

A TARTALOMBÓL:

- Biológikumok analitikája
- Kromatográfia mikrofluidikai csipekben
- ICP-MS: aktuális irányzatok
- Fotoakusztikus gázdetektálás



MAGYAR KÉMIKUSOK LAPJA

A MAGYAR KÉMIKUSOK EGYESÜLETE HAVONTA MEGJELENŐ FOLYÓIRATA • LXXIII. ÉVFOLYAM • 2018. FEBRUÁR • ÁRA: 850 FT

Analitikai kémia 2018

nka

Nemzeti Kulturális Alap

A lap megjelenését
a Nemzeti Kulturális Alap
támogatja

A kiadvány a Magyar Tudományos
Akadémia
támogatásával készült

Egy drámaian más ICP-MS

A **Thermo Scientific iCAP RQ ICP-MS** analitikai teljesítményben és az egyszerű kezelhetőségben drámaian különbözik a korábbi készülékektől. Az új RQ Cell flatapol technológia a jelenleg elérhető legjobb kimutatási határokat biztosítja a teljes analízis idő akár 50%-os csökkenése mellett. A néhány kattintással elérhető automatizált beállítások segítségével gyorsan fejleszthet megbízható mérési módszereket, anélkül hogy az ICP-MS technika szakértője lenne. Az egyszerű karbantartás és a rendkívül kompakt méretek költséghatékony üzemeltetést biztosítanak.

nyomelem analízisre

• thermofisher.com/icaprq



iCE 3000 AA család
Innovatív dizájn, automatikus váltás a láng és grafitkemence üzemmódok között



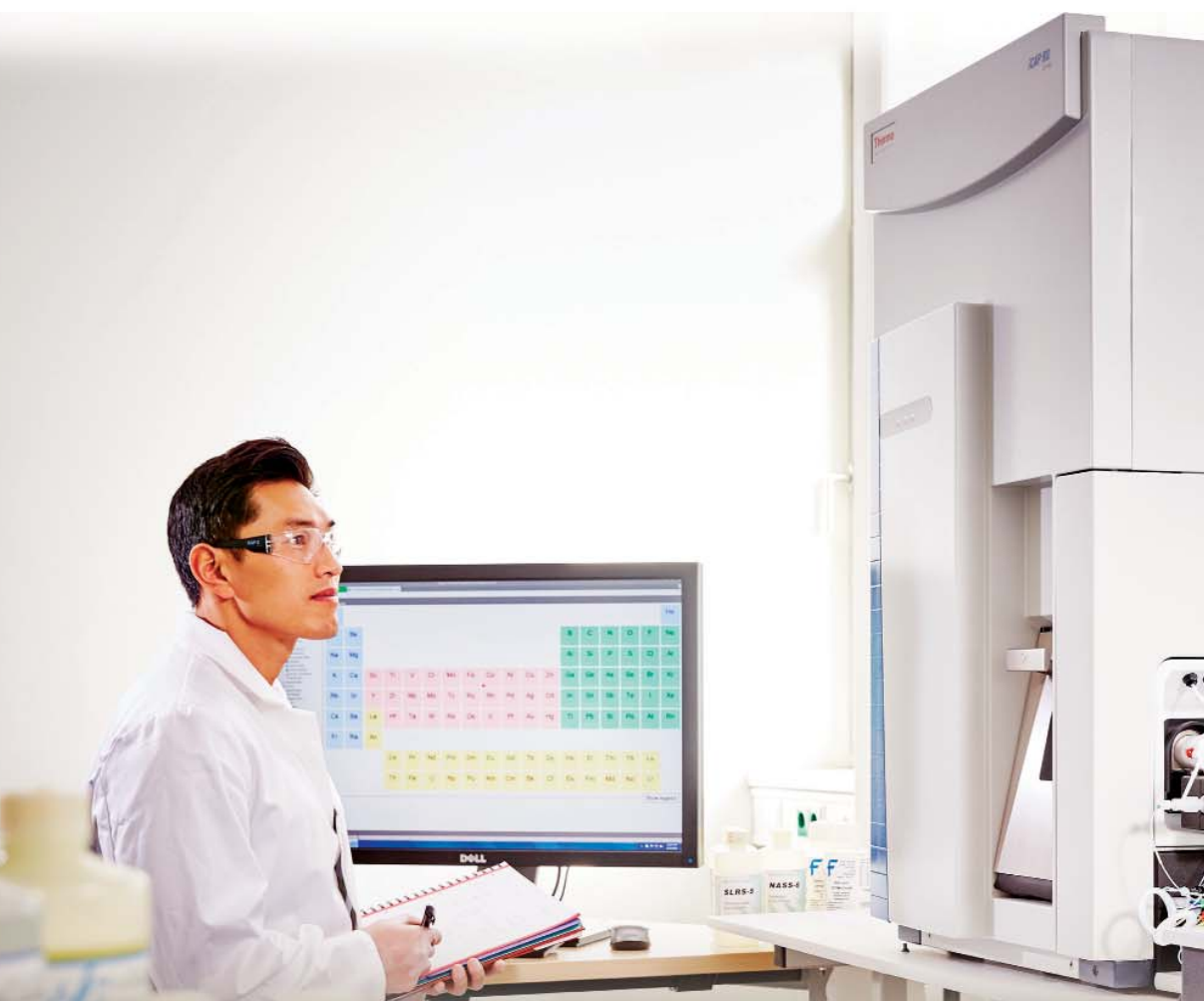
iCAP 7000 Plus ICP-OES család
Az elérhető legnagyobb teljesítményű ICP-OES megbízható rutin multielemes analízisre



iCAP RQ ICP-MS
Kiemelkedő teljesítményre, termelékenységre és egyszerű használatra tervezve



iCAP TQ ICP-MS
Valódi hármas kvadrupol ICP-MS a nagy kihívást jelentő mintákra



Kizárólagos képviselet:

UNICAM Magyarország Kft.

1144 Budapest, Kőszeg utca 27.

Telefon: +36 1 221 5536 • Fax: +36 1 221 5543

E-mail: unicam@unicam.hu • Web: www.unicam.hu

UNICAM



MAGYAR KÉMIKUSOK LAPJA

HUNGARIAN CHEMICAL JOURNAL

LXXIII. évf., 2. szám, 2018. február



A Magyar Kémikusok Egyesületének
– a MTE SZ tagjának –
tudományos ismeretterjesztő
folyóirata és hivatalos lapja

Szerkesztőség:

Felelős szerkesztő: KISS TAMÁS
[SEKERES GÁBOR] örökös főszerkesztő,
Olvasószerkesztő: SILBERER VERA
Tervezőszerkesztő: HORVÁTH IMRE

Szerkesztők:

ANDROSITS BEÁTA, BANAI ENDRE,
LENTE GÁBOR, NAGY GÁBOR,
PAP JÓZSEF SÁNDOR, RITZ FERENC,
ZÉKÁNY ANDRÁS
Szerkesztőségi titkár: SÜLI ERIKA

Szerkesztőbizottság:

SZÉPVÖLGYI JÁNOS,
a szerkesztőbizottság elnöke,
ANTUS SÁNDOR, BIACS PÉTER,
BUZÁS ILONA, HANCSÓK JENŐ,
JANÁKY CSABA, KALÁSZ HUBA,
KEGLEVICH GYÖRGY, KOVÁCS ATTILA,
LIPTAY GYÖRGY, MIZSEY PÉTER,
MÜLLER TIBOR, NEMES ANDRÁS,
ifj. SZÁNTAY CSABA, SZABÓ ILONA,
TÖMPE PÉTER, ZÉKÁNY ANDRÁS

Kapják az Egyesület tagjai és a megrendelők
A szerkesztésért felel: KISS TAMÁS

Szerkesztőség: 1015 Budapest, Hattyú u. 16.
Tel.: 36-1-225-8777, 36-1-201-6883
Fax: 36-1-201-8056
Email: mkl@mke.org.hu

Kiadja a Magyar Kémikusok Egyesülete
Felelős kiadó: ANDROSITS BEÁTA
Nyomdai előkészítés: Planta-2000 Bt.
Nyomás: Pauker Nyomda
Felelős vezető: VÉRTES GÁBOR
üzgyvezető igazgató

Terjeszti a Magyar Kémikusok Egyesülete
Az előfizetési díjak befizethetők a CIB Bank
10700024-24764207-51100005 sz.
számlájára „MKL” megjelöléssel
Előfizetési díj egy évre 10 200 Ft
Egy szám ára: 850 Ft. Külföldön terjeszti
a Batthyany Kultur-Press Kft.,
H-1014 Budapest, Szentháromság tér 6.
1251 Budapest, Postafiók 30.
Tel./fax: 36-1-201-8891, tel.: 36-1-212-5303

Hirdetések-Anzeigen-Advertisements:
SÜLI ERIKA

Magyar Kémikusok Egyesülete,
1015 Budapest, Hattyú u. 16.
Tel.: 36-1-201-6883, fax: 36-1-201-8056,
e-mail: mkl@mke.org.hu

Aktuális számainak tartalma,
az összefoglalók és egyesületi híreink,
illetve archivált számaink honlapunkon
(www.mkl.mke.org.hu) olvashatók

Index: 25 541
HU ISSN 0025-0163 (nyomtatott)
HU ISSN 1588-1199 (online)
DOI: 10.24364/MKL.2018.02

A lapot az MTA MTMT indexeli, és a REAL,
továbbá az Országos Széchényi Könyvtár
(OSZK) Elektronikus Periodika Adatbázisa
és Archivuma (EPA) archiválja

Az analitikai kémia a kémia egyik legfontosabb alkalmazott tudományterülete. A mit? és a mennyit? kérdések megválaszolásának tudománya, a minta pedig lehet bármi: egy elem előállításához szükséges érc, melyben az illető elem koncentrációja a fontos adat számunkra; biológiai minta, melyben a diagnosztikailag fontos komponensek mennyiségére vagyunk kíváncsiak; levegőminták, melyben a káros anyagok mennyiségét akarjuk meghatározni; esetleg játék, mert a forgalomba hozatal előtt el kell dönteni, hogy nem tartalmaz-e a gyermekek számára káros adalékanyagokat. Ezek csak kiragadott példák, a sor még folytatható, de talán ezek a példák is szemléltetik, hogy az analitikai kémia életünk szinte minden területén megjelenik. Ezért is fordítunk kiemelt figyelmet az analitikai kémia oktatására – talán nem csak az egyetemeken. Ezt nem jósztunkból tesszük; ez a társadalmi elvárás. Akármilyen felmérést nézünk, analitikai kémiai szakirányú ismeretekkel rendelkező végzős hallgatóink, vegyészek vagy vegyész-mérnökök, könnyen el tudnak helyezkedni ma Magyarországon, de szerte a nagyvilágban is.

Hazánk bővelkedett híres analitikusokban – egy egész oldal is kevés volna a felsorolásukhoz, de néhányukat feltétlenül meg kell említeni: Winkler Lajos, Schulek Elemér, Szabellédy László, Erdey László, Pungor Ernő.

Az analitikai kémiai laboratóriumok képe az utóbbi ötven évben alaposan megváltozott. Korábban üvegeszközök, pipetták, büretták, lombikok, színes oldatok, gázfejlődés és csapadékok jellemezték az analitikai laboratóriumok világát. Ma már ezekkel ritkábban találkozunk. Sokkal inkább műszerek, nagyon is szofisztikált műszerek, számítógépek népesítik be a légkondicionált analitikai laboratóriumokat. A mérés sokszor automatizált, a minta előkészítése sokkal bonyolultabb, az eredmények kiértékelése szintúgy. Sokszor a mérési adatok értelmezése jelenti az embert próbáló analitikusi feladatot. A 21. századra megváltozott az analitikai kémia tudománya. Erről szól lapunk jelen száma.

A szám szerkesztésére a terület három szakértőjét kértem fel. Engedjék meg, hogy röviden bemutassam őket.



Kővér Katalin a Magyar Tudományos Akadémia rendes tagja, a Debreceni Egyetem egyetemi tanára, az NMR-spektroszkópia nemzetközi hírű szakértője. Kutatásai egyrészt az NMR-módszer teljesítőképességének kiterjesztését szolgáló módszerfejlesztő tevékenység, másrészt a fehérjék szerkezetének, biológiai rendszerekben való kölcsönhatásainak, mozgásainak tanulmányozása.



Galbács Gábor az MTA doktora, a Szegedi Tudományegyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékének tanszékvezető egyetemi docense, a spektrokémiai módszerek nemzetközileg elismert művelője. Kutatásai kiterjednek a lézer- és plazmaalapú műszerek és analitikai eljárások fejlesztése, valamint a plazmadiagnosztika, a nyomelem-analitika és a spektroszkópiai adatkiértékelés területére.



Ritz Ferenc nyugdíjas vegyész-mérnök, a magyar vegyipar jó ismerője – dolgozott legfontosabb vállalatainál: a Tiszai Vegyi Kombinátban, a Tiszai Kőolajfinomítóban, a Chinoinban, a Richterben. Munkája a közvetlen termelésirányítástól, a technológia-fejlesztésen át a környezetvédelmi-biztonságttechnikai felügyeletig terjedt. Fő érdeklődési területe a környezetvédelmi analitika.

Tematikus számunkhoz jó olvasást kívánok!

