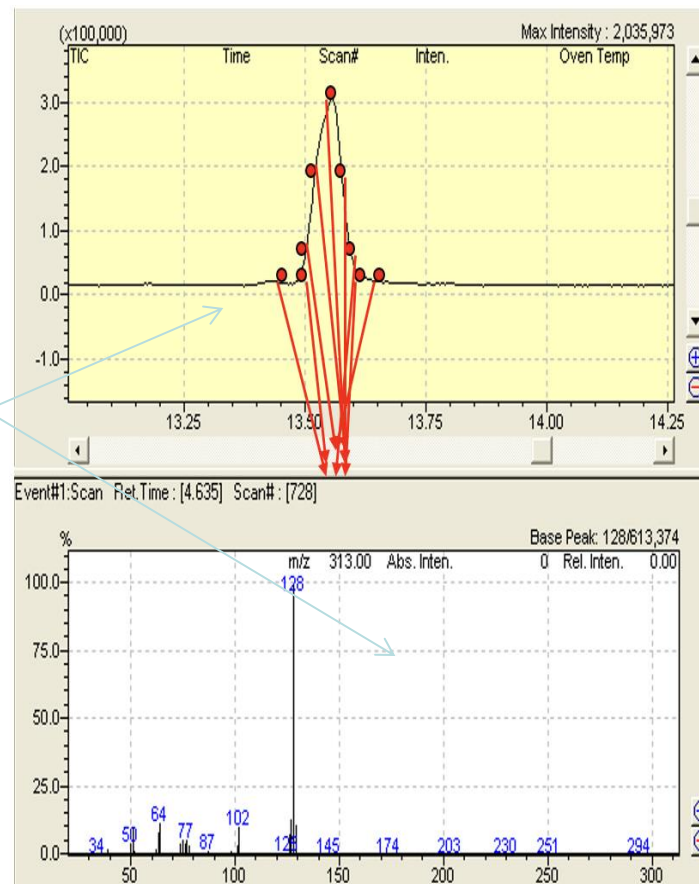
Adott egy hatóanyag mátrix, amelyben anilint kell vizsgálni, s savas vízben feloldódik

- 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
- Lúgos oldat + ciklohexán -> az ionvisszaszorított állapotú anilin szívesen megy szerves fázisba, a mátrix a vízben marad



GC-MS mérés: hogyan lesz a tömegspektrumból kromatogram (TIC)?

- A detektor adott mintavételi frekvenciával folyamatosan vesz fel tömegspektrumokat (alul, m/z =iontömeg/iontöltés szerint pásztázva)
- Minőségi azonosításhoz a normált, relatív intenzitásokat tartalmazó tömegspektrumokat használjuk (alul)
- A kromatogram felépítéséhez, mennyiségi meghatározáshoz az abszolút ionáramokat alkalmazó spektrumokat vesszük figyelembe
- Egy pont a kromatogramon a hozzá tartozó tömegspektrum összionáram-intenzitás értékét adja meg (TIC, total Ion Chromatogram, felül)
- Az MS TIC-kromatogram diszkrét pontokból áll, melyre a szoftver illeszt folytonos görbét (felül)
- Egy csúcs minden pontja ugyanazt a tömegspektrum mintázatot mutatja, ha nincs koelúció (képen naftalin csúcs)



