

BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR
OLÁH GYÖRGY DOKTORI ISKOLA

**GYÓGYSZERIPARI MINŐSÉGBIZTOSÍTÁSRA SZOLGÁLÓ
INFRAVÖRÖS SPEKTROSKÓPIAI MÓDSZEREK**

TÉZISFÜZET

Szerző: Hanzelikné Szabó Éva
Témavezető: Dr. Gergely Szilveszter
Konzulens: Dr. Salgó András

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék
NIR Spektroszkópia Csoport

Budapest, 2021.

1. Bevezetés és célkitűzés

A gyógyszeripari biotechnológiai folyamatok fejlődése, valamint a végtermékekkel szemben támasztott hatósági előírások szigorodása következtében az utóbbi évtizedekben elterjedt a minőségközpontú fejlesztés, gyártás, ellenőrzés (*quality by design*, QbD), valamint a modern folyamatlemező technológiai eljárások (*process analytical technology*, PAT) alkalmazása. Ezzel együtt megnőtt az igény a nagy áteresztőképességű analitikai módszerek fejlesztésére és felhasználására.

A gyors, roncsolásmentes és automatizálható analitikai technikák közé tartozó rezgési spektroszkópiai módszerek, mint például a közeli infravörös (*near-infrared*, NIR) és a Fourier-transzformációs infravörös (*Fourier transform infrared*, FT-IR) spektroszkópia robusztus és költséghatékony gyógyszeripari termelést tesznek lehetővé. Doktori dolgozatom témája olyan infravörös spektroszkópiai módszerek létrehozása, melyek gyors és roncsolásmentes alternatívát jelentenek a gyógyszeripari minőségellenőrzési folyamatok egyes szakaszain. Ezek a fejlesztések olyan alapanyagok, be nem épülő segédanyagok és végtermékek minőségi, illetve mennyiségi elemzésére irányultak, melyeket jelenleg költséges és időigényes preparatív módszerekkel vagy elválasztástechnikai úton minősítenek. A fejlesztések ezenfelül minden esetben egy-egy, a spektroszkópiai módszerfejlesztések szempontjából kulcsfontosságú kérdéskört emelnek ki.

Céljaimat az alábbi pontokban tűztem ki.

1. Kalibrációs modellek létrehozása különböző optikai konstrukcióval rendelkező közeli infravörös spektrofotométerek (diszperziós, Fourier-transzformációs, diódasoros) alkalmazásával transzdermális gél készítmények hatóanyag-tartalmának monitorozására, transzflexiós mérés technikát és részleges legkisebb négyzetes regressziót felhasználva.
2. Mintaelőkészítést nem igénylő csillapított teljes reflexiós (*attenuated total reflection*, ATR) mérési módszer kidolgozása a közép infravörös tartományban a fehérjék tisztítására alkalmazott preparatív kromatográfiás oszloptöltetek spektroszkópiai karakterizálására és osztályozására.
3. Osztályozó technikák (lineáris diszkriminancia-elemzés, részleges legkisebb négyzetes diszkriminancia-elemzés, osztályanalógiák közvetett modellezése) hatékonyságának összehasonlítása és az optimális eljárás kiválasztása a hőhatásnak kitett emulziós tápoldatporok kísérleti és szimulált közeli infravörös spektrumainak felhasználásával. Stratégia létrehozása a szimulált spektrumokon alapuló modellfejlesztés végrehajtására.

2. Irodalmi háttér

A QbD a fejlesztés szisztematikus megközelítése, amely tudományos eredményeken és minőségi kockázatkezelésen alapulva, a folyamatok megértésén és ellenőrzésén keresztül teszi lehetővé a célul kitűzött termékminőség elérését. Megvalósításának egyik eszköze a PAT, mely a gyártás tervezésének, elemzésének és ellenőrzésének rendszerét jelenti, és a végtermék minőségének biztosítását a kritikus minőség- és teljesítmény-jellemzők időben történő ellenőrzött mérésével segíti elő. Az utóbbi pár évtizedben megjelent tudományos közlemények és a hatósági javaslatok is jól tükrözik, hogy a rezgési spektroszkópiai módszerek (közülük is kiemelve a NIR és a Raman-spektroszkópiát) kiválóan alkalmazhatóak a PAT területén, valamint a QbD és az Ipar 4.0 elvek szerint működő termelő üzemekben, köztük a gyógyszeriparban is.¹

A Nemzetközi Harmonizációs Konferencia (*International Conference on Harmonisation*) Q11-es előírásait figyelembe véve a QbD elvekre épülő folyamat fejlesztésekor a kockázatelemzésnek ki kell terjednie az alap- és segédanyagok, valamint köztitermékek vizsgálatára is, hogy a végtermék minősége szempontjából kritikus összetevőket azonosítsák.² A kulcsfontosságúnak ítélt komponensek tulajdonságait – legyen az akár fizikai, akár kémiai – monitorozni szükséges, ilyenkor pedig előnyös, ha gyors, nagy áteresztőképességű és kis mintaigényű technikákat tudunk alkalmazni. A dolgozatomban bemutatott fejlesztések emlőssejtes tápoldatpor (alapanyag), preparatív kromatográfiás oszloptöltet (technológiai segédanyag) és transzdermális gél készítmények (végtermék) elemzésére irányultak, melyeket jelenleg költséges és időigényes eljárások alkalmazásával minősítenek.

Az emlőssejtes fermentációknál felhasznált tápoldatok ellenőrzését legtöbbször sejttenyésztési tesztek, valamint a kulskomponensek folyadékkromatográfiás módszerrel történő meghatározása alapján végzik, melyek tovább emelik a termelés fajlagos költségeit. Az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügynökségének (*Food and Drug Administration*) biotechnológiai termelésekkel kapcsolatos javaslatai az innovatív adatkezelő eszközök és a PAT technikák bevezetését támogatják a területen.³ Ennek köszönhetően a tápoldatporok ellenőrzésére használt hagyományos minősítési eljárások mellett egyre több helyen alkalmaznak spektroszkópiai technikákat, köztük NIR spektroszkópiát az alapanyagok

¹ T. Eifert et al. (2020) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 412: 2037–2045.