Szeged, 2018. február

Kiss Tamás

Kiss Tamás
felelős szerkesztő

TARTALOM

ANALITIKAI KÉMIA – 2018

- | | |
|--|-----------|
| Kővér Katalin, Ritz Ferenc, Galbács Gábor: Szerkesztői köszöntő | 38 |
| Urbányi Zoltán: A biológikum-analitika kihívásai | 39 |
| Bihari Zsolt, Bagdi Attila, Baginé Timári Sarolta, Háda Viktor: Terápiás fehérjék karakterizálása: az elsődleges szerkezet vizsgálata tömegspektrometriával | 43 |
| Kiss Róbert, Fizil Ádám, Szántay Csaba: Az NMR-spektroszkópia szerepe a biológikumok analitikájában | 49 |
| Gáspár Attila: Kromatográfiás töltetek alkalmazása mikrofluidikai csipekben | 56 |
| Braun Mihály, Galbács Gábor: Aktuális kutatási irányzatok az induktív csatolású plazma tömegspektrometriában | 60 |
| Bozóki Zoltán, Szabó Anna, Ajtai Tibor, Szabó Gábor: A fotoakusztikus gázdetektálás gyakorlati alkalmazásai | 64 |



Címnap:
Analitikai kémia
– 2018
A borítóképen:
Orosz Tímea
Fotó: Miklós Gergő

Analitikai kémia – 2018

A kereskedelembe beszerezhető, automatizált és egyre kifinomultabb, érzékenyebb, sokoldalúbb analitikai mérőműszerek, valamint a számítógépes adatkiértékelés gyors ütemű fejlődése láttán mostanában egyre több vegyészkollégában felmerül a kérdés, hogy fejlődik-e még az analitikai kémia mint kutatási terület, szükség van-e még analitikai kémikusokra. (Példaként csak egyetlen, néhány évvel ezelőtt megjelent vitaindító cikket idéznénk: Görög Sándor: Quo vadis, analitika? Quo vadis, analitikus? Magyar Kémikusok Lapja (2009) 64, 307–311.) Ezek a kérdések rövid megfontolás után önmagukat válaszolják meg, ha azt is megkérdezi magától az ember, hogy kik fejlesztik ki most is azokat az újabb és újabb analitikai eljárásokat, protokollokat, amelyeket oly sokan alkalmaznak a mérőműszereket használva.

Érthető azonban, hogy a modern analitikai kémiával nem kutatásszerűen foglalkozókban felmerülnek ezek a kérdések, hiszen valóban történtek jelentős változások ezen a tudományterületen. Igaz, az elmúlt egy-két évtizedben az analitikai kémia több „hagyományos” alapkutatási irányzata óriásit veszített jelentőségéből (például a titrimetria, a gravimetria, az elektroanalitikai módszerek egy része), de több más, főként műszeres analitikai alapkutatási terület, amely érzékeny és szelektív módszerekkel foglalkozik, igen jelentősen megerősödött. Idetartozik elsősorban a spektroszkópia (ezen belül is főként a lézeralapú és/vagy tömegspektrometriás módszerek, szerkezetvizsgáló eljárások), az elválasztástechnika és a szenzorika. Nem is beszélve arról, hogy a tudományban előretörték azok a tudományterületek is (például az anyagtudomány és a bioanalitika), amelyek haladása, sikere nagymértékben nyugszik az új analitikai vizsgálati eljárások teljesítőképességén – ezen eljárások tökéletesítésén pedig sok analitikai kémikus (is) dolgozik.

Példa lehet a tavaly szeptemberben Budapesten tartott Molecular Frontiers Szimpózium, amelynek középpontjában a fehérjék gyógyításban betöltött szerepe állt, és ahol három Nobel-díjas, a 2001-es év egyik orvosi díjazottja, Timothy Hunt, a 2013-as év egyik kémiai kitüntetettje, Arieh Warshel és Kurt Wüthrich tartott előadást. Röviden idézzük a vele készült interjúból.

Hatezer hivatkozás – Kurt Wüthrich svájci biofizikus, kémikus

Részlet

– A PhD-fokozatát szerves kémiai témában szerezte. Ezután fordult a biológia és a biokémia felé. Mit javasol, a pályakezdő kémikusok milyen irányba specializálódjanak?

– Nem tudom, hogy mit tegyenek a vegyészek. Fizikusnak tartom magam, annak ellenére is, hogy 2002-ben kémiai Nobel-díjat kaptam. Amit én javaslok, hogy akit ez a terület érdekel, az fizikát és kémiát tanuljon, amit matematikai és informatikai tudással erősít, mert akkor biológiai és orvosbiológiai kutatásokban is eredményes lehet.

– Mit tart legfontosabb eredményének?

– Sokak szerint megnyitottam az utat a fehérjék térszerkezetének NMR-spektroszkópiával, oldatfázisban történő vizsgálatához. A Nobel-díj-bizottság is ezzel – „olyan magmágneses rezonanciaspektroszkópiai módszer kifejlesztéséért, amely lehetővé teszi az oldott biológiai makromolekulák háromdimenziós struktúrájának meghatározását” – indokolta 2002-ben a kémiai Nobel-díjamat.

Ötvös Zoltán (magyaridok.hu, 2017. szeptember 4.)

Statisztikai szempontból bátran állítható, hogy a természettudományos eredmények kétharmada bizonyosan valamilyen analitikai kémiai műszer vagy eljárás segítségével születik meg (más szavakkal, az analitikai kémia egyike a fontos „science-enabling” területeknek). Ezzel szemben analitikai kémiai alapkutatással (új műszerek és radikálisan új eljárások fejlesztésével) ma már viszonylag kevesen foglalkoznak még az analitikusok közül is – becslésünk szerint ezek aránya 20–30%-nál biztosan nem több sem itthon, sem külföldön. Igen, az analitikai kémia tudományterülete átalakulóban van, de nemhogy hanyatlana, hanem virágzik.

A mostani tematikus szám a fenti állítások egyfajta illusztrálásra vállalkozik, amikor az analitikai kémiai alapkutatásokat folytató hazai kutatóműhelyek által írt közleményeken keresztül röviden bemutatja néhány, a világon nagy intenzitással kutatót és itthon is nemzetközi jelentőségű eredményeket elérő, korszerű kutatási terület jelenlegi helyzetét, irányzatait. A cikksorozatba tartozó, analitikai szenzorok területéről készült közlemény, a lapszám terjedelmi korlátai miatt, egy későbbi számban jelenik meg.

Debrecen–Budapest–Szeged, 2018. február

Kövér Katalin, Ritz Ferenc, Galbács Gábor

a tematikus szám szerkesztői

Urbányi Zoltán

■ Richter Gedeon Nyrt.

A biológikum-analitika kihívásai

A fehérjemolekulákat hatóanyagként tartalmazó gyógyszerek (biológikumok) elterjedése és felfutása az 1990-es években kezdődött és napjainkban is tart. 2014-os adatok szerint a világ 10 legnagyobb árbevételű gyógyszere közül 7 biológikum volt. Az ilyen gyógyszerek sikerét elsősorban a kismolekulákénál nagyobb specificitásuk és hatékonyságuk indokolja. Ezek a gyógyszer-molekulák nagy affinitással és nagy szelektivitással képesek felismerni a célmolekulát, ami lehet sejtfelszíni vagy szolubilis antigén, receptor, vagy akár a receptor ligandja. Ezen hatóanyagok nagy hatékonysága és mérete, szerkezetének komplexitása természetesen nem független egymástól. Mit értünk nagy méret és komplexitás alatt? Hogyan befolyásolja ez a gyógyszer-molekula biológiai aktivitását és persze az analitikus munkáját? Jelen cikkben erről kívánok rövid áttekintést nyújtani.

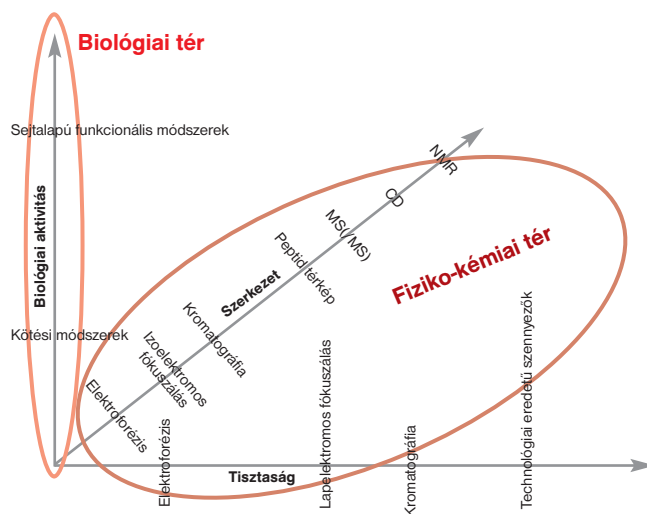
Első megközelítésben a fehérjék és az egyéb szerves molekulák kémiaiilag nem sokban különböznek. Egyaránt szén, hidrogén, nitrogén, kén, esetleg foszfor vagy fémionok építik fel, a molekulákban lévő kötéstípusok is megegyeznek a szerves kémiában ismert kötéstípusokkal. Mi tehát a különbség? Tényleg a méret a lényeg? Részben igen.

Ha közelebbről megnézzük ezeket a molekulákat, látjuk, hogy míg a Vinpocetin huszonnégy szénatomot tartalmaz, addig egy közepes méretű terápiás fehérje, a Filgrastim nyolcszáznegyvenötöt, a klinikumban szintén elterjedt monoklonális antitestek pedig több mint háromezer-négyszázat. A nagy méret azonban nagyobb komplexitással, nagyobb változékonysággal is társul. Ennek forrása egyrészt a fehérjék térszerkezetének nagy variabilitása a másod-, harmad- és negyedrendű szerkezeti szinteken, másrészt a poszttranszlációs módosítások és egyéb olyan módosulatok keletkezése, amelyek akár a gyártás közben, akár a fehérje tárolása során is keletkezhetnek.

A poszttranszlációs módosulatok gyakori fajtája a glikoziláció. Az eritropoetin esetében több mint harmincféle glikozilációs változatot írtak le, melyek akár egyetlen kisserelési egységben együttesen is jelen lehetnek. A feldolgozás, illetve tárolás során különböző oxidált, deamidált és egyéb kémiaiilag módosított variánsok keletkeznek, ami tovább növeli a gyógyszer-molekula összetettségét. Steven Kozlowskinak, az FDA munkatársának becslése szerint monoklonális antitestek esetében a különböző variánsokból együttesen mintegy $6 \cdot 10^8$ féle lehet jelen akár egyetlen ampullában [1]. Ezek a számok jól mutatják a biológikum-analitika előtt álló kihívásokat, a feladat bonyolultságát.

Jogosan vetődik fel a kérdés: ilyen fokú komplexitás mellett hogyan lehet esély arra, hogy ezeket a fehérjéket a gyógyszerek esetében elvárt alapossággal, részletességgel és pontossággal vizsgáljuk? Ezt csak akkor tudjuk megtenni, ha az ortogonális mód-

szerek arzenálját vetjük be és a kapott adatokat komplexen értelmezzük, hiszen minden egyes vizsgálat a fehérje jellemzőinek kis részéről ad információt. Méretükből és komplexitásukból adódóan még a modern spektroszkópiai és diffrakciós módszerek sem képesek arra, hogy pontos képet adjanak a molekula háromdimenziós szerkezetéről, ezért a szerkezeti és biológiai aktivitás adatokat együttesen kell értékelnünk. A biológiai aktivitásban tapasztalt eltérések utalhatnak olyan szerkezeti különbségekre, amelyeket fizikokémiai módszerekkel nem tudunk detektálni. Az **1. ábrán** bemutatott 3 dimenziós grafikon ezt hivatott szemléltetni.



1. ábra. A biológiai tér és a fizikai kémiai tér

Ahhoz, hogy gyógyszerhatóanyagunkat megfelelően jellemezzük, a szerkezeti paramétereket, a variánsokat, a szennyezőket és a biológiai tulajdonságokat együttesen szükséges elemezni, és ebből a megfelelő következtetéseket levonni. Bár az állatkísérletek szükségessége az originális biológikumok fejlesztése során nem kérdőjeleződött meg, ez, valamint a hatóságok (EMA, FDA) azon felismerése, hogy az in vivo preklinikai vizsgálatok nem minden esetben relevánsak (gyakran az immunválasz nagy fajspecifitása miatt), az analitikai vizsgálatok mennyisége és súlya jelentősen megnőtt a „hagyományos” kismolekulás gyógyszerek fejlesztéséhez képest.

A különböző hatósági „guideline”-ok jó iránymutatást adnak a biológikumok jellemzéséhez szükséges analitikai vizsgálatok köréről [2, 3]. Ezeket a vizsgálatokat és a lehetséges analitikai módszereket az **1. táblázat** foglalja össze.



