

Gyors folyadékkromatográfia; a rövid, kis átmérőjű kolonnák lehetőségei a gyógyszer-analitikában

Tézisfüzet

Fekete Szabolcs

2011.



Richter Gedeon Vegyészeti Gyár NyRt, Fejlesztési Analitikai Osztály



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék

Témavezető: Dr Fekete Jenő, Egyetemi Tanár, Budapesti Műszaki és
Gazdaságtudományi Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék

Konzulens: Dr Ganzler Katalin, PhD, Richter Gedeon Vegyészeti Gyár NyRt,
Fejlesztési Analitikai Osztály

1, Bevezetés

Jelenleg a gyorskromatográfiás technikák virágkorát éljük. Szinte hónapról hónapra jelennek meg az új kolonnák és az egyre nagyobb nyomástartományban működő UHPLC (ultra high pressure liquid chromatography) rendszerek. A Waters Acquity készülék 2004-es debütálása óta ma már számos gyártó rendelkezik, un. ultra-nagynyomású készülékekkel ($p > 400$ bar), a kereskedelmi forgalomban kapható UHPLC rendszerek közül a legerősebbek már 1000 bar felett is (1300 bar) képesek dolgozni. A gyógyszer-analitikában is elengedhetetlen az un. nagy-áteresztőképességű, gyors és hatékony módszerek alkalmazása. A versengő gyorskromatográfiás lehetőségek közül, figyelembe véve a gyógyszeripari minőségbiztosítási követelményeket (módszerek robusztussága, transzferálhatósága, jó felbontóképesség) valamint a költségcsökkentést (kevés oldószer felhasználás) a két előtérbe kerülő technika a (1) rövid, 2 μm -nél kisebb porózus töltetes kolonnák, illetve (2) a héjszerkezetű töltetes kolonnák alkalmazása.

Számos publikáció igazolta, hogy a kis szemcseátmérőjű töltetek ($d_p < 2 \mu\text{m}$) hatékonysága lényegesen jobb, mint a konvencionális kolonnáké ($d_p = 3 - 5 \mu\text{m}$), és ez által rövidebb idő alatt érhetünk el hasonló minőségű elválasztást. Ezen közlemények általában az első kereskedelmi forgalomban megjelent és azóta is legelterjedtebb 1,7 μm -es szemcseátmérőjű kolonnát (Waters Acquity BEH) hasonlítják konvencionális kolonnákhoz és valóban igazolják az elméletet, miszerint ezekkel a kolonnákkal a csúcsfelbontás romlása nélkül lényegesen rövidebb idő alatt valósítható meg az adott elválasztás. Azóta megjelent számos 3 és 2 μm -nél kisebb átmérőjű töltet. Hatékonyságuk vajon csakugyan olyan jó, mint azt az elmélet alapján várhatnánk?

2, Kísérleti rész

Kísérleti munkánk egyik célja az volt, hogy a jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható 1,5 μm - 3 μm -es töltetű kolonnák hatékonyságát összehasonlítsuk. 11 gyártó kolonnáját vetettük össze un. $H - u$ és kinetikus görbék segítségével, különböző valós gyógyszer-analitikai minták felhasználásával. Az eredmény meglepő volt! Tapasztalatunk alapján azt mondhatjuk, hogy 2 μm -nél kisebb szemcseátmérő alkalmazása már nem okoz további hatékonyság növekedést és gyakorlatilag mindegy, hogy 1,5 vagy 2 μm -es a töltet. Továbbá minél kisebb a szemcseátmérő annál nagyobb a redukált tányérmagasság.