² ICH Harmonized Tripartite Guideline (2012) Development and Manufacture of Drug Substances Q11

³ E.K. Read et al. (2010) *Biotechnology and Bioengineering* 105: 276.

változékonyságának monitorozására, valamint a hosszabb távú tárolásuk során bekövetkező változások kimutatására,⁴ igazolva, hogy a NIR sokváltozós adatelemzési módszerekkel kombinálva gyors, költséghatékony és megbízható eszköz a fermentációs technológiába bekerülő anyagok felszabadítási folyamataiban.

A biotechnológiai gyógyszerek előállítása során kulcsfontosságú a termelt hatóanyag izolálása és mentesítése a fermentáléban található egyéb komponensektől. A termékfeldolgozás fontos technológiai segédanyaga a preparatív kromatográfias oszloptöltet, amely az elválasztási módszer céljától és körülményeitől (pl. affinitás, anioncserés, kationcserés, hidrofób kölcsönhatás kromatográfia) függően eltérő fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkezhet. Ezen segédanyagok karakterizálása és minőségellenőrzése kis térfogatú laboratóriumi teszteléssel történik, mely hosszadalmas, szükség van hozzá a hatóanyagot tartalmazó értékes fermentlére, valamint az esetleges eltérések, nemmegfelelőségek okáról kevés információt szolgáltat.⁵ Ezen okok miatt felmerült az igény egy egyszerűbb, műszeres analitikai módszer kidolgozására, mely a mintaigényt és az analitikai válaszidőt is csökkenteni tudja. A kromatográfias oszloptöltetek vizsgálatára spektroszkópiai technikák, például FT-IR, NIR, ibolyántúli-látható, fluoreszcencia és Raman-spektroszkópia is alkalmazható.⁶ A szakirodalomban található példák többnyire olyan NIR, FT-IR és Raman-spektroszkópiai mérések, melyeket hosszadalmas, legalább 12 órát igénylő mintaelőkészítés előz meg szűrési, mosási és szárítási lépésekkel,⁷ így jelentős előrelépést jelentene egy mintaelőkészítés nélküli mérési módszer megalkotása.

A félszilárd gyógyszerformák, például a transzdermális gél termékek (gyógyszert tartalmazó kenőcsök) minőség-ellenőrzésekor a spektroszkópiai módszereket leginkább minőségi vizsgálatra használják, pedig a spektroszkópiai technikák – beleértve a NIR vagy Raman-spektroszkópiát is – alkalmasak ezen készítmények mennyiségi mérésére is.⁸ A mennyiségi elemzést megcélzó spektroszkópiai publikációk változatosak abból a szempontból, hogy milyen optikai konstrukcióval rendelkező készülékeket alkalmaztak, valamint milyen mintakezelési technikával hajtották végre a méréseket. Több készüléktípus bevonásával végzett kísérlet-sorozat elvégzése teljesebb képet nyújthatna arról, hogy az optikai elrendezés mennyire befolyásolja a transzdermális gélek NIR alapú mennyiségi vizsgálatát.

⁴ C. Hakemeyer et al. (2013) *Biotechnology Journal* 8: 835–846.

⁵ A.T. Hanke M. Ottens (2014) *Trends in Biotechnology* 32: 210–220.

⁶ M. Rüdter et al. (2017) *Journal of Chromatography A* 1490: 2–9.

⁷ M. Andersson, K.G. Knuutila (2002) *Vibrational Spectroscopy* 29: 133–138.

⁸ M. Blanco et al. (2008) *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 33: 409–414.

3. Kísérleti módszerek

3.1. Minták

Transzdermális gél minták (TG): két készítmény mintasorozatai, kétféle hatóanyaggal.

I. készítmény: 1,0% - 3,0% (w/w) hatóanyag-tartalom, 9 kalibrációs szint.

II. készítmény: 0,5% - 2,0% (w/w) hatóanyag-tartalom, 11 kalibrációs szint.

Preparatív kromatográfiás oszloptöltet minták (KO): 22 különböző preparatív kromatográfiás töltet készítményből összesen 42 gyártási tétel.

Hordozó anyagai: agaróz, metakrilát, poli(sztírol-divinil-benzol), porózus üveg.

Felületi funkciós csoportjaik: Protein A, kvaterner amin, N-benzil-N-metil-etanolamin, amin, szulfonát, szulfopropil, szulfo-izobutil, fenil, butil, karboxil, multimodális.

Emlőszejtes tápoldatpor minták (TP): kínai hörcsög petefészek sejtvonal számára kifejlesztett *PowerCHO-2* tápoldatpor (Lonza, Walkersville, MD, USA) előírás szerint tárolva (kontroll), illetve kétfaktoros háromszintes teljes kísérleti terv szerint hőkezelve.

Hőkezelés hőmérséklete: 30 °C, 50 °C, 70 °C.

Hőkezelés időtartama: 1 h, 7 h, 13 h.

3.2. Infravörös spektroszkópiai mérések

A dolgozatomban bemutatott méréseket az infravörös fény két tartományán (közép- és közeli infravörös) három készüléket felhasználva végeztem el, melyek diszperziós (DS), Fourier-transzformációs (FT) és diódasoros (DA) optikai konstrukcióval rendelkeznek (1. táblázat).

1. táblázat: Az egyes kísérletsorozatokban alkalmazott készülékek listája.