1. táblázat. Fehérje gyógyszerhatóanyagok analitikai vizsgálati módszerei

Azonosság/szerkezet	Elsődleges szerkezet	Aminosavsorrend	HPLC–MS/MS, Edman-lebontás
		Aminosav-összetétel	Aminosav-analízis
	Magasabb rendű szerkezet Másodrendű szerkezet Harmadrendű szerkezet		„Far UV–CD” (190–250 nm)
			„Near UV–CD” (250–350 nm)
			Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)
			FT infravörös spektroszkópia
			Hidrogén-deutérium csere (HDX) MS
			NMR
			Röntgendiffrakció
			Konformációs ELISA
	Poszttranszlációs módosítások	Diszulfidhidak	HPLC–MS/MS
			Szabad tiol meghatározása/ Ellman-módszer
		Glikoziláció helye	HPLC–MS/MS
		kvantitatív cukorösszetétel	Fluoreszcens származékképzést követő HILIC–HPLC
		monoszacharid-meghatározás	magas pH-jú ioncserélő HPLC pulzáló amperometriás detektálással
		sziásvartartalom	HPLC
		glikoformák szerkezete	HPLC–MS/MS
Tisztaság/variánsok	Különböző töltésű variánsok	IgG C-terminális Lys-variánsok	Ioncsere-kromatográfia, izoelektromos fókuszálás,
		Deamidáció (Asn, Gln)	HPLC–MS
	Oxidáció		HPLC(–MS)
	N-terminális piroglutamát-képződés		
	Eltérő méretű variánsok	Dimer, trimer	Méretkizárásos kromatográfia, analitikai ultracentrifuga, fényszóráson alapuló módszerek, mikroáramlásos képalkotás (microflow imaging, MFI)
		Nagy aggregátumok	
		Fragmensek	Méretkizárásos kromatográfia, HPLC–MS
Hatóanyag-tartalom		Koncentrációmérés	RP–HPLC, Protein A–HPLC (IgG), UV-abszorbanca
		Extinkciós koefficiens meghatározása	Aminosav-analízis
Biológiai aktivitás	Kötésen alapuló módszerek	Receptor-ligand	Felületi plazmonrezonancia (SPR), bioréteg-interferometria (BLI), ELISA
		Atigén-antitest	
		Fc-receptorok	
		Komplement komponensek) (C1q	
	Sejtalapú módszerek	Receptor- aktiválás/gátlás	ADCC CDC Hatásmechanizmustól függően
		IgG Fc-funkciók	
		Egyéb	



Mindenekelőtt meg kell határoznunk, milyen paramétereket szükséges vizsgálnunk termékünk jellemzéséhez. A szóba jöhető minőségi jellemzők (quality attributes) közül kockázatértékelés keretében meg kell határoznunk a kritikusakat (critical quality attributes, CQA). Ennek során értékelni kell, milyen hatása lehet az adott minőségi jellemzőnek a termék terápiás szempontból legfontosabb tulajdonságaira, mint a biológiai aktivitás, farmakokinetika, farmakodinamika, hatásosság és gyógyszerbiztonság, ezen belül is kiemelten az immunogenitási jellemzőkre. A kritikuság értékeléséhez figyelembe kell venni az adott molekulával vagy rokon szerkezetű molekulákkal (pl immunoglobulinok esetében) nyert tapasztalatokat és az irodalmi adatokat is megfelelő súlyozással [4]. Az alábbiakban a különböző minőségi paraméterek vizsgálatára alkalmas módszereket mutatom be.

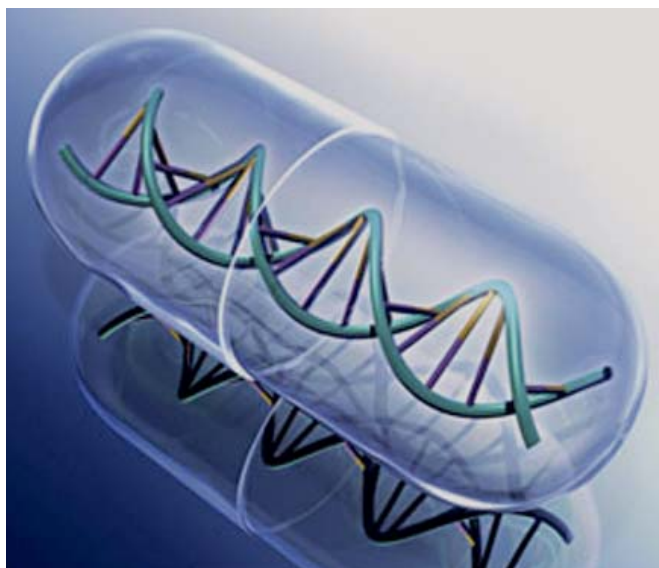
Egy fehérje vizsgálatának alfája és mindennek alapja a primer aminosavsorrend, amely elsődlegesen befolyásolja az adott fehérje funkcióját, biológiai aktivitását, a gyógyszer hatásosságát és biztonságosságát. Kiemelten fontos annak biztosítása és igazolása, hogy a fehérje-hatóanyag aminosav-szekvenciája meg egyezik a tervezett, és abban sem a gyártás során, sem a gyógyszer életciklusában nem következhet be eltérés. Az aminosavszekvencia-meghatározás majdnem egyeduralgó módszer az MS/MS-szekvenálás, amely során először a nagyméretű fehérjét több (általában két-három) enzimmel párhuzamos reakciókban peptidekre hasítják. A peptideket HPLC-n elválasztva, majd a tömegspektrométer ionforrásába vezetve az MS/MS-spektrumokból szoftveres és/vagy manuális kiértékeléssel az aminosavsorrendet visszafejtik. Mivel a jelenlegi tömegspektrometriás módszerek kevés kivételtől eltekintve nem képesek különbséget tenni az azonos tömegű (izobár) leucin és izoleucin aminosavak között, ezen aminosavak meghatározására a hagyományos Edman-lebontásra is szükség lehet. Tömegspektrometriás módszerrel lehetőség nyílik különböző poszttranszlációs módosulások, diszulfidhidak pozíciójának meghatározására is.

A teljes lefedettségű MS/MS-szekvenálás rendkívül munkaigényes és időrabló, ezért lehetőség van a primer szerkezet ellenőrzéséhez az úgynevezett peptid térkép (peptide mapping) alkalmazására, amely a rutin analitikai vizsgálatokra is alkalmazható. Ebben az esetben csak egy enzimmel történik az emésztés, a peptid térkép kromatogram-meghatározása fordított fázisú HPLC-vel, UV- vagy MS-detektálással történik. Ebben az esetben elvárás a peptidszinten meghatározott legalább 90–95%-os lefedettség.

Számos olyan poszttranszlációs módosításról vagy a gyártás során keletkező módosulatról is számot kell adnunk, melyek biológiai aktivitással rendelkeznek, ezért nem tekinthetjük őket szennyezőknek, hanem variánsokként kell kezelnünk.

A poszttranszlációs módosítások közül az egyik legfontosabb a glikoziláció, amely jelentősen befolyásolhatja a fehérje biológiai aktivitását és farmakokinetikai viselkedését [5]. Az egyik leggyakoribb terápiás fehérjecsalád, a monoklonális antitestek esetében a nehéz lánc C-terminális lizinje a fehérje processzálódása során enzimatikusan lehasadhat, illetve az N-terminálison piroglutaminsav képződhet.

Ezek vizsgálatának általánosan használt módszere a tömegspektrometriás analízis, azonban nagy műszer- és munkaigénye miatt egyszerűbb, célzott módszerekre is szükség van. A glikoziláció rutinszerű vizsgálata leggyakrabban a cukorrész lehasítását és fluoreszcens származékképzést követően kromatográfiás analízissel (pl. HILIC) történik. A már említett C-terminális lizinvariánsok mellett a különböző aszparagin és glutamin aminosavak



deamidálódásával (és egyéb módokon) keletkező töltésvariánsok ioncsere-kromatográfiával, a metionon vagy cisztein aminosavak oxidációjával keletkező formák célzott peptid térkép-vizsgálattal, a tenyésztő közeg vagy a formuláló közeg redukáló cukortartalmával és a lizin-oldalláncok reakciójával keletkező úgynevezett glikált módosulatok pedig boronát affinitáskromatográfiával vizsgálhatóak.

Ide sorolandók még az eltérő molekulatömegű variánsok is, melyek közül a különböző aggregátumok lehetnek dimerek, trimerek vagy akár több millió dalton tömegű nagy asszociátumok. Ezek, lévén potenciálisan immunogének, elsősorban immunológiai kockázatot jelenthetnek.

Ezek vizsgálata rendszerint valamilyen kromatográfiás technikával történhet, melyeket az **1. táblázat** foglal össze. Mivel ezek a variánsok biológiailag aktívak, ezért nemcsak szerkezetüket és mennyiségüket, de terápiás szempontból releváns biológiai aktivitásukat is részleteiben fel kell deríteni, meg kell határozni, illetve ezeket megfontolva kockázatukat értékelni kell!

A fehérjék magasabb rendű szerkezete, melyet részben meghatároz a primer szerkezet, biológiai aktivitás szempontjából szintén kiemelt jelentőségű, azonban vizsgálata már nem olyan egyértelmű, mint az elsőleges szerkezeté. A másodlagos szerkezet vizsgálatára alkalmazott cirkuláris dikroizmus spektroszkópia nagyobb fehérjék esetében már nem kellőképpen érzékeny a kisebb szerkezeti eltérésekre, de ugyanez igaz a harmadlagos szerkezet vizsgálatára használt fluoreszcens spektroszkópiára is. Érzékeny módszer az egy- és kétdimenziós NMR, amely jól használható a spektrumok ujjlenyomatszerű összehasonlítására, azonban a bonyolult spektrumokban a jelek asszignációja rendkívül nehéz. Elterjedten használt módszer a fehérjék magasabb rendű, térbeli szerkezetének felderítésére a röntgendiffrakció, ahol nagyméretű fehérjék esetén komoly kihívást jelent a kristályosítás. További, jelentős, részben még kihasználatlan lehetőségek lehetnek a kis szögű röntgen- és neutronszórás technikákban és egy teljesen új megközelítést alkalmazó konformációs ELISA módszerben is.

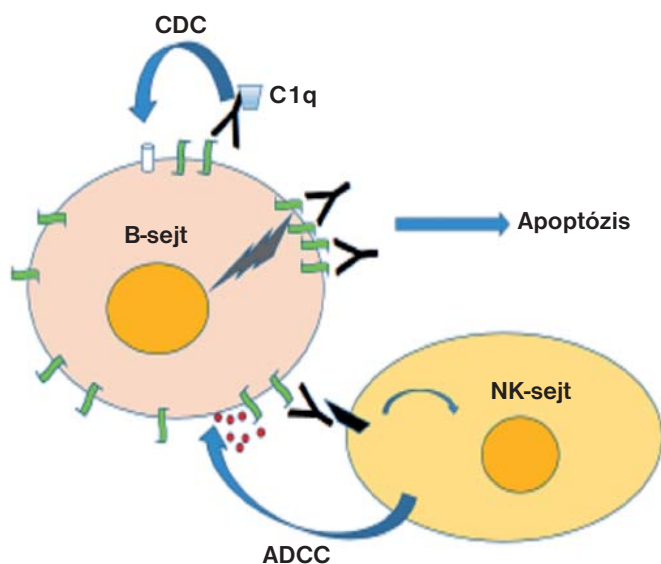
A biológiai/funkcionális vizsgálatok szerepe esetünkben lényegesen nagyobb, mint a kismolekulás gyógyszerhatóanyagok esetében, mivel a szerkezet bonyolultsága és nagyfokú variabilitása nem teszi lehetővé, hogy pontos, részletes és teljes képet kapjunk a fehérje szerkezetéről és az attól való lehetséges eltérésekről. Amellett, hogy a biológiai aktivitás mérés fontos információt ad a fehérje funkcionalitásáról, a biológiai aktivitásban tapasztal-



ható eltérések a szerkezetvizsgálati módszerek által nem látható szerkezeti különbségekre is felhívhatják a figyelmünket. A biológiai/funkcionális vizsgálatokról nem lehet általános megoldásokat bemutatni, hiszen az alkalmazott megközelítéseknek és módszereknek tükrözniük kell a vizsgált fehérje biológiai funkcióit és a terápiás szempontból releváns hatásmechanizmusukat. Ezek természetesen főként fehérjénként eltérőek. Az alkalmazott modelleknek ki kell terjedniük az adott hatásmechanizmus felderítésére és vizsgálatára a megfelelő kölcsönhatások (leggyakrabban fehérje-fehérje kölcsönhatás) közvetlen mérésével, a kötési állandók meghatározásával és a sejtszintű folyamatok vizsgálatára is.

Általánosnak tekinthető iránymutatást a monoklonális antitestek esetében a releváns EMA guideline-ból [2] kaphatunk. Bár a guideline bioszimiláris monoklonális antitestekre érvényes, az ebben megfogalmazott főbb irányvonalak originális monoklonális antitestek jellemzésére is figyelembe vehetők és veendőek. Az alábbiakban, a feladat komplexitását bemutatandó, az egyik legkorábban engedélyezett monoklonális antitest, a rituximab példáján mutatom be, milyen módon vizsgálható-vizsgálható egy terápiás fehérje biológiai aktivitása.

A rituximab forgalomba hozatalát 1998-ban engedélyezték reumatoid arthritis és non-Hodgkin-limfómák kezelésére. Európában MabThera, az Egyesült Államokban és Japánban Rituxan néven van forgalomba. Hatásának alapja az érett B-sejteken kifejeződő sejtfelszíni CD20 fehérjeantigén felismerése és megkötése. Ezt követően az így „megjelölt” B-sejtek eliminációja három fő csapás mentén haladhat (2. ábra).



2. ábra. A B-sejtek eliminációja

A CD20 megkötésének eredményeképpen, mivel egy rituximab molekula két antigénmolekula megkötésére képes, a CD20 fehérje dimerizálásán keresztül a célsejt apoptózist indíthat be, aminek következtében a célsejt aktív módon elpusztítja önmagát. Az IgG1 molekula, jelen esetben a rituximab, amennyiben kialakult az antigén-antitest komplex Fc-régiója, képes megkötni a komplement-rendszer első komponensét, a C1q fehérjekomplext, ami a komplement-kaskád folyamat aktiválásához vezet, és a célsejt lízist váltja ki (complement mediated cytotoxicity, CDC). Amennyiben az antigén-antitest komplexben kötött IgG1 (rituximab) Fc-régiója a természetes ölősejt (natural killer cell, NK-sejt) felszínén expresszálandó CD16a (FcγRIIIa) receptorhoz

Csak Fab-régióhoz kötött hatások	CD20 antigén-kötés	SPR, BLI, ELISA, áramlási citometria
	Apoptózis	Sejtes módszer
Fc-régió keresztül megvalósuló hatások	FcγRIIIa (nagy affinitású) receptorkötés	SPR, BLI
	FcγRIIIa) (kis affinitású) receptorkötés	
	FcγRIIb receptorkötés	
	FcγRIa receptorkötés	
	FcγRIb receptorkötés	
	FcγRI receptorkötés	
	FcRn receptorkötés	
	CDC	Sejtes módszer
	ADCC	

2. táblázat. A rituximab biológiai/funkcionális analitikai módszerei

kötődik, úgy az aktiválja az NK-sejtet. Az aktivált NK-sejt olyan fehérjét (perforin, granzyme B) bocsát ki, amelyek a térben hozzá közel lévő célsejt pusztulását okozzák (antibody-dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC). Ezen három fő útvonal mellett egyéb, terápiás szempontból lényegesen kisebb jelentőségű útvonalak is szóba jöhetnek, mint például a fagocitózis (ADCP) vagy a sejtproliferáció gátlása.