A héjszerkezetű töltetek előnye a csökkentett diffúziós úthossz, amely gyorsabb anyagátadást így élesebb csúcsoakat, azaz jobb felbontást biztosít. Az ötlet nagyon régi, Horváth Csaba a 60-as évek végén már készített 50 µm-es átmérőjű héjszerkezetű tölteteket [1,2]. Sokáig nem sikerült kis szemcseátmérőben előállítani héjszerkezetű tölteteket, így egy ideig háttérbe kerültek. Az Ascentis Express (Halo) töltet 2007-es megjelenése forradalmasította a gyorskromatográfiát. Ez volt az első 3 µm-nél kisebb héjszerkezetű töltet (0,5 µm-es diffúziós úthosszal). 2009-ben a Phenomenex cég is előállt egy még kedvezőbb töltet szerkezettel (2,6 µm-es szemcseátmérő, 0,35 µm-es diffúziós úthossz). Publikációk igazolták, hogy ezekkel a 2,6 - 2,7 µm-es héjszerkezetű töltetekkel hasonló tányérszámok érhetőek el, mint a 2 µm-nél kisebb teljesen porózus szemcsékkel, lényegesen kedvezőbb nyomáson [3,4].

Kísérleteink során szisztematikusan vizsgáltuk a héjszerkezetű és teljesen porózus szemcsék hatékonyságát. Több esetben is váratlan eredményeket kaptunk. A 2,7 µm-es Ascentis Express (Halo) kolonna anyagátadási (C) tagja igen nagy. A 2,1 mm átmérőjű Kinetex kolonnák hatékonysága elmarad a várttól ($h_{min} \sim 1,9$), míg a nagyobb átmérőjű 3 mm-es, illetve 4,6 mm-es kolonnák jóval nagyobb hatékonyságot mutatnak. Összességében azonban megállapítottuk, hogy a 2,6 és 2,7 µm-es héjszerkezetű töltetek jól alkalmazhatók a gyógyszer-analitikában és méltó vetélytársai a 2 µm-nél kisebb teljesen porózus tölteteknek.

A gyógyszer-analitikában nemcsak a gyors módszerek megléte, hanem azok gyors kifejlesztése is szükséges. Jelenleg több szisztematikus folyadékromatográfiás módszerfejlesztési megközelítést alkalmaznak, ezek közül gyógyszer-analitikában a számítógépes szimulációval támogatott un. alapfutásokra épülő – molekulaszemcsék ismeretét nem igénylő – módszer a legelterjedtebb [5,6]. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a szimulációs szoftver (DryLab) segítségével, amennyiben 5 cm x 2,1 mm-es kolonnákat alkalmazunk, a módszerfejlesztés időigénye körülbelül harmadára – ötödére csökken.

A méréseket a Richter Gedeon Vegyészeti Gyár NyRt, Készítményfejlesztési Főosztályának a Fejlesztési Analitikai Osztályán végeztük.

A kromatográfiás mérések Waters Acquity UPLC rendszeren történtek. A mérésekhez nagy tisztaságú oldószereket (ioncserélt víz, gradiens minőségű oldószerek) használtunk. A kromatográfiás rendszer vezérlését és a kromatogramok kiértékelését Empower szoftverrel végeztük. A szimulációval támogatott módszerfejlesztéshez DryLab 2010 szoftvercsomagot alkalmaztunk. A számolásokat Excel 2007, Statistica 9 valamint a Kinetic Plot Method nevű Excel makróval végeztük.

A kísérletekben felhasznált analitikai oszlopok egy jelentős részét tesztelés céljából kaptuk a hazai forgalmazóktól, ezúton is szeretnénk megköszönni a segítséget a Gen-Lab, Simkon, LabComp és Bioszeparációs Kft munkatársainak.