(TG: transzdermális gél készítmény; KO: kromatográfiás oszlop töltet; TP: tápoldatpor)

✓ : a dolgozatban bemutatott, sikeres eredményeket nyújtó mérések.

* : tesztelt de bemutatásra nem kerülő mérések.

Mérési tartomány	Optikai elrendezés	Készülék	Kísérlet		
			TG	KO	TP
Középinfravörös (IR)	FT (ATR)	<i>Spectrum 400</i> *	×	✓	×
Közeli infravörös (NIR)	DS	<i>Foss NIRSystems 6500</i> †	✓	×	✓
	FT	<i>Spectrum 400</i> *	✓	×	✓
	DA	<i>Perten DA 7250</i> ‡	✓	×	

* PerkinElmer, Waltham, MA, USA

† Foss NIRSystems, Silver Spring, MD, USA

‡ Perten Instruments, Hägersten, Svédország

A kevés rendelkezésre álló minta megnehezíti a spektroszkópai módszerfejlesztést. Ezért a nyílt forráskódú R programozási nyelv (3.3.1 verzió, R Foundation for Statistical Computing, Bécs, Ausztria) *mvtnorm* programcsomagját használva az egyes készülékeken mért abszorbancia spektrumok alapján szimulált spektrumokat hoztam létre a robusztus modellépítés, valamint a statisztikailag megalapozott döntéshozatal elősegítésére.

3.3. Adatelemzési módszerek

A spektrumok matematikai előkezelésére alapvonal-korrekciós eljárásokat és simítással kombinált másodfokú deriválást alkalmaztam (2. táblázat). A minőségi és mennyiségi elemzések a 3. táblázatban feltüntetett sokváltozós adatelemzési módszerekkel történtek.

2. táblázat: Az egyes kísérletsorozatokban alkalmazott spektrum előkezelések listája.
(TG: transzdermális gél készítmény; KO: kromatográfiás oszlop töltet; TP: tápoldatpor)

Spektrum-előkezelés	Technika	Kísérlet		
		TG	KO	TP
Alapvonal-korrekció	standard normális változó transzformáció (SNV)	✓	✓	
	arányos szóródási korrekció (MSC)	✓		
Simítással kombinált másodfokú deriválás	kapu-rés módszer	✓		✓
	Savitzky–Golay-módszer	✓		

3. táblázat: Az egyes kísérletsorozatokban alkalmazott sokváltozós adatelemzési módszerek listája.
(TG: transzdermális gél készítmény; KO: kromatográfiás oszlop töltet; TP: tápoldatpor)

Cél	Adatelemzési módszer	Kísérlet		
		TG	KO	TP
Mintázatfelismerés	főkomponens-elemzés (PCA)		✓	✓
Osztályozás	PCA-val kombinált lineáris diszkriminancia-elemzés (PCA-LDA)			✓
	részleges legkisebb négyzetes diszkriminancia-elemzés (PLS-DA)			✓
	osztályanalógiák közvetett modellezése (SIMCA)		✓	✓
Regresszió	részleges legkisebb négyzetes regresszió (PLSR)	✓		

4. Eredmények

4.1. Készülék kiválasztása transzdermális gélek NIR spektroszkópiai vizsgálatához

A kétféle összetételű, különböző hatóanyagot tartalmazó transzdermális gél mintákat három különböző optikai konstrukcióval rendelkező NIR spektrofotométerrel mértem. A két készítmény közötti különbség a DS és FT spektrumok 1675-1825 nm és 2150-2400 nm közötti szakaszain, valamint a DA spektrumok 1150-1250 nm közötti tartományán volt megfigyelhető.

A spektrumok és a készítmények hatóanyag-koncentrációja közötti kapcsolatot PLSR alkalmazásával vizsgáltam, a megfelelő matematikai előkezelés kiválasztása a PLSR során nyújtott RMSEC és RMSECV eredmények alapján történt. A két transzdermális készítmény elemzése során azt tapasztaltam, hogy a NIR spektrumra épülő PLSR kalibrációk pontosságára a készítmény összetételén felül nagy hatással van az alkalmazott NIR spektrofotométer típusa is. Az általam vizsgált készítmények esetében a legjobb eredményeket a DA készülék mutatta (4. és 5. táblázat). A modellek regressziós együtthatói alapján igazoltam, hogy a kalibrációk becslési képessége ténylegesen a hatóanyagok rezgési csúcsaihoz köthető.

A kalibrációk eredményeinek megerősítésére szimulált spektrumokra épülő PLSR modelleket is felhasználtam. A DS és DA esetében nem tapasztaltam szignifikáns eltérést az eredeti és a szimulált adatkészlet spektrumaira épülő modellek eredményei között ($p = 0,05$). Az FT modellek teljesítménymutatói nagy szórást mutatnak, mely háttérben az FT spektrumok nagyobb változékonysága állhat.

Ha a DA spektrumokkal kapott 0,040% és 0,144% RMSECV értékeket átszámítjuk a hatóanyag-tartalom célértékéhez viszonyított relatív hibára, akkor az I. készítmény esetén 1,3%, míg a II. készítmény esetén 7,2%-os relatív hibával dolgoztam. Az európai gyógyszerhatóság előírásai szerint a kereskedelmi forgalomba bocsátott készítmények maximum 5%-kal térhetnek el a névleges hatóanyag tartalomtól, az Amerikai Egyesült Államok előírásai ennél megengedőbbek, és $\pm 10\%$ -os ingadozást fogadnak el.^{9,10} A DA esetében bemutatott eredmények azt mutatják, hogy a DA mindkét készítmény esetében alkalmas a $\pm 10\%$ -os hibahatáron belül biztonságosan megállapítani a hatóanyag-tartalmat, az I. készítménynél pedig megfelelő lehet a $\pm 5\%$ -os tűréstartományon belüli értékek igazolására is.