Megfontolva a fentebb ismertetett hatásmechanizmusokat a hatósági elvárások függvényében a 2. táblázatban összefoglalt biológiai/funkcionális módszerpanel kidolgozása tekinthető szükségesnek és elégségesnek.

Tekintettel a fehérje gyógyszerhatóanyagok méretére, szerkezetük összetettségére és nagyfokú variabilitására, ezen molekulák jellemzése és minősítése csak a különböző szakterületekről származó adatok együttes értékelésével lehetséges. Csak a szerkezeti, tisztasági és biológiai adatok együttes értékelésével kaphatunk tiszta és egyértelmű képet ezeknek a molekuláknak a minőségéről, emiatt az ezen a területen dolgozó analitikusoknak a kémia és a biológia határmezsgyéjén mozogva kell megtervezniük, kivitelezniük és értékelniük az analitikai vizsgálatokat.

IRODALOM

- [1] S. Kozłowski, P. Swann: Current and future issues in the manufacturing and development of monoclonal antibodies, *Advanced Drug Delivery Reviews* (2006) 58, 707–722.
- [2] Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products, ICH Harmonised Tripartite Guideline Q6B
- [3] Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies – non-clinical and clinical issues EMA/CHMP/BMWP/403543/2010
- [4] N. Alt et al.: Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles, *Biologicals* (2016) 44, 291–305.
- [5] D. Pace et al.: Characterizing the Effect of Multiple Fc Glycan Attributes on the Effector Functions and FcγRIIIa Receptor Binding Activity of an IgG1 Antibody, *Bio-technol. Prog.* (2016) 32, 1181–1192L.



Bihari Zsolt – Bagdi Attila – Baginé Timári Sarolta – Háda Viktor

■ Richter Gedeon Nyrt., Biotechnológiai Analitikai Osztály

Terápiás fehérjék karakterizálása: az elsődleges szerkezet vizsgálata tömegspektrometriával

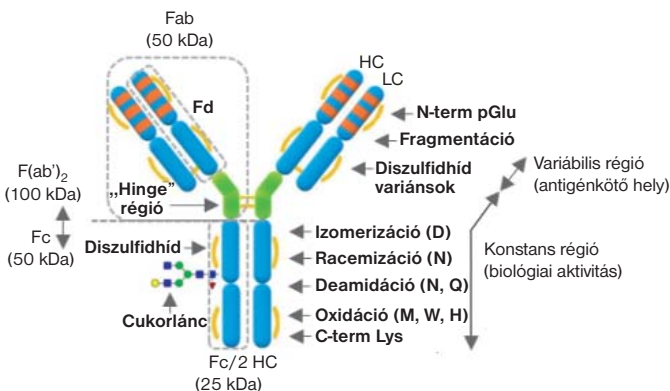
Bevezetés – a terápiás fehérjék és analitikájuk

Egy évtizede a legnagyobb árbevételt elérő gyógyszerek még elsősorban hagyományos kismolekulás készítmények voltak. Néhány évvel ezelőtt azonban a biotechnológiai úton előállított hatóanyagok (biologikumok) kerültek előtérbe, melyekben makromolekulák – kisebb fehérjék, hormonok, fúziós fehérjék vagy monoklonális antitestek (1. ábra) – a hatóanyagok. Az első originális készítmények szabadalmi lejárata után, 2005-től kezdődően lehetőség nyílt e molekulák generikus változatai, az ún. bioszimiláris készítmények törzskönyvezésére. Az originátor készítményekhez képest a bioszimiláris gyógyszerek alacsonyabb ár-

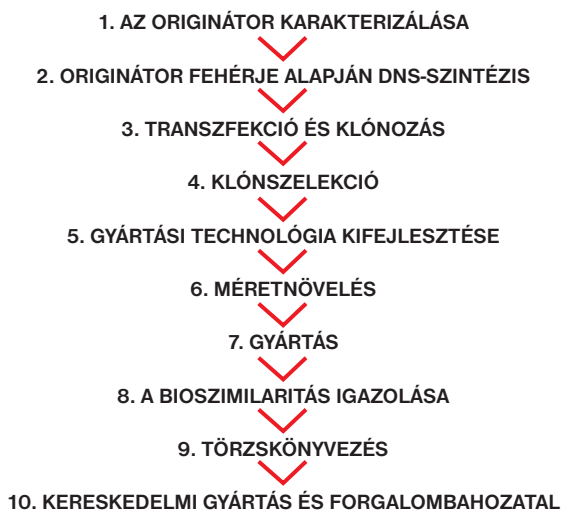
fekvésük révén a társadalom nagyobb hányada részére biztosíthatnak modern gyógyszeres terápiát súlyos kórok, így különböző daganatos megbetegedések esetén. Egyúttal ezek a készítmények a gyógyszergyártók számára hatalmas piacot kínálnak ezen a terápiás területeken.

A kismolekulás hatóanyagokhoz képest a biotechnológiai úton előállított fehérjealapú gyógyszerek számos kihívás elé állítják a gyógyszergyártókat. A hatóanyagot élő szervezetek, többnyire emlőssejtek vagy baktériumok állítják elő, és a gyártási folyamatok szabályozása lényegesen összetettebb technológiát igényel, mint a kismolekulák előállítására irányuló szintetikus kémiai reakciók kivitelezése. A fermentációs technológiák nem teszik le-

1. ábra. Monoklonális antitest felépítése és lehetséges módosulásai. A két nehéz (HC) és két könnyű láncból (LC) felépülő, egyetlen sejtklón által termelt monoklonális antitest jellegzetes „Y” szerkezettel rendelkezik, melyet diszulfidhidak kötnek össze. Az ún. kapocs („hinge”) régió köti össze az antigénkötésért felelős variábilis régiót tartalmazó Fab-fragmenst, és a cukorláncot tartalmazó Fc-fragmenst, mely az antitest biológiai aktivitásáért felelős



2. ábra. A bioszimiláris gyógyszerkészítmények fejlesztésének és forgalombahozatali engedélyezési eljárásának folyamata





hetővé egyféle hatóanyag gyártását, hanem a hatóanyag különböző változatait tudják előállítani. Ez a variabilitás, a makromolekulák hatalmas mérete és szerkezeti komplexitása lényegesen megnehezíti a karakterizálásukhoz szükséges analitikai mérések kivitelezését és az eredmények értékelését. Míg a kismolekulák kémiai szerkezete hagyományosan NMR- és MS-spektroszkópiai módszerekkel konstitúció és sztereokémia szempontjából is egzakt módon jellemezhető, a fehérjemolekulák szerkezeti karakterizálása más, komplexebb megközelítést igényel.

A bioszimilárisok fejlesztése az originátor termék karakterizálásával indul (**2. ábra**), így már a kezdeti szakaszban fontos szerepe van az analitikának, különös tekintettel az aminosav-szekvencia meghatározására. Ezt követően a hatóanyag-fehérje aminosavjait megfelelő sorrendben kódoló DNS-szakaszt állítjuk elő, ezt különféle gazdasejtekbe klónozzuk, amelyek így előállítják a kívánt fehérjét. Kiválasztjuk a legmegfelelőbb gazdasejtet és laboratóriumi méretben kidolgozzuk a gyártástechnológiát. A technológiát ipari léptékre ültetjük át, és legyártjuk a készítményt. Analitikai és klinikai vizsgálatokat végzünk, melyekkel igazoljuk, hogy a készítményünk hasonló az originátorhoz mind minőségét, mind pedig hatásosságát és biztonságosságát tekintve. Végül összeállítjuk a törzskönyvi dokumentációt, mely adminisztratív, minőségi, nem-klinikai és klinikai fejezetekből áll. A bioszimiláris gyógyszer dokumentációjának értékelését az Európai Gyógyszerügynökség emberi felhasználásra szánt gyógyszerek bizottsága végzi (Committee for Human Medicinal Products). A bizottság véleményét az Európai Bizottság határozatba foglalja, és ezzel az Európai Unió teljes területére érvényes engedélyt ad ki. Az analitikai vizsgálatok az egész fejlesztési folyamaton átívelnek, az originátor karakterizálásától kezdve a technológia fejlesztésén keresztül egészen a készítmény vizsgálatáig. A törzskönyvi engedély megszerzése után a termék életciklusát követve (pl. gyártóhely-áthelyezés) folyamatosan analitikai vizsgálatokkal kell bizonyítani a termék minőségét.

A gyógyszerhatóságok jogszabályokat és irányelveket tesznek közzé, melyeket követni kell [1, 2]. A fejlesztő cégek feladata adott analitikai adatcsomag összeállítása, amellyel bizonyítani tudják, hogy a bioszimiláris termék szerkezete a lehető legnagyobb mértékig hasonlít az originátor termékéhez, különös tekintettel a biológiai hatást befolyásoló kritikus minőségi jellemzőkre (CQA: Critical Quality Attributes). Mivel a bioszimiláris gyógyszereket élő organizmusok felhasználásával állítják elő, szerkezetüket tekintve kismértékben eltérhetnek a referenciakészítménytől. Ezek a kisebb eltérések azonban klinikai szempontból nem jelentősek. A természetes variabilitás a biológiai gyógyszerek jellemző sajátysága, a szigorú minőség-ellenőrzés azonban biztosítja, hogy ez a változékonyság nem befolyásolja a készítmény hatásosságát és biztonságosságát. A biohasonló gyógyszerek fejlesztésének kulcseleme a biohasonlóság igazolása, azaz a kémiai szerkezet, a biológiai hatás és a hatékonyság, a biztonságosság, valamint az immunogenitási profil tekintetében igazolt nagyfokú hasonlóság dokumentálása.

Ahhoz, hogy ennek a hatósági elvárásnak megfelelhessünk, széles analitikai eszköztár alkalmazására van szükség, hiszen az egyes technikák önmagukban nem képesek a hatóanyag-molekula teljes szerkezetét és különböző változatait karakterizálni. Emiatt holisztikus megközelítést kell alkalmaznunk úgy, hogy a különböző mérési módszerekkel a lehető legtöbb analitikai információt nyerjük a vizsgált molekuláról. A terápiás fehérjék karakterizálására számos analitikai technikát használnak a mindennapi gyakorlatban. A különböző folyadékkromatográfiás tech-

nikák, mint például a méretkizárásos (SE), a fordított fázisú (RP), a hidofil interakciós (HILIC) és az ioncserés (IEX) nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) a fehérjék egyes tulajdonságainak (például méret, töltés, hidrofobicitás) különbözőségét kihasználva választják el egymástól a vizsgált minták komponenseit. Ugyancsak eredményesen használhatók fehérjék elválasztásra a kapilláris elektroforézis (CE) és a poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE) is. A folyadékkromatográffal kapcsolt tömegspektrometria (LC-MS), a mátrix által segített lézerdeszorpációs ionizációs tömegspektrometria (MALDI-MS), a mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR), a cirkuláris dikroizmus spektroszkópia (CD) és az infravörös spektroszkópia (IR) a fehérjék szerkezetvizsgálatára alkalmazhatóak. Az enzimmel kötött immunoszorbens (ELISA) módszer és a felületi plazmonrezonancia (SPR) a biológiai aktivitás vizsgálatának elengedhetetlen módszerei.

Az elmúlt 2–3 évtizedben tapasztalható rendkívül nagy mértékű technikai fejlődésnek köszönhetően a fentiekben felsorolt mérési módszerek közül a tömegspektrometriának (MS) kitüntetett és egyre nagyobb szerepe van [3–6]. A nagyméretű fehérjemolekulák szerkezeti karakterizálásában az új ionizációs és fragmentációs technikákkal rendelkező és egyre nagyobb érzékenységgű készülékek (Orbitrap-analizátor [7]) megjelenése mérföldkő volt. A gyakorlatban Q-TOF- (Quadrupole Time-of-Flight) és hibrid FTMS- (Fourier Transform Mass Spectrometry) készülékeket alkalmazunk ilyen célra. Az FTMS-készülékek esetében az új generációs Orbitrap-készülékek mára szinte teljesen háttérbe szorították az FT-ICR- (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance) tömegspektrométerek alkalmazását, melyek fenntartása rendkívül költséges. A legújabb Orbitrap-készülékekre, a már klasszikusnak tekinthető ütközésaktivált disszociációs technikák (CID: Collision Induced Dissociation, HCD: Higher-energy Collisional Dissociation) mellett olyan új fragmentációs technikát (ETD: Electron Transfer Dissociation [8]) fejlesztettek ki, amely komplementer alkalmazásával (ETD-CID és ETD-HCD) a fehérjék aminosav-szekvenciája pontosabban meghatározható. A peptidok fragmentálása után kapott MS-MS-spektrumokban nemcsak egyszeri hasadással keletkező N- és C-terminális fragmensek detektálhatók, hanem ezek víz- vagy ammóniavesztett fragmensei, sőt internális fragmensek is keletkeznek, amelyek értelmezéséhez megbízható, pontos tömegadatokra van szükségünk.

Tömegspektrometriával meghatározhatjuk a biológiai gyógyszerhatóanyagok pontos molekulatömegét, az enzimátikus és kémiai poszttranszlációs módosulásokat, a glikozilációs mintázatot és a fehérje harmadlagos szerkezetét stabilizáló kénhidak helyét, valamint a HDX-MS (Hydrogen Deuterium Exchange Mass Spectrometry) technika révén már a fehérjék magasabb rendű szerkezetét is jellemezhetjük. Mindezek mellett azonban a tömegspektrometriának a fehérjék aminosav-szekvenciája meghatározásában és az ezekhez kapcsolódó analitikai feladatokban van különösen nagy szerepe.