Hivatkozások

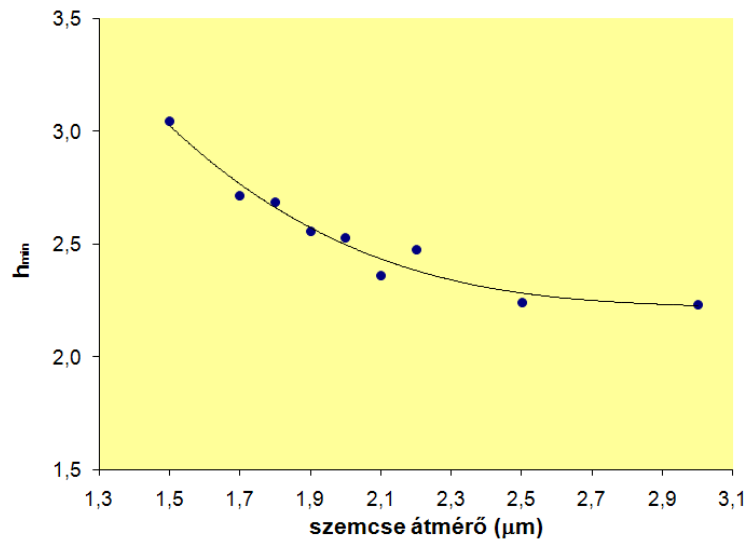
- [1] Cs. Horváth, B.A. Preiss, S.R. Lipsky, Anal. Chem. 39 (1967) 1422
- [2] Cs. Horváth, S.R. Lipsky, J. Chromatogr. Sci. 7 (1969) 109
- [3] J.J. DeStefano, T.J. Langlois, J.J. Kirkland, J. Chromatogr. Sci. 46 (2008) 254
- [4] F. Gritti, G. Guiochon, J. Chromatogr. A 1166 (2007) 30
- [5] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, Practical HPLC Method Development, second edition, John Wiley & Sons Inc, 1997.
- [6] I. Molnár, J. Chromatogr. A. 965 (2002) 175

3, Eredmények, Tézisek

- 1) Kísérletileg igazoltuk, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható 5 cm x 2,1 mm-es, 2 μm -nél kisebb teljesen porózus töltetű kolonnák hatékonysága a gyakorlatban elmarad az elvárt teljesítménytől. Ahogy csökken a töltet szemcseátmérője, úgy nő a különbség a mért és elméletileg elvárható hatékonyság között. 1,5 μm -es töltet esetén már akár 1 μm tányérmagasságot is elveszthetünk.

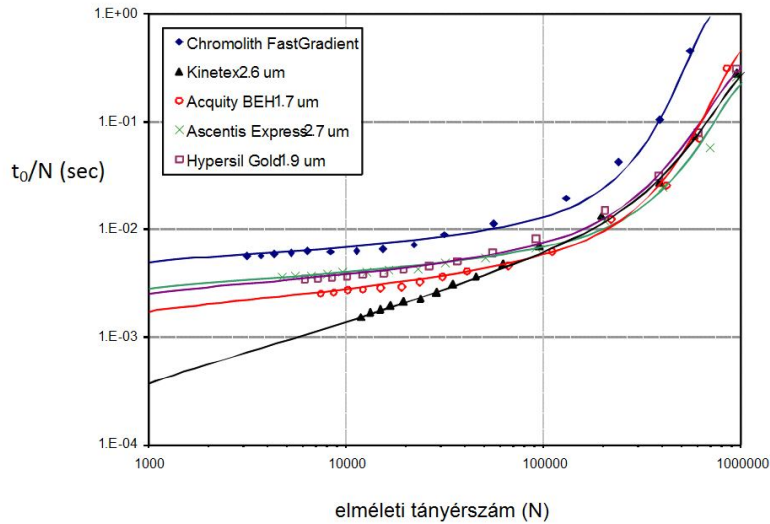
- 2) Amennyiben a töltet szemcseátmérője $d_p < 2 \mu\text{m}$, az áramlási sebesség (lineáris és redukált) optimuma nem javul (nő) tovább.

- 3) A redukált elméleti tányérmagasság minimum értékei a szemcseátmérő csökkenés függvényében, egyértelműen növekednek (1. ábra). Ebből arra következtetünk, hogy az egyre kisebb szemcsékkel nehezebb jól töltött kolonnát előállítani. Ezt igazolja az illesztett függvények (redukált tányérmagasság – redukált lineáris sebesség) A-tagjának egyértelmű változása is.