GC-MS-Kromatogram felvételi technikák

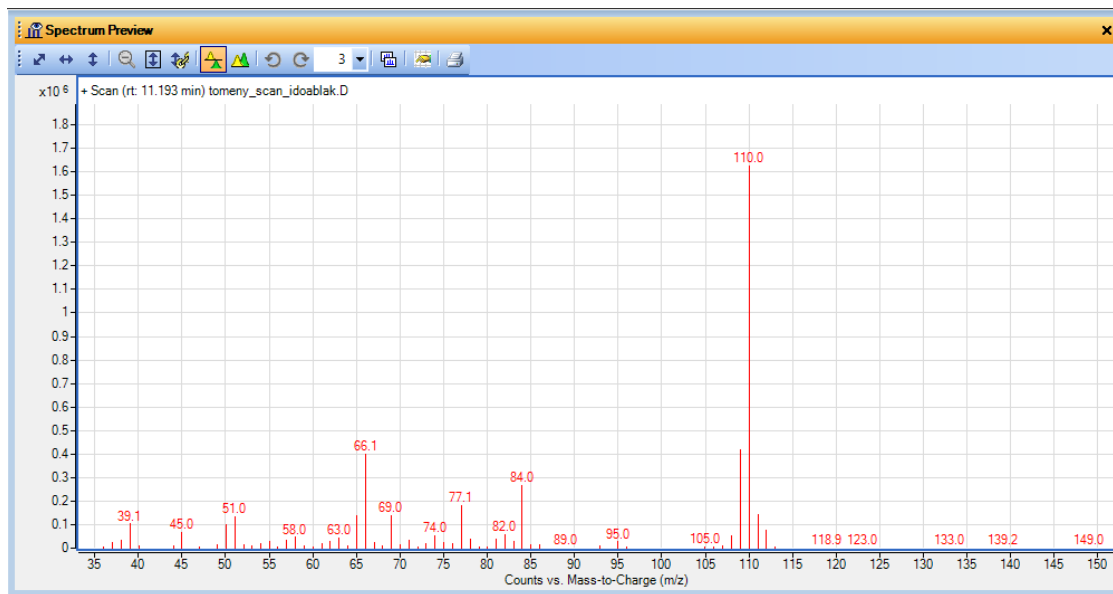
SCAN mód (TIC)

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

SIM mód (SIM)

- Egy vagy két iont mér
- Eredménye a SIM (*Selected Ion Monitoring*) kromatogram
- Csak mennyiségi elemzésre alkalmas
- Adott specifikus iont mérve nagyon kicsi a háttér
- Kiemelkedő jel/zaj viszony érhető el a SCAN technikához képest

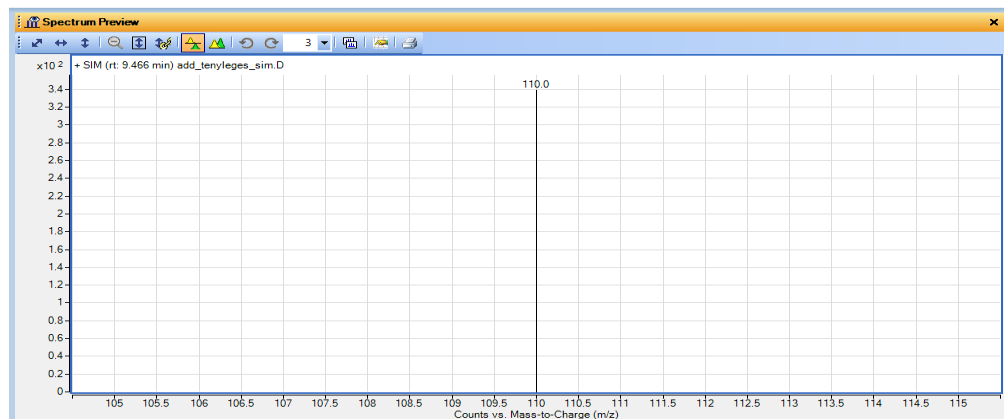
- SCAN esetén egy tömegspektrum:



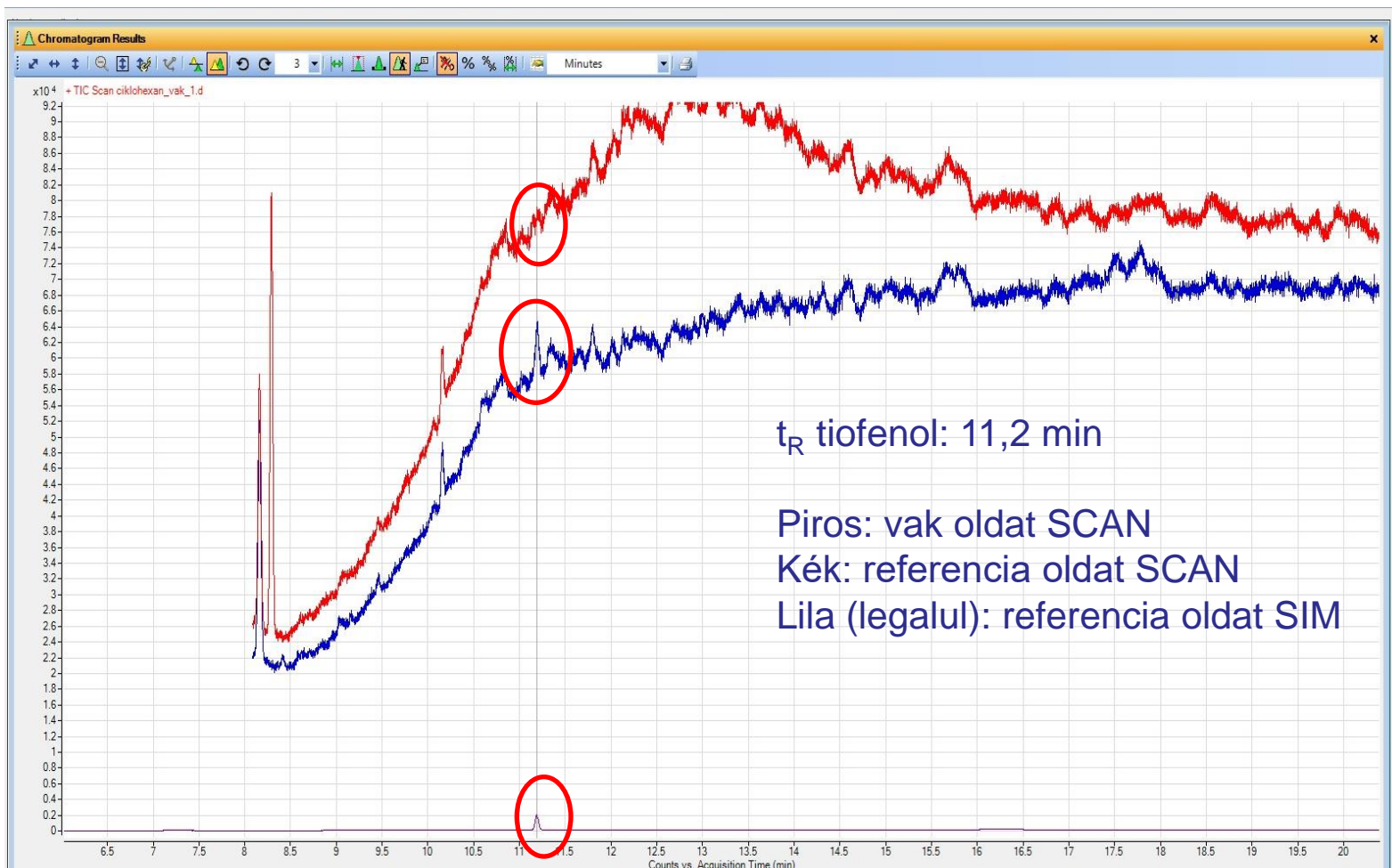
Tiofenol
tömegspektruma

Bázision: 110 m/z

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



A SCAN és a SIM technika közötti különbség látványos az alábbi kromatogramokon. A piros vak oldat csak n-hexánt tartalmaz, de a SCAN technika miatt elég erős az alapvonal zaj értéke. A kék kromatogram a tiofenol referencia oldata, szintén SCAN technikával mérve, LD szintű csúcsot sem kapunk. Ellenben csak a specifikus 110 m/z-t mérve eltüntethető a zaj nagy része, kisimult a kromatogram (lila)



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.

(Nem hosszú és érdekes összefoglaló, gyógyszervegyészeknek mindenképp ajánlom)