A Richter Gedeon Nyrt.-ben közel egy évtizede folynak bioszimiláris fejlesztések, és az előállított fehérjék karakterizálására rutinszerűen alkalmazunk tömegspektrometriai méréseket. Munkánk során több esetben is feladatunk a fehérjék aminosav-szekvenciájának meghatározása, valamint enzimátikus és kémiai poszttranszlációs módosulások vizsgálata. A bioszimiláris fejlesztés különböző szakaszaiban (**2. ábra**) más-más kérdésekre keressük a választ, amit már a kísérleti munka megtervezése során figyelembe kell vennünk. Minden esetben meg kell vizsgálnunk azt, hogy milyen minta-előkészítési stratégiát célszerű vá-



lasztani egy adott feladat megoldásához, milyen mérési módszert alkalmazzunk, milyen szoftverrel és hogyan értékeljük ki a kapott eredményeket. Közleményünkben a napi munkánk során gyűjtött tapasztalataink felhasználásával szeretnénk általános képet adni az aminosav-szekvencia meghatározásának – nézőpontunk szerint – legfontosabb aspektusairól. Az egyes fejezeteket a teljesség igénye nélkül állítottuk össze, de bízunk abban, hogy közelebb hozzuk az olvasókhöz a terápiás fehérjék elsődleges szerkezetének tömegspektrometria-alapú vizsgálatát.

Az aminosav-szekvencia meghatározásának jelentősége

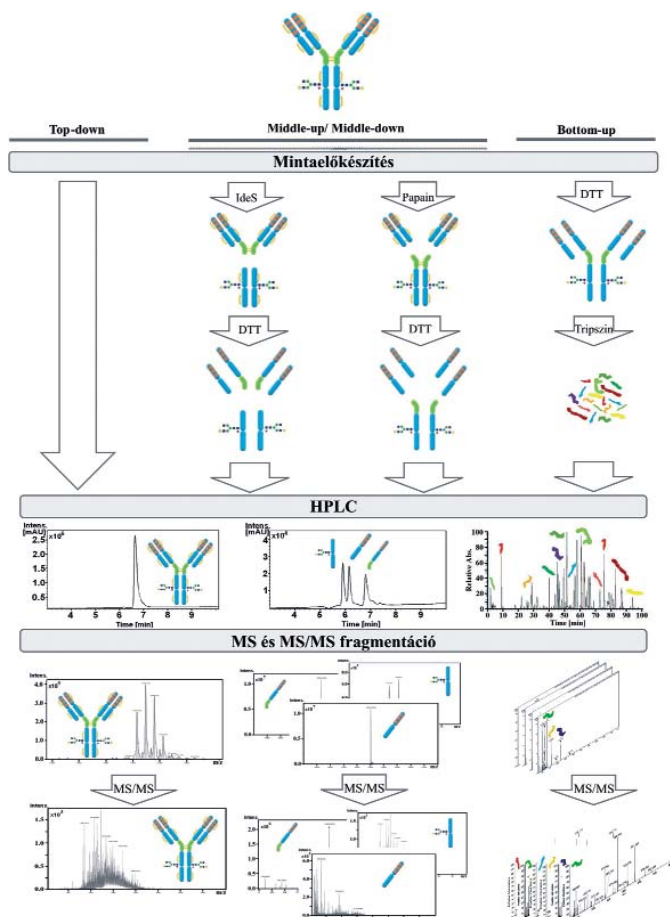
A bioszimiláris termékek aminosav-szekvenciáját – elsődleges szerkezetét – illetően egyértelmű és határozott hatásági elvárás áll rendelkezésünkre: a bioszimiláris és az originátor fehérjék aminosav-szekvenciájának teljesen azonosnak kell lennie, ideértve az izobár (azonos tömegű) leucin és izoleucin aminosavakat is [1, 2]. Kis mennyiségű szekvenciavariánsok ugyan jelen lehetnek a termékben, de ezek szerkezetazonosítására is szükség van.

Az originátor készítmény aminosav-szekvenciája többnyire megszerezhető nyilvános forrásokból, tehát internetes adatbázisokból, szabadalmakból vagy tudományos publikációkból. Azonban figyelembe kell vennünk, hogy ezek az adatok tartalmazhatnak emberi vagy kísérleti hibát [9], sőt akár olyan tudatosan beépített hibát is, amely a versenytárs megtévesztésére irányul. Mindezek miatt az aminosav-szekvencia már a bioszimiláris fejlesztés kezdetén kritikus analitikai információ (2. ábra). Rendkívül kockázatos lehet egy bioszimiláris projekt klónozási fázisát kizárólag adatbázisokból nyert információval elindítani. Ahhoz, hogy nagy biztonsággal az originátor termék aminosavláncát kódoló DNS-szekvenciát klónozzuk be a termelő sejtvonalba és így azzal megegyező aminosav-szekvenciájú bioszimiláris terméket fejlesszünk, be kell szereznünk az originátor termékét, majd azt szekvenálnunk szükséges. Hibásan meghatározott aminosav-szekvencia akár a fejlesztési projekt bukásához is vezethet, mivel a terméket bioszimilárisként nem lehet törzskönyveztetni.

A fejlesztés kezdeti szakaszában történő részletes aminosav-szekvencia-meghatározás mellett a fejlesztés későbbi fázisaiban is monitoroznunk kell, hogy megfelelő-e a hatóanyagunk aminosavsorrendje. Ekkor a vizsgálati megközelítés már különböző lehet; beszélhetünk teljes aminosavszekvencia-meghatározásról vagy összehasonlító jellegű vizsgálatokról, amikor az originátor termékhez történő hasonlítás végezzük el gyorsabb, kevésbé részletes kiértékelést igénylő módszerekkel. Ahhoz, hogy vizsgálni tudjuk az aminosav-szekvenciát, minden esetben kiválasztjuk a céljainknak leginkább megfelelő minta-előkészítési stratégiát a szakirodalomban is leggyakrabban alkalmazott megközelítések közül.

Az aminosav-szekvencia meghatározásának minta-előkészítési megközelítései: bottom-up, top-down vagy middle-up/middle-down

Az aminosav-szekvencia meghatározására hagyományosan és rutinszerűen alkalmazott technika a bottom-up (vagyis „alulról felfelé”) megközelítés, amely során a fehérjét egy proteolitikus enzimmel (pl. tripszin, Asp-N, Lys-C, Glu-C) emésztjük, redukáljuk (DTT, ditiotritol) és a keletkező peptidszakaszokat folyadékkromatográfiával vagy kapilláris elektroforézissel történő elválasztás után MS- és MS/MS-mérésekkel vizsgáljuk (3. ábra). A cél min-



3. ábra. Aminosav-szekvencia meghatározásának minta-előkészítési megközelítései egy monoklonális antitesten bemutatva

dig az, hogy a mérés során sikertüljön az enzimatisz emésztés-kor keletkező peptidok közül annyit detektálni, hogy azok a fehérje egészét lefedjék, azaz 100%-os aminosav-szekvencia lefedettséget kapjunk.

A middle-up (vagyis „középről felfelé”) megközelítés során korlátozott proteolízissel és kénhid-redukcióval nagyobb méretű alegységek, fragmensek állíthatók elő. Az alegységek előállítására leggyakrabban az IdeS vagy papain enzimet használjuk, melyek specifikusan hasítanak a monoklonális antitest „hinge” régiójában. A hasítást követő kémiai redukcióval (DTT) ~25 kDa tömegű alegységek nyerhetők, melyek tömegspektrometriai analízise során az antitest egyes régióiról (pl. Fc, Fd') kaphatunk információt (3. ábra). Az alegységek fragmentálása, azaz MS/MS-alapú vizsgálata az ún. middle-down (vagyis „középről lefelé”) megközelítés.

A fehérje emésztése nélküli top-down (vagyis „felülről lefelé”) megközelítéssel is nyerhető szekvenciainformáció a vizsgált fehérjéről. Ebben az esetben az intakt (azaz emésztetlen) fehérjét juttatjuk a tömegspektrométerbe, és ott megfelelő technikával fragmentáljuk. Bár a bottom-up megközelítés során kisebb peptidok vizsgálata révén részletesebb szerkezeti információ nyerhető, az elmúlt években számos biztató eredmény született monoklonális antitestek top-down [10, 11] és middle-down [12] analízisében Orbitrap- és Q-TOF-analizátorokat alkalmazva. Bár ezek a megközelítések még nem biztosítanak teljes szekvencialefedettséget, a szekvenciaadatok, mint kiegészítő eredmények, felhasználhatók a bottom-up analízis mellett. Mivel aminosavszekvencia-meghatározásra rutinszerűen a bottom-up megközelítés



alkalmazható, a következő fejezetben ezt mutatjuk be részletebben.

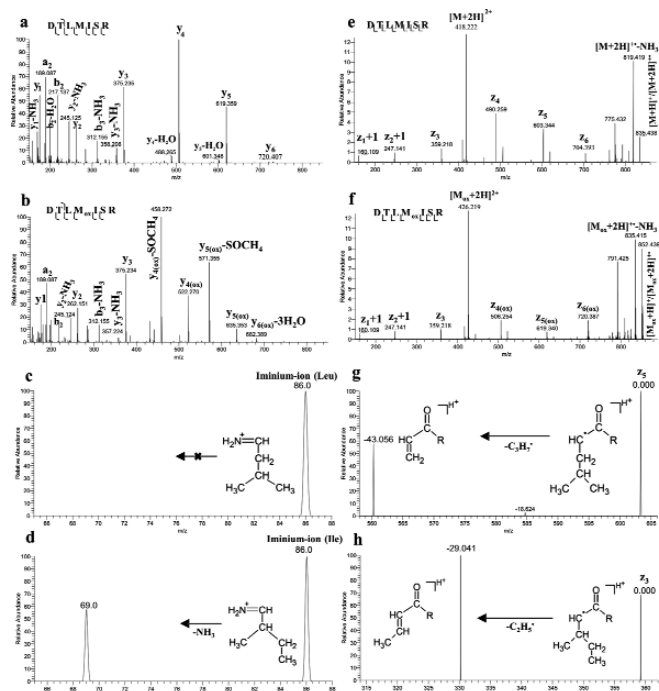
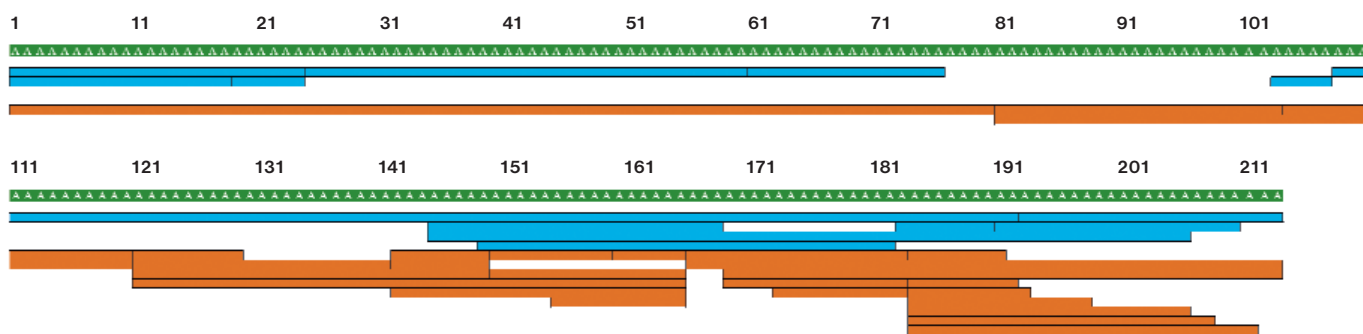
Bottom-up megközelítés – LC–MS/MS-peptid térkép

A bottom-up megközelítést terápiás fehérjék azonosságvizsgálata esetén peptid térkép-vizsgálatnak nevezzük [13]. Az enzimatis emésztés előtt a fehérjéket denaturálni szükséges, a minta-előkészítés során a kénhidakat redukáljuk és alkiláljuk. Ez utóbira azért van szükség, hogy megakadályozzuk a redukció eredményeképpen kapott tiolszoportok összekapcsolódását, azaz a kénhidak újbóli kialakulását. Az emésztés eredményeképpen kapott peptideket kromatográfiásan elválasztjuk, majd tandem MS-mérések során fragmentáljuk. Kézenfekvő, hogy kisebb peptid-egységeket vizsgálva részletesebb szerkezeti információt nyerhetünk, mint az intakt fehérje vizsgálata során.

A fehérjék aminosav-szekvenciájának meghatározásában atomi szintű szerkezetmeghatározásra nincs szükség, mivel a fehérjéket az ismert α -aminosavak építik fel. A fehérjéket felépítő aminosavak nagy száma viszont olyan mértékű variabilitást okoz, amely komoly analitikai kihívást jelent, amikor egy nagyobb méretű fehérje esetén az N-terminálisról a C-terminális részéig az összes aminosavat azonosítanunk szükséges. A nagyméretű biomolekulák bottom-up analízise során a különböző enzimatis emésztmények azonosított peptidjeivel tudjuk lefedni a teljes aminosav-szekvenciát (4. ábra).

Az egyes peptidszakaszok molekulatömegeik és jellemző tömegspektrometriai fragmenseik alapján azonosíthatók. A szomszédos aminosavak közötti hasadással keletkező N- vagy C-terminális fragmensek közötti pontos tömegérték-különbségek alapján az adott pozíciókban található aminosavakat egyértelműen azonosíthatjuk (5.a,b,e,f ábra). Előfordulhat azonban, hogy a kiértékelés során nem vesszük figyelembe kihagyott hasadásokat, a hasonló vagy azonos pontos tömegadattal rendelkező, ugyanakkor különböző aminosavakat nem vesszük számításba. A Gly-Gly (114,043 Da) között kihagyott hasítás révén a két aminosav Asn aminosavként (114,043 Da) is azonosítható. A Gln aminosav (128,059 Da) Lys aminosavként (128,095 Da) is azonosítható a nagyon hasonló pontos tömegadat miatt, ugyanígy a Lys aminosav is azonosítható Gln aminosavként nem megfelelő pontos tömegadat esetén, vagy a műszerre jellemző tömegpontosság nem megfelelő figyelembevételével. Nagyobb méretű peptidek fragmentációja esetén többnyire részleges szekvencia-lefedettséget kapunk, azonban komplementer fragmentációs technika alkalmazása mellett kiegészítő szekvenciainformációt is nyerhetünk.