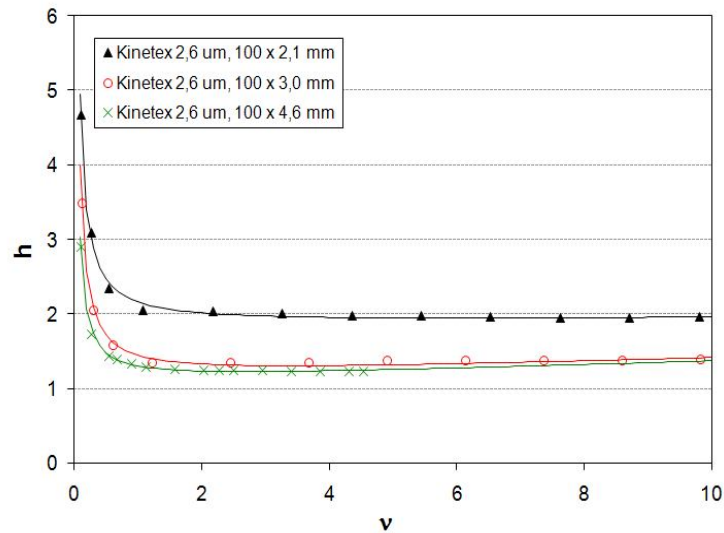
1.ábra: A redukált tányérmagasság minimum értékei a szemcseátmérő függvényében

- 4) A kinetikus görbék módszerével igazoltuk, hogy a 2,6 μm átmérőjű héjszerkezetű ($\rho = 0,73$) töltettel (KinetexTM) a gyakorlatban ($N < 80000$) gyorsabb izokratikus elválasztás valósítható meg, mint 2 μm -nél kisebb teljesen porózus töltetű kolonnákkal (2. ábra).



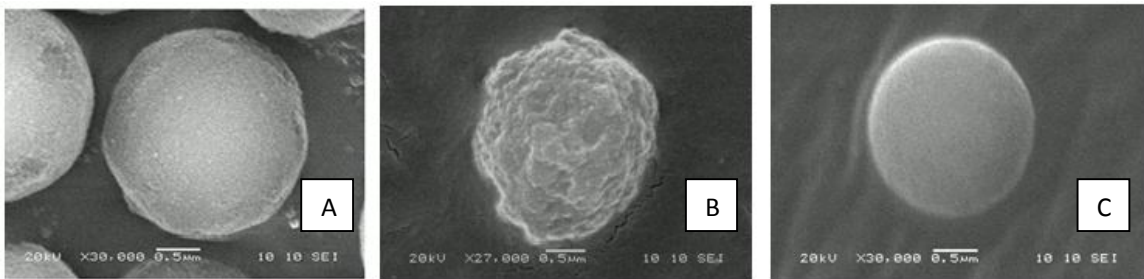
2.ábra: Ivermektin mért $H-u$ adataiból számított "Poppe" görbék

5) A 2,1 mm átmérőjű Kinetex kolonnák hatékonysága elmarad a várttól ($h_{min} \sim 1,9$), míg a nagyobb átmérőjű 3 mm-es, illetve 4,6 mm-es kolonnák jóval nagyobb hatékonyságot mutatnak. Ezen kolonnákkal az elméletileg elvárható $h_{min} \sim 1,2 - 1,4$ redukált tányérmagasság minimum értékeket kaptuk (3. ábra). A 2,1 mm átmérőjű Kinetex kolonnák esetén feltehetően töltési problémák okozzák az elmélettől eltérő teljesítményt. Mindezek ellenére a 2,1 mm-es Kinetex kolonnák még így is nagyobb hatékonyságot mutatnak, mint a $2 \mu\text{m}$ -nél kisebb teljesen porózus töltetű kolonnák.