⁹ C.T. Ueda et al. (2009) *Pharmacopeial Forum* **35**: 750–764.

¹⁰ Directive 2001/83/EC. OJ L 311, November 28, 2001.

4. táblázat: Az I. készítmény diszperziós (DS), Fourier-transzformációs (FT) és diódasoros (DA) készülékkel felvett alapspektrumaira és matematikailag előkezelt spektrumaira végzett PLSR eredményei. (LV: látens változók száma, RMSE: becslés standard eltérése, RPD: relatív korrigált tapasztalati szórás, R²: Pearson-féle korrelációs koefficiens négyzete)

		Előkezelés	LV	RMSE	RPD	R ²
DS	kalibráció	—	9	0.095	13.91	0.9948
	kereszt-ellenőrzés			0.261	5.29	0.9642
	kalibráció	SNV Savitzky-Golay 2. derivált	3	0.089	14.85	0.9955
	kereszt-ellenőrzés			0.125	11.03	0.9918
FT	kalibráció	—	6	0.125	10.62	0.9911
	kereszt-ellenőrzés			0.216	6.39	0.9755
	kalibráció	SNV kapu-rés 2. derivált	3	0.083	16.00	0.9961
	kereszt-ellenőrzés			0.130	10.61	0.9911
DA	kalibráció	—	2	0.145	9.15	0.9881
	kereszt-ellenőrzés			0.171	8.05	0.9846
	kalibráció	SNV Savitzky-Golay 2. derivált	2	0.040	32.94	0.9991
	kereszt-ellenőrzés			0.045	30.96	0.9990

5. táblázat: A II. készítmény diszperziós (DS), Fourier-transzformációs (FT) és diódasoros (DA) készülékkel felvett alapspektrumaira és matematikailag előkezelt spektrumaira végzett PLSR eredményei. (LV: látens változók száma, RMSE: becslés standard eltérése, RPD: relatív korrigált tapasztalati szórás, R²: Pearson-féle korrelációs koefficiens négyzete)

		Előkezelés	LVs	RMSE	RPD	R ²
DS	kalibráció	—	8	0.113	8.81	0.9871
	kereszt-ellenőrzés			0.228	4.50	0.9506
	kalibráció	MSC kapu-rés 2. derivált	4	0.135	7.37	0.9816
	kereszt-ellenőrzés			0.193	5.33	0.9648
FT	kalibráció	—	4	0.312	3.19	0.9018
	kereszt-ellenőrzés			0.476	2.16	0.7853
	kalibráció	MSC	3	0.275	3.62	0.9237
	kereszt-ellenőrzés			0.344	2.99	0.8879
DA	kalibráció	—	4	0.161	6.20	0.9740
	kereszt-ellenőrzés			0.185	5.54	0.9674
	kalibráció	SNV kapu-rés 2. derivált	4	0.101	9.83	0.9897
	kereszt-ellenőrzés			0.144	7.13	0.9803

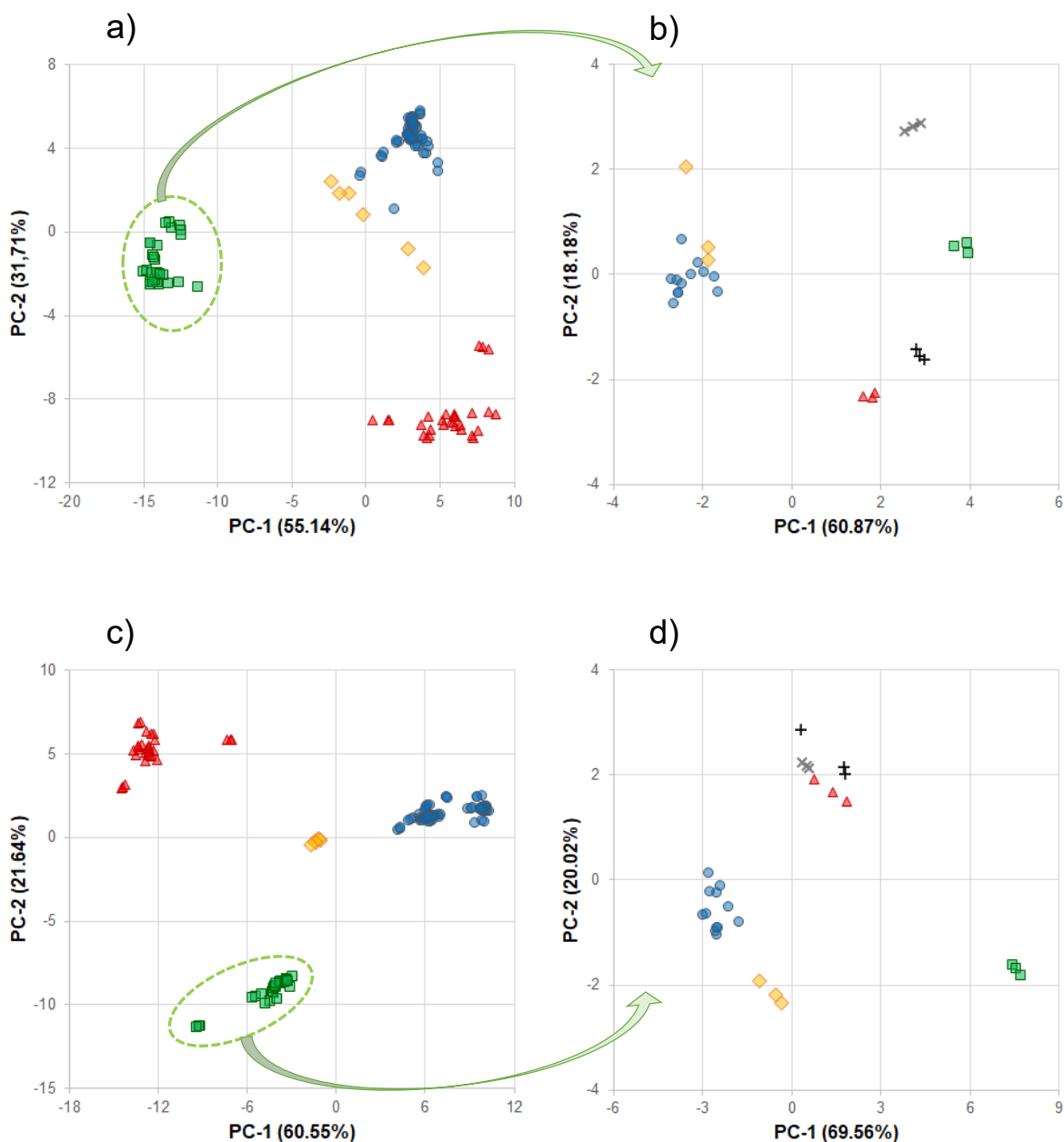
4.2. Mintakezelési technikák a preparatív kromatográfiás oszlopok FT-IR spektroszkópiai vizsgálatához