4. ábra. Egy monoklonális antitest 213 aminosavból álló fehérjeláncának kétenzimes (eltérő színnel jelölve) emésztésével azonosított peptidszakaszok



5. ábra. Egy monoklonális antitest DTLMISR szekvenciájú peptidszakaszának HCD (a) és ETD (e) MS² spektruma; a DTLM(ox)ISR oxidált peptidszakasz HCD (b) és ETD (f) MS² spektruma, valamint a leucin/isoleucin meghatározására irányuló HCD MS³ (c/d) és ETD-HCD MS³ (g/h) spektruma

Módosítások vizsgálata során is figyelembe vesszük a lehetséges buktatókat (hasonló tömegadatok miatti hibás azonosítás), így összetett analitikai megközelítést alkalmazunk azért, hogy megbízható minőségű adatokat nyerjünk. A glikozilációs módosítások vizsgálata esetében például nagy szerep jut a különböző kromatográfiás technikáknak, amíg a nem-enzimatis poszttranszlációs módosítások jellemző tömegkülönbségeket eredményeznek adott aminosavak esetén, így ezek a módosítások meghatározhatók a fragmensek közötti tömegkülönbségek detektálásával.

Nem-enzimatis poszttranszlációs módosítások meghatározása: „hotspot”-analízis

Az említett nem-enzimatis poszttranszlációs módosítások a terápiás fehérjekészítmények tárolása során vagy stresszhatásra keletkező, különböző bomlástermékeket foglalják magukba. Ezek a



bomlástermékek leggyakrabban a fehérje oxidált és deamidált formái, de a fragmensek és az izomer aminosavat tartalmazó származékok is ebbe a csoportba tartoznak. A szakmai zsargonban a fehérje érintett részeit „hotspot”-oknak hívjuk (1. ábra). Mivel a natív fehérjéhez képest ezek a bomlástermékek eltérő biológiai aktivitással rendelkezhetnek [14], azonosításuk és azt követő mennyiségi analízisük kritikus eleme a termék karakterizálásának.

Ahhoz, hogy azonosítani tudjuk a fehérje „hotspot”-jait, a natív fehérje vizsgálata mellett érdemes stresszvizsgálatokat is végeznünk. Így lehetőségünk nyílik arra, hogy tanulmányozzuk, mely aminosavak hajlamosak oxidációra, deamidációra, izomerizációra. Az oxidáció jellemzően és legnagyobb mértékben a metionin aminosavat érinti, annak kénatomja szulfoxiddá alakul át 16 Da tömegkülönbséget eredményezve a fehérjében (5. ábra). Ezt a változást már az intakt fehérje mérése során is detektálhatjuk, az oxidáció lejártsódását akár top-down analízis segítségével is igazolhatjuk. Azonban, ha az oxidáció pontos helyét szeretnénk meghatározni, többnyire alkalmaznunk kell a bottom-up megközelítést és a fragmentációs tömegspektrum elemzésével kaphatunk egyértelmű választ. Deamidáció vizsgálata során is hasonló módon járunk el; az Asn aminosav deamidálódás révén Asp és isoAsp izomer aminosavakká alakul át. A tömegkülönbség a natív és deamidált formák között csupán 1 Da, amely nagyobb méretű fehérjék esetén csak peptidszinten határozható meg. Az Asp és isoAsp izobár aminosavak között a hagyományos ütközésaktivált disszociációs technikával ráadásul nem tudunk különbséget tenni, viszont ETD-fragmentációval egyértelműen azonosíthatók [15]. A „hotspot” helyek MS-alapú azonosítása után már lehetőségünk nyílik arra, hogy egy olyan UV-alapú kromatográfiás módszert fejlesszünk a bomlástermékek mennyiségi monitorozására, amely gyors, robusztus és tömegspektrometriás detektálás nélkül is megbízható információt szolgáltat [16]. Egy ilyen módszer különösen összehasonlító tanulmányokban lehet hasznos, ha az originátor és a bioszimiláris termék számos különböző sarzsát kell karakterizálnunk. Emellett alkalmas lehet arra, hogy a terápiás fehérjekészítmény tárolása során kövessük a bomlástermékek mennyiségének változását.

A gyógyszerhatóssághoz benyújtandó bioszimilitási tanulmány részét képezik olyan stresszvizsgálatok is, amelyek során az originátor és a bioszimiláris termék viselkedését tanulmányozzuk különböző stresszelések hatására. A stresszvizsgálatok során időben több pontot monitorozunk. A keletkező bomlástermékek hasonló kinetikai görbéje részben igazolhatja azt, hogy nincs különbség a vizsgált fehérjék magasabb rendű szerkezetében. Ugyanis esetlegesen eltérő magasabb rendű szerkezet következtében adott aminosavak hozzáférhetősége eltérő lehet, így egy bomlástermék keletkezésének mértékében eltérés tapasztalható. Tehát a „hotspot”-ok analízise révén elsőrendű szerkezeti információból kiindulva következtethetünk hasonló vagy eltérő magasabb rendű szerkezetre is.

Izobár leucin és izoleucin aminosavak tömegspektrometria-alapú meghatározása

Amíg az előzőekben bemutatott nem-enzimátikus poszttranszlációs módosítások jellemző tömegkülönbségeket eredményeznek, addig az azonos tömegű (izobár) leucin és izoleucin aminosavak azonosítása eltérő megközelítéssel valósítható meg. Habár a leucin és izoleucin aminosavak elemi összetétele azonos, és az oldalláncban mutatkozó izoméria minor szerkezeti különbségnek

tűnhet egy monoklonális antitest méretéhez képest, ez a különbség nem hagyható figyelmen kívül. Ennek egyik oka a szigorú hatósági szabályozáson túl az, hogy egy leucin-izoleucin „csere” az originátor és bioszimiláris termék között akár jelentős különbséget is okozhat a biológiai aktivitásban [17]. Hagyományosan Edman-szekvenálási technikával különböztethetjük meg egyértelműen a Leu/Ile aminosavakat. Egy nagyméretű fehérje szekvenciájában bárhol előforduló izobár aminosavak meghatározása céljából a fehérjét enzimátikus emésztésnek vetjük alá, majd az MS-mérések alapján azonosított, a kérdéses aminosavakat tartalmazó peptideket izoláljuk, esetleg dúsítjuk. Ezt követően Edman-szekvenálással az adott peptidszakasz izobár aminosavait egyértelműen azonosítjuk. Mivel egy monoklonális antitest enzimátikus emésztménye rendkívül nagy számú peptidet tartalmaz, ezért ez a megközelítés nagyon időigényes munkafolyamat. Az adott izobár aminosavakat tartalmazó peptidek elválasztása és legyűjtése komoly kihívást jelenthet, többnyire kromatográfiás módszer fejlesztését is szükségessé teszi.

A klasszikusnak számító Edman-szekvenálási technika mellett mára több olyan MS-alapú módszert fejlesztettek ki, amellyel ezek az aminosavak egyértelműen megkülönböztethetők. Ezen módszerek közé tartozik a HCD MSⁿ ($n = 3-5$) technika [18]. Míg a HCD MS² alapján nem lehet megkülönböztetni az izobár aminosavakat, addig további fragmentáció alkalmazásával (HCD MS³⁻⁵) a Leu/Ile aminosavak megkülönböztethetők (5.a-d ábra). Ez az ún. *iminium-ion* módszer, ahol az izobár aminosav iminium-ionjának (m/z 86,1) fragmentálásával a Leu esetében nincs vagy igen kis intenzitású az ammóniavesztés. Ezzel szemben az izoleucinnál nagy intenzitással jelenik meg a spektrumban az m/z 69 fragmens. Az izobár aminosavak megkülönböztetésére szolgáló másik MS-megközelítés az ETD-HCD MS³ módszer [19], amelyben a *w-satellit* módszert használjuk, azaz a tömegspektrumban a leucin esetében C₃H₇ (–43 Da), míg az izoleucinnál C₂H₅ (–29 Da) és/vagy C₄H₈ (–56 Da) vesztes figyelhető meg (5.e-h ábra). Az MS technikákkal történő izobár aminosav megkülönböztetésnek azonban vannak korlátai. A kis ionintenzitások mellett számolnunk kell a hidrogéntranszfer jelenséggel [20], az ún. prolineffektussal, valamint a kiválasztandó fragmens-ionok tömegtartománya is korlátozott [18].

Az adatbázisok és a szoftveres kiértékelés alkalmazásának szükségessége és buktatói

A fehérje-emésztmények tömegspektrometriai analízise során hatalmas adatmennyiség keletkezik, amely manuálisan nem kezelhető, egyértelműen szoftveres adatfeldolgozásra és kiértékelésre van szükség. Az azonosítás során az alkalmazott szoftver a mért tömegspektrometriai fragmenseket adatbázisban (pl. Mascot) található szekvenciák alapján számolt elméleti értékeknek felelteti meg [21, 22]. A szoftvereket alkalmazhatjuk *de novo* szekvenálásra (olyan szekvenálási folyamat, amely során az aminosavsorrendet mindenféle előzetes információ nélkül határozzuk meg) is olyan peptidszakaszokra, amelyek nem azonosíthatók adatbázis alapján. *De novo* szekvenálásra és adatbázis-keresésre is alkalmas szoftver a PEAKS [23]. Biotechnológiai készítmények fehérje-hatóanyagainak karakterizálása során azokat nem azonosítanunk kell, hanem szerkezeti szempontból a lehető legteljesebb mértékben jellemezni, így aminosav-szekvencia szempontjából a várt szekvenciát kell igazolnunk. Ekkor a teljes szekvenciára kiterjedő részletes analízis esetén már nem beszélhetünk valószínűleg *de novo* szekvenciameghatározásról. Ennek ellenére egy



monoklonális antitest teljes szekvenciájának igazolása rendkívül időigényes és szisztematikus munkafolyamatot igénylő feladat.

A terápiás fehérje-hatóanyagok mellett nemcsak azok variánsai, hanem technológiai eredetű szennyezők is jelen lehetnek, ilyenek többek között a gazdasejt fehérjék (HCP – Host Cell Protein), amelyek azonosítása a potenciális immunogenitás miatt különösen fontos. A rutinszerűen alkalmazott ELISA módszer mellett ezen szennyező fehérjék minőségi azonosítása HPLC–MS/MS technika alkalmazásával valósítható meg. Adatbázisok alkalmazása szükséges ahhoz, hogy a szennyező fehérjéket azonosítani tudjuk a termékben. Ilyen esetekben is tulajdonképpen szekvenálunk, azonban nincs szükség a teljes szekvencia meghatározására, részleges szekvenciafedettség elegendő az egyértelmű azonosításhoz. A szoftveres kiértékelés hátránya a mért tömegspektrometriai fragmensek azonosításának megbízhatósága. Előfordulhat, hogy a szoftverek nem valódi fragmenseket, hanem zajcsúcsokat azonosítanak MS-fragmenseként, valamint többszörösen töltött ionok átfedő izotópkötegeit gyakran nem megfelelően értelmezik. A nyers adatok manuális ellenőrzésével a szoftveres kiértékelés buktatói kiküszöbölhetők vagy legalábbis ezek előfordulása minimalizálható.

Automatizált, összehasonlító jellegű vizsgálatok az aminosav-szekvencia igazolására

Miközben egy bioszimiláris készítmény fejlesztésének kezdetén szükség van az originátor termék teljes szekvenciájának meghatározására, addig nem kivitelezhető és nem is indokolt ugyanezt a részletes vizsgálatot elvégezni a fejlesztés későbbi fázisaiban vagy a termelés során vizsgálandó gyártási sarzsok esetében. Mindazonáltal ekkor is igazolnunk kell a szekvencia azonosságát az originátor termékhez hasonlítva, sokszor igen nagyszámú mintán. Ezt a feladatot szintén peptidtérkép-összehasonlítással, bottom-up megközelítéssel végezzük, bizonyítva, hogy ugyanazok a peptidszakaszok keletkeznek az originátor és a bioszimiláris termék enzimatisz emésztése során. Ekkor a hatékonyság növelése érdekében – a nagy mintaszám miatt – célszerű a peptidtérkép-adatok kiértékelésének bonyolult és hosszadalmas munkafolyamatát automatizálva vagy részben automatizálva végezni. Ehhez nagy számításigényű, költséges szoftverekre van szükség. Az MS-készülékek gyártói a bioszimiláris ipar felfutásával párhuzamosan olyan „biopharma” célszoftvereket dobtak a piacra, amelyek erre alkalmasak (Bruker, BioPharma Compass; Thermo Fisher Scientific, BioPharma Finder; Waters, BioPharmaLynx; Sciex, BioPharmaView). Emellett számos gyártófüggetlen szoftvert is találhatunk a piacon (Genedata Expressionist, ProteinMetrics, PEAKS), amelyek bármely típusú készülék adatait képesek kezelni és a készülékgyártók szoftvereinél sok tekintetben rugalmasabb, a gyógyszeripari környezethez jobban illeszkedő megoldást kínálnak. A szoftverek kiválasztásánál rendkívül fontos, hogy a kiértékelő munkafolyamatok validálhatóak legyenek és a gyógyszeripari minőségbiztosítással összhangban működjenek.