3.ábra: Különböző átmérőjű Kinetex kolonnák redukált tányérmagasság (h) – redukált lineáris sebesség (v) függvényei

- 6) A hasonlóan héjszerkezetű Ascentis Express ($2,7 \mu\text{m}$, $\rho = 0,63$) és Kinetex ($2,6 \mu\text{m}$, $\rho = 0,73$) kolonnák meglepően eltérő anyagátadási (C) tagot produkálnak. A szemcseméret eloszlásuk hasonlóan jó, viszont - elektronmikroszkópos felvételekkel - jelentős különbség mutatható ki a töltet alakjában és felületi göbösségében (4. ábra). Feltehetően ezzel magyarázható az Ascentis Express kolonnák kedvezőtlenebb anyagátadási tulajdonsága.



4. ábra: Elektronmikroszkópos felvételek: (A) Kinetex, (B) Ascentis Express és (C) Waters BEH töltetek

- 7) Az 5 cm x 2,1 mm-es nagyhatékonyságú kolonnák alkalmazásával a szisztematikus módszerfejlesztési idő jelentősen – körülbelül harmadára, ötödére – csökkenthető. 7 és 21 perces alap-gradiensfutásokat alkalmazva megbízható optimalizálás/számolás várható.
- 8) A kromatográfias módszerfejlesztő szoftverek (DryLab) előrejelzési (predikciós) pontossága még ultra-nagynyomású körülmények ($p > 400 \text{ bar}$) között is igen jó annak ellenére, hogy ebben a nyomástartományban számos a visszatartást befolyásoló „mellékhatással” számolhatunk (kompresszibilitás, viszkozitás változása, hő-effektusok). Ennek megfelelően a gyorskromatográfias módszerfejlesztés során a szimulációs szoftverek jól alkalmazhatók a gyógyszer-analitikai gyakorlatban UHPLC-s körülmények között.

Publikációs lista (Nemzetközi folyóirat)

- Fekete Szabolcs, Fekete Jenő
Fast gradient screening of pharmaceuticals with 5 cm long, narrow bore reversed-phase columns packed with sub-3 μm core-shell and sub-2 μm totally porous particles,
(2011) *Talanta*, Article in press, doi:10.1016/j.talanta.2011.01.053 (IF: 3,290)
- Fekete Szabolcs, Ganzler Katalin, Fekete Jenő
Simultaneous determination of polysorbate 20 and unbound polyethylene-glycol in protein solutions using new Core-Shell RP-HPLC column and condensation nucleation light scattering detection,
(2010) *Journal of Chromatography A*, 1217, pp. 6258–6266 (IF: 4,101)
- Fekete Szabolcs, Ganzler Katalin, Fekete Jenő
Efficiency of the new sub-2 μm core-shell (Kinetex™) column in practice, applied for small and large molecule separation,
(2011) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54, pp. 482–490 (IF: 2,453)
- Oláh Erzsébet, Fekete Szabolcs, Fekete Jenő, Ganzler Katalin
Comparative study of new shell-type, sub-2 μm fully porous and monolith stationary phases, focusing on mass-transfer resistance
(2010) *Journal of Chromatography A*, 1217, pp. 3642-3653. (IF: 3,756)
- Fekete Szabolcs, Ganzler Katalin, Fekete Jenő
Fast and sensitive determination of Polysorbate 80 in solutions containing proteins
(2010) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52 (5), pp. 672-679. (IF: 2,629)
- Fekete Szabolcs, Ganzler Katalin, Fekete Jenő
Facts and myths about columns packed with sub-3 μm and sub-2 μm particles
(2010) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51 (1), pp. 56-64. (IF: 2,629)