A kereskedelmi forgalomban elérhető preparatív kromatográfiás oszloptöltetek mérését az eredeti szuszpenziós állagú mintákon közvetlenül (*as is*), valamint a szakirodalmi hivatkozásokban is megtalálható szárítós mintaelőkészítést követően is elvégeztem, hogy tanulmányozzam a mintaelőkészítés nélküli gyors és kis anyagigényű mérés lehetőségét ATR FT-IR technikával.

Hogy a minták elkülönítése során elkerüljem a folyadék fázis O-H kötéseiből tartozó karakterisztikus csúcsok maszkírozó hatását, a spektrumok sokváltozós adatelemzését az 1500-900 cm^{-1} szakaszon folytattam. Ezen a tartományon az *as is* és a szárított minták spektrumai nagyfokú hasonlóságot mutattak. Az alapvonal-eltolódások kiküszöbölése érdekében SNV korrekciót alkalmaztam. A különböző anyagú hordozóval és ligandumokkal rendelkező minták közötti spektrális különbségek feltérképezésére, valamint az *as is* és szárítós mérési módszer összehasonlítására PCA-t használtam, mely eredményei igazolták, hogy a spektrumok információt szolgáltatnak az egyes oszloptöltetek hordozó anyagáról és a rajta lévő ligandumok kémiai tulajdonságairól is, így alkalmasak az ezen tulajdonságaik szerinti osztályozás megvalósítására (1. ábra).

Az egyes töltetcsoportok azonosítását SIMCA modellek alapján végeztem, melyeket a kis mintaszám hatásainak csökkentése érdekében szimulált spektrumok felhasználásával hoztam létre. Az *as is* és a szárított minták modelljei egyaránt magas szenzitivitás (>80%), specificitás (>97%), pozitív prediktív érték (PPV > 88%), és negatív prediktív érték (NPV > 97%) eredményeket nyújtottak a minták besorolásánál, a két mintakezelési technika között pedig nem mutatkozott jelentős különbség.

A PCA és SIMCA eredmények alátámasztják, hogy az *as is* mérés technikával kapott spektrumok hasonló információ tartalommal rendelkeznek, mint a szárítást követően mért minták spektrumai, tehát a hosszadalmas mintaelőkészítés elhagyható. Ezenfelül a mérés mintaigénye csekély (mindössze 20 μl), és pár perc alatt elvégezhető.



1. ábra:

Balra: A kromatográfiás oszloptöltet minták as is (a) és szárítva (c) mért spektrumaira végzett PCA kimeneti ábrái. A szimbólumok alakja és színe a töltetek hordozójának anyagát mutatják:

●: agaróz, ■: metakrilát, ▲: P(S-DVB), ◆: üveg.

Jobbra: A metakrilát hordozójú minták as is (b) és szárítva (d) mért spektrumaira végzett PCA kimeneti ábrái. A szimbólumok alakja és színe a töltetek ligandumjainak jellegét mutatják:

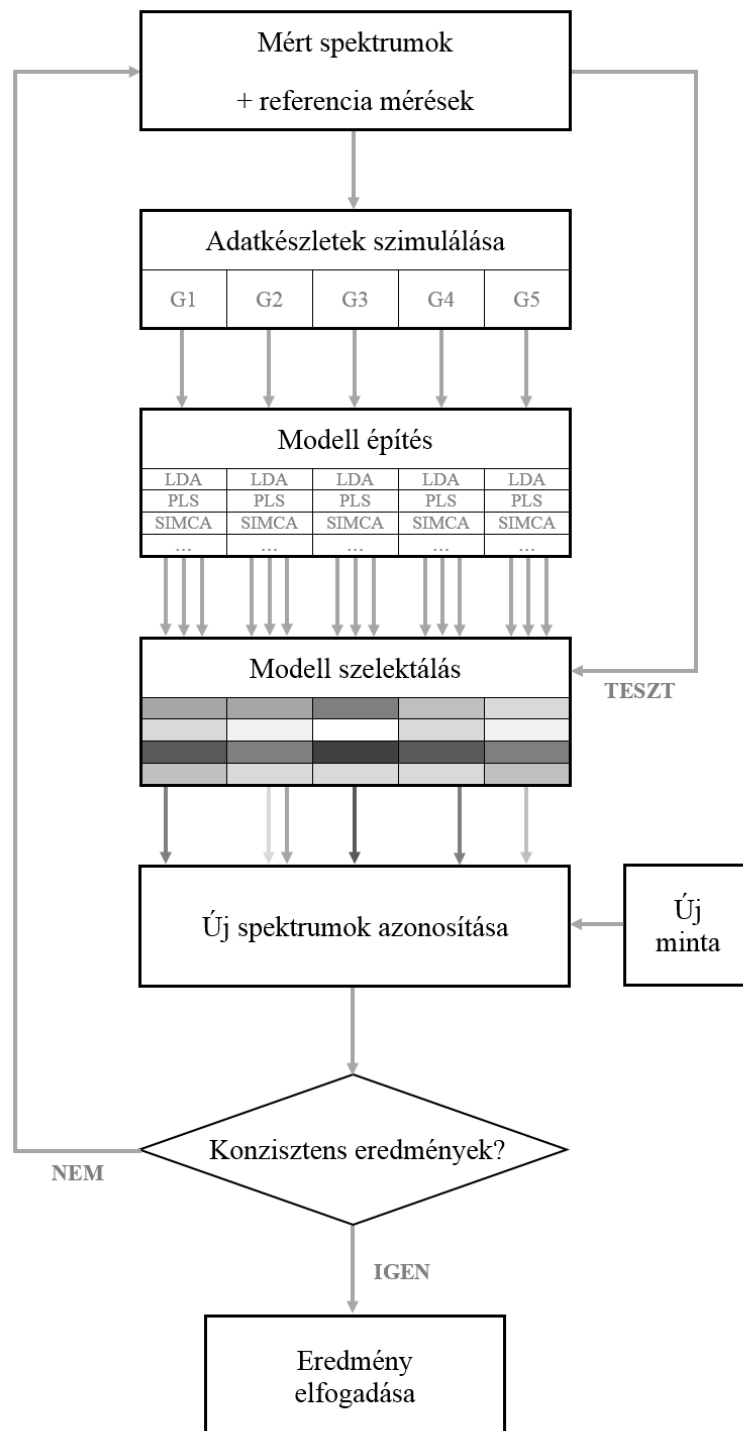
●: szulfo-izobutil, ■: amin, ▲: trimetil-ammónium-etil, ◆: szulfopropil, ×: fenil, +: karboxil.

4.3. Az osztályozási algoritmusok összehasonlítása tápoldatporok NIR spektroszkópiai vizsgálata során

A kétfaktoros, háromszintes kísérleti terv szerint hőkezelt tápoldatporokról DS és FT-NIR spektrumokat rögzítettem. PCA és SIMCA elemzéseket végrehajtva megállapítottam, hogy a hőhatásra bekövetkező változások legjobban a diszperziós NIR spektrumok 2200-2300 nm közötti tartományán mutatkoznak meg. Ezt a spektrális szakaszt felhasználva szimulált spektrumokat hoztam létre, melyeket osztályozási módszerek (PCA-LDA, PLS-DA, SIMCA) összehasonlításához használtam fel.

A PCA-LDA modellekkel a 70 °C-os csoport minden spektruma helyesen felismerésre került, tévesen azonosított (fals pozitív) spektrumok nélkül. Bár a kontroll csoport spektrumait az esetek többségében jó csoportba sorolódtak, pár esetben a kontroll spektrumai az 50 °C-os csoporthoz kerültek, míg az 50 °C-os csoport egyik spektruma mind az öt PCA-LDA modellnél tévesen került besorolásra a kontroll minták csoportjába, kiugró (*outlier*) viselkedést mutatva. A PLS-DA modellek ennél rosszabb helyes és téves osztályozási eredményeket hoztak a spektrumok felismerése során, és még a legnagyobb hőhatásnak kitett 70 °C-os csoport spektrumait sem sikerült megfelelően besorolniuk. A spektrumok SIMCA modelleken alapuló osztályozása jobb eredményeket nyújtott, mint a PLS-DA, de nem érte el a PCA-LDA hatékonyságát. A legtöbb téves besorolás az 50 °C-on kezelt minták csoportjába történt, valamint a 70 °C-on kezelt minták spektrumait több esetben egyik csoporthoz sem tudta hozzárendelni az algoritmus.

A bemutatott eljárás alapján stratégiát javasoltam a szimulált spektrumokra épülő modellek felhasználására (2. ábra). A megfelelően összeállított mintasereg spektrumai alapján több, egymástól független adatkészletet hozunk létre, melyeket modellépítésre alkalmazunk. A kapott modelleket az eredeti, mért spektrumokkal teszteljük, kiválasztva több, jó teljesítmény-mutatókkal jellemezhető modellt. Az újonnan beérkező minták spektrumait e modellekkel osztályozzuk: konzisztens eredmények esetében a minta besorolását elfogadjuk, ellentmondó eredmények esetében pedig spektrumait felhasználjuk a kiindulási spektrumsereg bővítésére, ezáltal reprezentatívabbá téve a szimulált adatkészleteket és az azokra épülő modelleket.



2. ábra: A szimulált spektrumokon alapuló modellépítés és modellfejlesztés folyamatábrája.