Összefoglalás

A biotechnológiai úton előállított terápiás fehérjék elsődleges szerkezetének, azaz aminosav-szekvenciájának meghatározása során lényegesen több analitikai adatra van szükségünk, mint egy fehérje azonosítása során, amelyben részleges szekvenciafedettség is elégséges ahhoz, hogy egy fehérjét azonosítottként tekint-

sünk. A terápiás fehérjék teljes aminosav-szekvenciáját holisztikus megközelítéssel tudjuk meghatározni, különböző enzimatisz emésztmények vizsgálata mellett egymást kiegészítő fragmentációs technikákat alkalmazunk úgy, hogy az izobár aminosavakat is egyértelműen azonosítsuk. Ezt az átfogó aminosav-szekvencia-analízist a bioszimilárisok fejlesztése elején az originátor termékre nézve célszerű elvégezni ahhoz, hogy megbízható szekvenciaadatokkal indítsuk a klónozást. A bioszimiláris fejlesztés különböző fázisaiból származó sarzsok aminosav-szekvenciáját is igazolni kell, amely peptidtérkép-mérések adatainak automatizált összehasonlító vizsgálatával hatékonyan hajtható végre.

A tömegspektrometria területén tapasztalható biztató technikai fejlesztések, például az új, nagyobb felbontást, tömegpontos-ságot és érzékenységet nyújtó analízátorok, a kiegészítő szekvenciaadatokat szolgáltatató új fragmentációs technikák mind azt sugallják, hogy a jövőben az idő- és munkaigényes bottom-up megközelítés helyett (amely jelenleg a legszélesebb körben alkalmazott megközelítés), az analitikusok egyre inkább a middle-up/middle-down vagy esetleg a top-down megközelítést fogják alkalmazni a biotechnológiai eredetű fehérjegyógyszerek elsőrendű szerkezetének jellemzésében. Az adatok értékelésében várhatóan még nagyobb szerep jut majd a szoftvereknek, és a teljes adatértékelési munkafolyamatok automatizálásával lehetővé válik a gyógyszerhatóságok által igényelt, nagyszámú mintára kiterjedő összehasonlító tanulmányok hatékony kivitelezése.

IRODALOM

- [1] CDER/CBER, FDA, Guid. Ind., 2015.
- [2] EMA, Biological guidelines, <http://www.ema.europa.eu>
- [3] M. K. Parr; O. Montacir; H. Montacir, J. Pharm. Biomed. Anal. (2016) 130, 366–389.
- [4] A. Beck; F. Debaene; H. Diemer; E. Wagner-Rousset; O. Colas; A. V. Dorsselaer; S. Cianféran, J. Mass Spectrom. (2015) 50, 285–297.
- [5] K. Sandra; I. Vandenheede; P. Sandra, J. Chromatogr. A (2014) 1335, 81–103.
- [6] H. Zhang; W. Cui; M. L. Gross, FEBS Lett. (2014) 588, 308–317.
- [7] A. Makarov, Anal. Chem. (2000) 72, 1156–1162.
- [8] J. E. P. Syka; J. J. Coon; M. J. Schroeder; J. Shabanowitz; D. F. Hunt, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2004) 101, 9528–9533.
- [9] D. Ayoub; W. Jabs; A. Resemann; W. Evers; C. Evans; L. Main; C. Baessmann; E. Wagner-Rousset; D. Suckau; A. Beck, MABs (2013) 5, 699–710.
- [10] Y. O. Tsybin; L. Fornelli; C. Stoermer; M. Luebeck; J. Parra; S. Nallet; F. M. Wurm; R. Hartmer, Anal. Chem. (2011) 83, 8919–8927.
- [11] L. Fornelli; E. Damoc; P. M. Thomas; N. L. Kelleher; K. Aizikov; E. Denisov; A. Makarov; Y. O. Tsybin, Mol. Cell. Proteomics (2012) 1–39.
- [12] L. Fornelli; D. Ayoub; K. Aizikov; A. Beck; Y. O. Tsybin, Anal. Chem. (2014) 86, 3005–3012.
- [13] VIII. Magyar Gyógyszerkönyv – 2.2.55. fejezet (2010) 775–778.
- [14] T. Dashivets; J. Stracke; S. Dengli; A. Knaupp; J. Pollmann; J. Buchner; T. Schlothauer, MABs (2016) 8, 1525–1535.
- [15] W. Y. K. Chan; T. W. D. Chan; P. B. O'Connor, J. Am. Soc. Mass Spectrom. (2010) 21, 1012–1015.
- [16] M. Cao; W. Mo; A. Shannon; Z. Wei; M. Washabaugh; P. Cash, PDA J. Pharm. Sci. Technol. (2016) 70, 490–507.
- [17] M. Sitbon; L. D'Auriol; H. Ellerbrok; C. André; J. Nishio; S. Perryman; F. Pozo; S. E. Hayes; K. Wehrly; P. Tambourin, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1991) 88, 5932–6.
- [18] Y. Xiao; M. M. Vecchi; D. Wen, Anal. Chem. (2016) 88, 10757–10766.
- [19] D. Bagal; E. Kast; P. Cao, Anal. Chem. (2017) 89, 720–727.
- [20] K. O. Zhurov; L. Fornelli; M. D. Wodrich; Ü. A. Laskay; Y. O. Tsybin, Chem. Soc. Rev. (2013) 42, 5041–5030.
- [21] P. Hernandez; M. Muller; R. D. Appel, Mass Spectrom. Rev. (2006) 25, 235–254.
- [22] M. R. Hoopmann; R. L. Moritz, Curr. Opin. Biotechnol. (2013) 24, 31–38.
- [23] B. Ma; K. Zhang; C. Hendrie; C. Liang; M. Li; A. Doherty-Kirby; G. Lajoie, Rapid Commun. Mass Spectrom. (2003) 17, 2337–2342.





Kiss Róbert¹ – Fizil Ádám² – Szántay Csaba¹

¹Richter Gedeon Nyrt., Szerkezetkutatási osztály

²Richter Gedeon Nyrt., Biotechnológiai Analitikai osztály

Az NMR-spektroszkópia szerepe a biologikumok analitikájában

Bevezetés

Az elmúlt két évtizedben a gyógyszeripar globális piaca jelentős átalakulásokon ment keresztül, melyek közül kétségtelenül a leglátványosabb a biotechnológiai úton előállított gyógyszereknek a hagyományos (kismolekulás, azaz tipikusan néhány száz Da molekulatömegű) gyógyszerekkel szemben való térnyerése. A biotechnológiai gyógyszerkészítmények (ún. biologikumok) hatóanyaga – amely többnyire fehérje – nem csupán az előállítás módjában különbözik a hagyományos gyógyszerhatóanyagoktól, hanem a molekula méretében (a nagyobb terápiás fehérjék kb. 1300 aminosavból álló és közel 150 000 Da tömegű „monstrumok”), szerkezetének összetettségében és szerkezeti heterogenitásában is nagyságrendnyi különbségek vannak. A biológiai gyógyszerhatóanyagok szerkezetének jellemzésében a mágneses magrezonancia (*nuclear magnetic resonance*, NMR) spektroszkópia és a tömegspektrometria (*mass spectrometry*, MS) nyújtják a legbővebb – a többi spektroszkópiai módszerhez képest egyedülálló módon atomi felbontású – információt (itt eltekintünk az ugyancsak atomi felbontású egykristály-röntgendiffrakciótól, amelynek használata a jelen cikkben tárgyalt analitikai problémák tekintetében erősen limitált). Fontos hangsúlyozni, hogy az „NMR-spektroszkópia” és az „MS” is gyűjtőfogalom, hiszen mindkettő jelenleg is intenzíven fejlesztett módszerek sokaságát foglalja magában.

A kismolekulás gyógyszerhatóanyagok és a biologikumok szerkezetvizsgálatában az NMR és MS önmagukban is, továbbá egymás kiegészítőként is merőben más szerepet töltenek be, más-más módszertani apparátust használva. A kismolekulák esetében a „szerkezet” fogalma egyértelmű abban a tekintetben, hogy adott hatóanyag egyetlen és csakis egyetlen, egzaktul definiált konstitúcióval, illetve relatív és abszolút konfigurációval rendelkező molekulát jelent. Bárki, bárhol és bármikor állítja elő ezt a hatóanyagot (például az originátor hatóanyagát egy generikus gyártó), minden sarzs minden egyes hatóanyag-molekulájának pontosan ilyen szerkezetűnek kell lennie, amit az esetek túlnyomó többségében NMR és MS segítségével egyértelműen bizonyítani is lehet. A kismolekulák szerkezetvizsgálatában az MS legfőbb szerepe az elemi összetétel meghatározása, esetlegesen kiegészítve a konstitúcióra vonatkozó hasznos, de nem mélyreható adatokkal, míg az NMR „dolga”, hogy a molekula konstitúcióját és térszerkezetét mélyrehatóan és egzaktul feltárja, amire többnyire *ab initio* módon (tehát referens szerkezetekkel való összehasonlítás nélkül) is képes. Ezek a szerepekörök jól ismertek és jól körülhatároltak. Ezzel szemben a biologikumok világában (később bő-

vebben részletezett okokból) már maga a *szerkezet* definíciója is más értelmezést kíván meg, és így merőben más típusú fizikai-kémiai jellemzést, új analitikai módszerek kidolgozását teszi szükségessé, amelyben az MS és NMR alkalmazott módszertana és szerepköre is teljesen eltérő. A *szerkezet* értelmezésével kapcsolatban az okozza az egyik nehézséget, hogy adott gyártásból származó hatóanyag-sarzsban belül megjelenik némi szerkezeti variabilitás az egyes biomolekulák között, és a különböző helyeken és időben gyártott sarzsok sem pontosan egyformák a szerkezet minden részlete tekintetében. A szabadalom lejártával az originátor hatóanyagát „másoló” gyártók hatóanyaga ezért sohasem egyezik meg *pontosan* az eredetivel, a reális cél csak az lehet, hogy *kellően hasonló* legyen hozzá. Ezért van az, hogy az ilyen „másolt” biologikumokat nem biogenerikus, hanem „*biohasonló*” vagy „*bioszimiláris*” (angolul *biosimilar*) gyógyszereknek nevezzük. A nemzetközi gyógyszeripari tevékenységeket szabályozó hatóságoknak – ilyen az Európai Unióban a European Medicines Agency (EMA), az USA-ban pedig a Federal Drug Administration (FDA) – tehát a biologikumokra nézve olyan új gyógyszerbiztonsági és minőségi kritériumokat kellett kidolgozniuk, amelyek sok tekintetben különböznek a hagyományos gyógyszerekétől [1, 2]. Ezeknek a minőségi kritériumoknak a lefektetése rengeteg kihívást jelent, hiszen közel sem egyértelmű, hogy a biomolekulák számos szerkezeti aspektusát számításba véve pontosan mit értünk „kellően hasonló” alatt, és hogy ezt a hasonlóságot milyen analitikai módszerekkel és milyen mélységben kell, illetve lehet megfelelően demonstrálni. A terület jelenleg is számos „szürke zónát” tartalmaz, de folyamatosan fejlődik, méghozzá a gyógyszeripari analitikusok, az analitikai műszergyártók és a hatóságok olyan dinamikus, egymást presszionáló/inspiráló kölcsönhatásában, ahol a szakmai és technikai kérdéseken túl az egyes gyógyszeripari szereplők közötti verseny is döntő szerepet kap.

Habár a jelenlegi általános gyakorlat szerint különösen a nagyméretű fehérjék szerkezeti jellemzésének legfőbb eszköze az MS, a jelen cikkkel arra szeretnénk rávilágítani, hogy mennyire kivételes, olykor nélkülözhetetlen szerepet tölthet be az NMR a biologikumok, leginkább a fehérjealapú biohasonló biologikumok fejlesztésében. Azért tartjuk fontosnak tisztázni ennek az egyedülálló szerepnek a mibenlétét, mert az részben a biologikumokat érintő hatósági szabályozások jelenleg is tartó formálódása miatt, részben pedig a gyógyszeripar rendkívül összetett, multidiszciplináris működéséből adódóan sem a szűkebb szakma (gyógyszeralitika, spektroszkópia), sem pedig a biologikum ipar tágabban vett szereplői számára nem mondható jól megértett és letisztult



státuszának. Az elmúlt három-öt év során ebben a témában megjelent szakirodalom összefoglalásával és a Richter Gedeon Nyrt.-ben egy évtizede folyó biotechnológiai fejlesztések során összegyűlt szakmai tapasztalataink alapján szeretnénk egyrészt bemutatni, hogy a biotechnológiai fejlesztések során a gyógyszeriparban dolgozó NMR-spektroszkópus milyen változatos problémafelvetésekkel szembesül, másrészt, hogy e kérdések megválaszolására az NMR-eszköztár milyen széles palettája áll rendelkezésére.