- Fekete Szabolcs, Fekete Jenő, Ganzler Katalin
Characterization of new types of stationary phases for fast liquid chromatographic applications
(2009) Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 50 (5), pp. 703-709. (IF: 2,629)
- Fekete Szabolcs, Fekete Jenő, Molnár Imre, Ganzler Katalin
Rapid high performance liquid chromatography method development with high prediction accuracy, using 5 cm long narrow bore columns packed with sub-2 µm particles and Design Space computer modeling
(2009) Journal of Chromatography A, 1216 (45), pp. 7816-7823. (IF: 3,756)
- Fekete Szabolcs, Fekete Jenő, Ganzler Katalin
Validated UPLC method for the fast and sensitive determination of steroid residues in support of cleaning validation in formulation area
(2009) Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 49 (3), pp. 833-838. (IF: 2,629)
- Fekete Szabolcs, Fekete Jenő, Ganzler Katalin
Shell and small particles; Evaluation of new column technology
(2009) Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 49 (1), pp. 64-71. (IF: 2,629)
- A cikk összefoglalója megjelent a Separation Science magazinban:
Shell and small particles; Evaluation of new column technology, (2009) Separation Science, May, p. 12 (research roundup)

Konferencia közlemények

Előadások a dolgozat témájában:

- Fekete Szabolcs, Fekete Jenő
A gyors kromatográfia jelenlegi lehetőségei (Magyar Elválasztástudományi Vándorgyűlés, 2010, Tapolca)
- Fekete Szabolcs, Ganzler Katalin, Fekete Jenő
Korszerű, gyorskromatográfiai eljárások a bioszimiláris készítményfejlesztés területén (Gyógyszer-analitikai Kollokvium, 2010, Siófok)

- Fekete Szabolcs, Ganzler Katalin, Fekete Jenő
Héjszerkezetű töltetek hatékonysága (Kromatográfias Továbbképző Tanfolyam, 2010, Szeged)
- Fekete Szabolcs, Ganzler Katalin, Fekete Jenő
UHPLC; Does the practice always meet the theory (Balaton Szimpózium, 2009, Siófok)
- Fekete Szabolcs, Ganzler Katalin, Fekete Jenő
Héjszerkezetű töltetek hatékonysága és alkalmazása a gyorskromatográfiában (Kromatográfias Továbbképző Tanfolyam, 2009, Szeged)
- Fekete Szabolcs, Ganzler Katalin, Fekete Jenő
Héjszerkezetű és teljesen porózus töltetek hatékonysága (Magyar Elválasztástudományi Vándorgyűlés, 2008, Sárvár)
- Fekete Szabolcs, Ganzler Katalin
Gyorskromatográfias technikák a tisztítás-validálás területén (Magyar Kémikusok Egyesülete, Analitikai Szakülés, 2007, Budapest)

Poszterek a dolgozat témájában:

- Oláh Erzsébet, Kiss Kornélia, Fekete Szabolcs, Fekete Jenő, Ganzler Katalin
Application possibilities for fast chromatographic methods in UHPLC and HPLC systems (Balaton Szimpózium, 2009, Siófok)
- Fekete Szabolcs, Ganzler Katalin, Fekete Jenő
Characterization of new types of stationary phases for fast liquid chromatographic applications (Balaton Szimpózium, 2009, Siófok)
- Fekete Szabolcs, Ganzler Katalin, Fekete Jenő
Átfogó UHPLC módszer, gyógyszer-analitikai tisztítás-validálás céljára (Magyar Elválasztástudományi Vándorgyűlés, 2008, Sárvár)

- Fekete Szabolcs, Ganzler Katalin
Small particles, or „Shell” particles? Comparison of rapid techniques in application of steroid separation (Horváth Csaba emlékülés, 2008, Innsbruck, Ausztria)
- Fekete Szabolcs, Ganzler Katalin
Introducing and comparing rapid HPLC techniques in pharmaceutical cleaning control and validation analysis (Horváth Csaba emlékülés, 2008, Innsbruck, Ausztria)
- Fekete Szabolcs, Ganzler Katalin
Fast analysis of steroids on zirconium-dioxide based stationary phases at elevated temperature (Balaton Szimpózium, 2007, Siófok)
- Fekete Szabolcs, Ganzler Katalin
Comparison of rapid HPLC techniques applied in pharmaceutical analysis (HPLC 2007, 2007, Ghent, Belgium)