5. Tézisek

1. Stratégiát javasoltam a szimulált spektrumokon alapuló modellépítés és modellfejlesztés végrehajtására, olyan esetekben, amikor a kevés rendelkezésre álló minta lassítaná a spektroszkópiai módszerfejlesztést (ld. a téziszfüzet 2. ábrája). A mért spektrumok alapján szimulált adatkészleteket hozunk létre, melyek felhasználhatóak robusztus modellek létrehozására. A párhuzamosan alkalmazott előrebecslő modellek a statisztikailag megalapozott döntéshozatalt segítik elő, a hosszabb távú felhasználás során pedig iteratíván bővíthetők [I, II, III].
2. A biotechnológiai úton előállított fehérjék tisztítására alkalmazott preparatív kromatográfias oszloptöltetek hordozóanyagáról és felületi ligandumjairól kémiai ujjlenyomatokat hoztam létre teljes reflexiós Fourier-transzformációs infravörös (ATR FT-IR) spektroszkópia alkalmazásával. E töltetek rutinszerűen alkalmazott preparatív előteszteléshez képest többletinformációhoz jutunk az olcsó, nagy áteresztőképességű és környezetbarát ATR FT-IR használatával. Rámutattam, hogy a spektrumok 1500 cm^{-1} és 900 cm^{-1} közötti szakasza elegendő információt hordoz az egyes töltet készítmények megkülönböztetésére, megállapításomat főkomponens elemzés eredményeivel is alátámasztottam [I].
3. Mintaelőkészítést nem igénylő csillapított teljes reflexiós Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópiai (ATR FT-IR) módszert alkottam a fehérjék tisztítására alkalmazott preparatív kromatográfias oszloptöltetek vizsgálatára. Bizonyítottam, hogy a szakirodalomban javasolt szárításos mintaelőkészítés elhagyható a töltetek megfelelően kivitelezett ATR FT-IR mérése során, ezáltal a 12 órát meghaladó vizsgálati idő 5-10 percre csökkenthető [I].
4. Kalibrációs modelleket dolgoztam ki két különböző összetételű transzdermális gél készítmény hatóanyag tartalmának a 1,0 – 5,0% (w/w), valamint 0,5 – 3,0% (w/w) közötti meghatározására három eltérő felépítésű készülékkel rögzített közeli infravörös (NIR) spektrumaik alapján. A hat, egymástól függetlenül fejlesztett részleges legkisebb négyzetes regressziós (PLSR) modell pontosságát és robusztusságát szimulált spektrumok felhasználásával bizonyítottam [II].

5. Kimutattam, hogy a NIR spektrofotométer felépítésétől függően (optikai konfiguráció, mérési tartomány, detektor, fényforrás stb.) jelentősen eltérhet a transzdermális gélek mennyiségi vizsgálatára fejlesztett kalibráció pontossága. Az általam tesztelt készülékek közül a diódasoros NIR spektrofotométer spektrumaira épülő PLSR modellek adták a legkisebb átlagos négyzetes hibát a kereszt-ellenőrzés során [RMSECV < 0.15% (w/w)], ezek a modellek alkalmasak az idő- és költségigényes, kevésbé környezetbarát folyadékkromatográfias eljárások kiváltására [II].
6. Kínai hörcsög petefészek sejtek fermentálásához kifejlesztett tápoldatport vizsgáltam diszperziós és Fourier-transzformációs NIR spektrofotométerekkel. Igazoltam, hogy a hőkezelt tápoldatporokban bekövetkező változások legjobban a diszperziós NIR spektrumokon, azon pedig a bioaktív komponensek C-O, C=O, C-H, O-H abszorpciós sávjait tartalmazó 2200-2300 nm közötti tartományán mutatkoznak meg [IV].
7. A NIR tartomány 2200-2300 nm közötti szakaszán létrehozott szimulált spektrumokkal osztályozó modelleket hoztam létre a hőhatásnak kitett tápoldatporok felismerésére főkomponens-elemzéssel kombinált lineáris diszkriminancia-elemzés (PCA-LDA), részleges legkisebb négyzetes diszkriminancia-elemzés (PLS-DA) és osztályanalógiák közvetett modellezése (SIMCA) módszereket alkalmazva. A helyes és a téves osztályozási hányad (CC% és IC%) alapján a PCA-LDA módszer adta a hőhatásnak kitett tápoldatporok kontroll mintától való legjobb megkülönböztetését (CC% > 92%; IC% < 8%), tehát gyors és környezetkímélő technikaként jól felhasználható a nem megfelelően tárolt tápoldatporok azonosítására [III].

6. Alkalmazási lehetőségek

Doktori dolgozatomban olyan infravörös spektroszkópai módszerek fejlesztésének eredményeit mutattam be, melyek gyors és roncsolásmentes alternatívát jelentek gyógyszeripari minőségellenőrzési folyamatok egyes szakaszain. Méréseim olyan alapanyagok, technológiai segédanyagok és végtermékek minőségi és mennyiségi elemzésére irányultak, melyeket jelenleg költséges és időigényes preparatív módszerekkel vagy elválasztástechnikai úton minősítenek.

A transzdermális gélek mennyiségi vizsgálatára létrehozott diódasoros NIR mérési technika a PLSR modelleket alkalmazva kiegészítheti, akár ki is válthatja a mindennapi gyakorlatban alkalmazott költséges folyadékkromatográfiás méréseket.

A preparatív kromatográfiás oszloptöltetek mérésével rámutattam, hogy ATR FT-IR alkalmazásával mintaelőkészítés nélkül, pár perc alatt kémiai ujjlenyomat nyerhető az oszloptöltetekről.

A tápoldatporok spektrumaival bemutatott szimulációs modellfejlesztési technika pedig alkalmazható más megvalósíthatósági tanulmányok esetében is, amikor a sokváltozós modellek optimalálásához szükséges mintaszám nem áll rendelkezésre.

Reményeim szerint az általam prezentált eredmények hosszabb távon elősegítik a gyógyszeripari minőségellenőrző laboratóriumok munkáját gyors, költséghatékony és környezetbarát infravörös spektroszkópai módszereket szolgáltatva, illetve hozzájárulnak az ipari digitalizációt célzó fejlesztések megvalósításához.

7. Közlemények

Tudományos folyóiratokban megjelent közlemények az értekezés témájában

- I É. Szabó, L. Z. Baranyai, Z. Sütő, A. Salgó, S. Gergely (2020): Attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy based methods for identification of chromatography media formulations used in downstream processes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **180**: 11060. DOI: 10.1016/j.jpba.2019.113060 (IF₂₀₂₀: 3.77, I: 2, FI: 1)*
- II É. Szabó, S. Gergely, T. Spaits, T. Simon, A. Salgó (2019): Near-infrared spectroscopy based methods for quantitative determination of active pharmaceutical ingredient in transdermal gel formulations. *Spectroscopy Letters* **52(10)**: pp. 599-611. DOI: 10.1080/00387010.2019.1681459 (IF₂₀₁₉: 0.97, I: 2, FI: 2)
- III É. Szabó, S. Gergely, A. Salgó (2018): Linear discriminant analysis, partial least squares discriminant analysis, and soft independent modeling of class analogy of experimental and simulated near-infrared spectra of a cultivation medium for mammalian cells. *Journal of Chemometrics* **32(4)**: e3005. DOI: 10.1002/cem.3005 (IF₂₀₁₈: 1.79, I: 5, FI: 3)
- IV É. Szabó, L. Párta, D. Zalai, S. Gergely, A. Salgó (2016): Investigation of heat-treated cultivation medium for mammalian cells with near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **24(4)**: pp. 373-380. DOI: 10.1255/jnirs.1222 (IF₂₀₁₆: 1.07, I: 2, FI: 0)

Egyéb tudományos közlemények

- V Á. Mári, G. Bordós, S. Gergely, M. Büki, J. Háhn, Z. Palotai, G. Besenyő, É. Szabó, A. Salgó, B. Kriszt, S. Szoboszlay (2021): Validation of microplastic sample preparation method for freshwater samples. *Water Research* **202**: 117409. DOI: 10.1016/j.watres.2021.117409 (IF₂₀₂₀: 11.3)
- VI G. Bordós, S. Gergely, J. Háhn, Z. Palotai, É. Szabó, G. Besenyő, A. Salgó, P. Harkai, B. Kriszt, S. Szoboszlay (2021): Validation of pressurized fractionated filtration microplastic sampling in controlled test environment. *Water Research* **189**: 116572. DOI: 10.1016/j.watres.2020.116572 (IF₂₀₂₀: 11.3)
- VII E. Kontsek, A. Pesti, M. Björnstedt, T. Üveges, É. Szabó, T. Garay, P. Gordon, S. Gergely, A. Kiss (2020): Mid-infrared imaging is able to characterize and separate cancer cell lines. *Pathology & Oncology Research* **26**: pp. 2401–2407. DOI: 10.1007/s12253-020-00825-z (IF₂₀₂₀: 2.75)
- VIII J. Slezsák, É. Szabó, S. Gergely, A. Salgó (2018): Measuring of food industrial raw materials via polyethylene packages by NIR spectrophotometers using different optical arrangements. *Acta Alimentaria* **47(1)**: pp. 104-112. DOI: 10.1556/066.2018.47.1.13 (IF₂₀₁₈: 0.57)
- IX Südy Á., Szabó É., Salgó A. (2013): Sztevia – egy természetes eredetű édesítőszer. *Élelmiszer Tudomány Technológia* **67(2)**: pp. 27-31.

* IF: impakt faktor a jelölt évben, I: idézők száma, FI: független idézők száma.

Nemzetközi konferencia kiadványokban megjelent összefoglaló (proceeding) az értekezés témájában

- X É. Szabó, S. Gergely, A. Salgó: Multivariate data analysis of near-infrared spectra of cultivation medium powders for mammalian cells. In: S.B. Engelsen, K.M. Sørensen and F. van den Berg (eds.), Proceedings of the 18th International Conference on Near Infrared Spectroscopy. IM Publications Open, Chichester, 2019. pp. 143-150. DOI: 10.1255/nir2017.143

Egyéb konferencia kiadványban megjelent összefoglaló

- XI Slezsák J., Szabó É., Gergely Sz.: Gyógyszeripari alapanyagok polimer csomagolóanyagokon keresztül való mérése különböző optikai elrendezésű NIR spektrofotométerekkel. In: Abonyi J., Klein M., Balogh A. (szerk.), Műszaki Kémiai Napok 2017: Chemical Engineering Conference 2017. Pannon Egyetem, Veszprém, Magyarország, 2017. pp. 91-96.
- XII Gergely Sz., Slezsák J., Szabó É., Kondákor A., Salgó A.: Az infravörös spektroszkópia lehetőségei a csomagolóanyagok vizsgálatában. In: Szigeti T.J., Popovics A. (szerk.), Hungalimentaria 2017 konferencia és kiállítás: Terítéken az élelmiszerek és csomagolóanyagaik. Wessling Hungary Kft., Budapest, Magyarország, 2017. pp. 35-36.

Nemzetközi és hazai konferencia kiadványban megjelent abstract az értekezés témájában

- XIII É. Szabó, S. Gergely, A. Salgó: Multivariate data analysis of near-infrared spectra of cultivation media for mammalian cells. Conferentia Chemometrica (September 3-6, 2017; Gyöngyös-Farkasmály, Hungary). Abstracts: P29
- XIV Szabó É., Gergely Sz.; Salgó A.: Közeli infravörös spektroszkópai módszerek fejlesztése gyógyszeripari minőségbiztosítási célokra. Oláh György Doktori Iskola XIV. Konferenciája (2017. február 2.; Budapest). Abstracts: SzÉ
- XV É. Szabó, S. Gergely, A. Salgó: Investigation of heat-treated cultivation medium for mammalian cells with near-infrared spectroscopy: chemometrics in the service of spectroscopy. 16th Chemometrics in Analytical Chemistry Conference (June 6-10, 2016; Barcelona, Spain). Book of abstracts: Szabo et al.
- XVI Szabó É.: Hőhatásnak kitett emlőssejtes tápoldatporok vizsgálata infravörös spektroszkópai- és preparatív, lombikos minősítési módszerekkel. XXXII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia – Kémiai és Vegyipari Szekció (2015. április 9-11.; Veszprém). Kivonatok: pp. 70-71.