A fenti célkitűzéssel összhangban, a részletek tárgyalása előtt fontos kiemelni azt a kontextust, ami a gyógyszeriparban a biológikumok jellemzésére alkalmazott NMR-spektroszkópiát a többnyire az akadémiai szférában művelt, felfedező jellegű kutatásokat célzó/támogató biomolekuláris NMR diszciplínájától lényegesen megkülönbözteti. Utóbbi több mint 30 éves hagyományokra tekint vissza, és módszertana, bár folyamatosan fejlődik, jól kiérleltnek tekinthető. Az ilyen NMR-kutatások zöménél a vizsgált biomolekulát igen speciális körülmények között mérjük: preparatív kromatográfiás módszerekkel tisztított formában, a spektroszkópiai méréseknek kedvező fizikokémiai körülmények között, melyek közül talán a leglényegesebb, hogy a molekulát az erre alkalmas biotechnológiai eszközök, ún. expressziós rendszerek segítségével „NMR-aktív”, vagyis mágneses momentummal rendelkező stabil izotópokkal (legfőképpen ^{15}N és/vagy ^{13}C) dúsított formában állítjuk elő. Erre azért van szükség, mert a mágneses magrezonancia jelensége csak az NMR-aktív atomokon „működik”, egy protein szerkezeti jellemzése szempontjából az NMR-spektroszkópia legfőbb ereje pedig éppen abban rejlik, hogy képes annak három legfőbb atomfajtája (H, C, N) közt a térbeli, illetve kötésekben át ható atomi kölcsönhatásokat feltérképezni. Míg azonban az NMR-aktív ^1H -izotóp természetes előfordulása 99,99%, a C és N domináns természetes izotópjai, vagyis a ^{12}C (98,93%) és ^{14}N (99,63%), nem NMR-aktív (illetve a ^{14}N esetében fizikai okokból nehezen vizsgálható) magok, addig az NMR-rel jól vizsgálható ^{13}C (1,07%) és ^{15}N (0,37%) izotópok természetes előfordulási aránya mellett sokszor irreálisan hosszú mérésekre lenne szükség. Amennyiben azonban a vizsgált molekulát e követelményeknek megfelelően sikerült preparálni, bonyolult többdimenziós NMR-mérési módszerek (ún. pulzusszekvenciák) száza állnak rendelkezésünkre, melyek alkalmasak arra, hogy atomi felbontású térszerkezeti és dinamikai (a molekulák belső mozgásait leíró) információt nyerjünk. [3, 4] Kis túlzással élve a jelenleg elérhető biotechnológiai és NMR-mérési technikai háttérrel csak a kutatásra szánt költség és idő kérdése, hogy adott (megfelelő méretű és megfelelő körülmények között vizsgált) biomolekula esetében felmerülő szerkezeti kérdést a megfelelő módszer kiválasztásával megválaszoljuk. Ezzel szemben gyógyszeripari körülmények között az alkalmazható NMR-módszerek tárháza drámaian lecsökken, mivel a terápiás fehérjéket stabilizáló segédanyagokat tartalmazó sokkomponensű pufferoldatban forgalmazzák, és a gyártási körülmények nem teszik lehetővé a fehérje-hatóanyagok izotópjelölt formában történő előállítását. További különbség, hogy a bioanalitika feladatköre nem merül ki a termék jellemzésében: a fejlesztésnek szinte minden lépése folyamatos analitikai támogatást igényel, például a fermentáció körülményeinek optimalizálása vagy a gyártásközi szennyezők azonosítása és jellemzése tekintetében. Ezért a biotechnológiai gyógyszeriparban dolgozó NMR-spektroszkópus számára az jelenti az egyik legnagyobb kihívást, hogy a komplex fejlesztési folyamat egészét átlátva felismerje az NMR-spektroszkópiával megoldható kérdéseket és az elérhető módszerek soka-

ságából kiválassza a megfelelőt. Ezt a tevékenységet tágabban értelmezve egy harmadik (az első kettőnél semmivel sem kisebb) kihívás is adódik, melyet a jelen összefoglaló is szolgál: az NMR-eredmények megfelelő interpretálása és a szakmai közeg felé több szinten történő kommunikálása. Ezt azért is fontos hangsúlyozni, mert minden biológikum kifejlesztése egy nagy létszámú multidiszciplináris csapat munkáján alapul, a csapatbeli együttműködés minősége pedig döntően fontos a sikerhez. Ebben az együttműködésben elengedhetetlen, hogy ne csak az NMR-spektroszkópusok értsék, mivel tudnak hozzájárulni a folyamathoz, hanem ez a csapat egésze számára is – legalább koncepcionális szinten – világos legyen. Ezekről a motivációktól vezérelve összegeztük a területen szerzett tapasztalatainkat és a legfrissebb szakirodalmat egy nemrég angolul megjelent összefoglaló formájában [5]. A jelen írás e korábbi cikk magyar nyelvű kivonata és egyben kiterjesztése is.

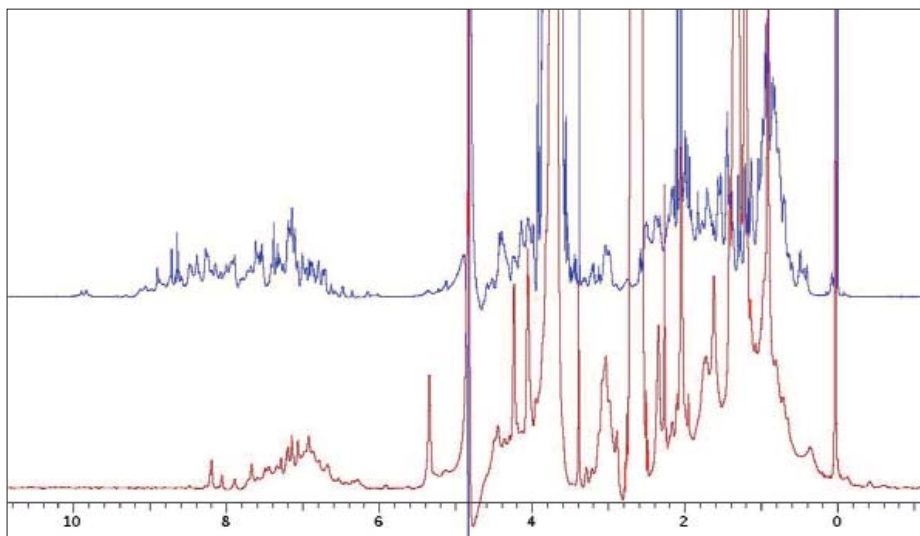
Terápiás fehérjék szerkezetvizsgálata

Biohasznos termékek szerkezetének jellemzése a hatósági elvárások tükrében

A kismolekulás gyógyszerek jellemzésében is általánosan elfogadott megközelítés, hogy egy molekuláról szerzett tudásunkat annál részletesebbnek és teljesebbnek tekintjük, minél többféle (egymástól eltérő fizikai elven működő) analitikai mérésnek vetjük alá. A biomolekulákra ez fokozottan érvényes, hiszen szerkezetük (többek közt méretükből adódóan) nem csak jóval összetettebb, de már egy-egy gyártási sarzsón belül is heterogenitások fedezhetők fel, azaz nem feltétlenül beszélhetünk a hatóanyag-molekula homogén oldataról, hanem egymáshoz nagymértékben hasonlító, de egyedileg kis különbségeket mutató molekulák sokaságáról. Ezért az analitikai mérések során e változó tulajdonságok átlagát vizsgáljuk, és a módszerek jelentősen eltérnek abban, hogy milyen jellegű különbségekre érzékenyek. A fenti okok miatt a biohasznos hatóanyagok szerkezetére vonatkozó minőségi kritériumok is nehezen megfogalmazhatók.

A fehérjék biológiai funkcióját a primer és magasabb rendű szerkezet (higher order structure, HOS), továbbá az ún. poszt-transzlációs módosítások (lásd alább) együttesen határozzák meg. Ezért a biohasznosság demonstrálásában hatósági elvárás az, hogy az originátor hatóanyagával való összehasonlítás olyan analitikai módszerek minél kiterjedtebb alkalmazásán alapuljon, amelyek külön-külön a lehető leginkább alkalmasak ezeknek a szerkezeti aspektusoknak a robusztus és érzékeny monitorozására. Fontos igazolni, hogy az egyes sarzsok közötti, illetve a bioszimiláris és az originátor hatóanyaga közötti eltérések az egyes analitikai adatokban egy meghatározott elfogadási határon belül vannak, továbbá értelmezni kell az eltérések szerkezeti okát és tisztázni kell azok biológiai relevanciáját.

A terápiás fehérjék magasabb rendű szerkezetének vizsgálata a bioanalitika egyik legnehezebb feladata. Habár más technikák is, mint például a Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FT-IR) vagy a cirkuláris dikroizmus (CD) többé-kevésbé érzékenyek a magasabb rendű szerkezet változásaira, nem adnak lehetőséget az eltérések lokalizálására a fehérjén belül. A proton-deutérium csere tömegspektrometria (HDX-MS) ugyan nyújthat lokális információt a fehérjék konformációjáról vagy konformációs dinamikájának változásairól, azonban a minta-előkészítés rendkívül idő- és munkaigényes, és csak megfelelő szintű automatizáltság mellett ad reprodukálható eredményt. A folyadékfázisú NMR-spektroszkópia a vízdékony fehérjék natív közegben



1. ábra. Egy közepes méretű (17 kDa) rekombináns fehérjét tartalmazó készítmény (felül), valamint egy közel hétszer több ^1H -atommal rendelkező monoklonális antitestet (150 kDa) tartalmazó készítmény 1D ^1H NMR-spektruma (alul). Utóbbi a molekula méretéből adódó zsúfoltság és jelszélesedés miatt jóval kevesebb értékelhető jelet tartalmaz

történő magasabb rendű szerkezetvizsgálatának leghatékonyabb eszköze. A biológikumok jelentős része olyan méretű fehérjék vizsgálatát, amely lehetővé teszi NMR-spektroszkópiás vizsgálatukat.

A fentebb említett „NMR-barát” minta-előkészítési lépések híján, a biológiai hatóanyagok NMR-vizsgálatakor első közelítésben a legkézenfekvőbb megoldást a jól detektálható egydimenziós (1D) ^1H NMR-spektrumok elkészítése jelentheti. Egy 1D ^1H NMR-spektrumban (például a CD-spektrumokkal ellentétben) minden egyes jel egyedi H-atomokhoz rendelhető, a jelek kémiai eltolódása pedig információt hordoz a hidrogénatomok kémiai környezetéről, az aminosavak konfigurációjáról, konstitúciójáról és konformációjáról.

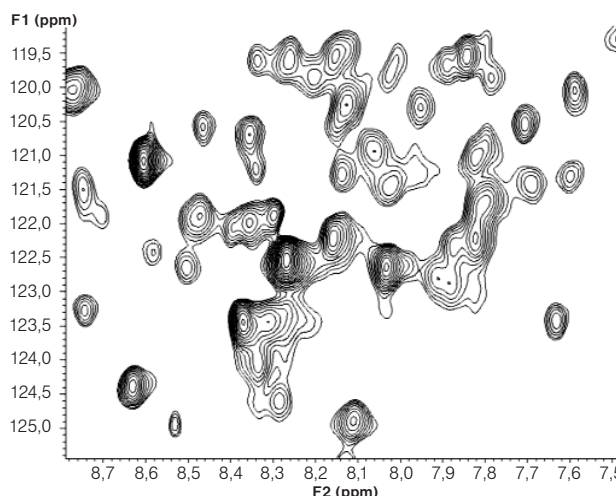
Kisméretű fehérjék esetében (kevesebb, mint 30 aminosav) gyakran az 1D ^1H NMR-spektrumban minden egyes H-atom jele különálló jelet ad és így a fehérje szerkezete atomi szinten jellemezhető. A fehérje méretének növekedésével a jelek kiszélesednek és a spektrumok zsúfolttá válnak (1. ábra).

Rituximab- és filgrastimminták esetében sikerrel alkalmazták az 1D ^1H NMR-spektrumokat szerkezeti összehasonlításra [6, 7]. A spektrumok értékelését nehezíti, hogy a fehérjék mellett jelentős mennyiségben hozzáadott segédanyagok ugyancsak jelet adnak, ezzel elfedve a fehérje jeleinek jelentős részét. Az ilyen zavaró jelek kiküszöbölésére lehetséges megoldás a teljes puffercsere. Ez a módszer azonban felvetheti a kérdést, hogy a puffercsere során a fehérje szerkezete nem változhatott-e meg, ami például a hatóságok szemszögéből aggályos lehet és nemkívánatos vitára adhat okot. Az NMR-spektroszkópia fizikájának sokrétűsége, hatalmas módszertani tárháza, továbbá az NMR-spektroszkópikus kreativitása azonban számos lehetőséget nyújt a probléma megoldására. Például Poppe és munkatársai [8] a kismolekulák és fehérjék NMR-rel is jól detektálható eltérő diffúziós tulajdonságait használva csökkentették (különböző módszertani megoldásokkal) a segédanyagok jeleinek intenzitását a spektrumokban. A módszerük hatékonyságát különböző monoklonális antitesteket tartalmazó készítmények mintáin igazolták. Franks és munkatársai [9] a molekulák eltérő relaxációs tulajdonságait használták ki hasonló céllal.

A növekvő molekulamérettel az 1D ^1H NMR-spektrumokban a jelek száma és szélessége is nő, így egy adott mérethatár fölött (kb. 35 kDa) a spektrumok kezelhetetlenül zsúfolttá válnak. Ez a probléma kétdimenziós (2D) NMR-spektrumok felvételével hatékonyan kezelhető, amelynek számos formája létezik, azonban el-

készítésük meglehetősen időigényes. A 2D NMR-spektrumok két egymásra merőleges 1D spektrum jelei között ún. keresztcsúcsok formájában jelenítik meg a téren vagy kötéseken át közvetített atomi kölcsönhatásokat. Például az ún. 2D ^1H - ^1H NOESY- (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) spektrum keresztcsúcsai azt mutatják meg, hogy a fehérje mely H-atompárjai vannak térben egymáshoz kb. 5 Å távolságnál közelebb. Freedberg és munkatársai [10] 2D ^1H - ^1H NOESY-spektrumokat használtak rituximab- és filgrastimminták vizsgálatára. Ugyanakkor pl. a 2D ^1H - ^{15}N HSQC- (Heteronuclear Single Quantum Correlation) és 2D ^1H - ^{15}N HMQC- (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) spektrumokban a keresztcsúcsokból az olvasható ki, hogy a fehérje mely H-atomja kötődik közvetlenül, vagy több kovalens kötésen át, a fehérje valamely N-atomjához. A ^1H - ^{15}N HSQC- és HMQC-spektrumok egyszerre nyújtanak megoldást a zsúfoltság és a segédanyagok intenzív jelei okozta problémák kiküszöbölésére (2. ábra). Egyrészt, mivel az amidcsoportok közvetlenül a fehérje gerincében helyezkednek el, kémiai eltolódásukat a fehérjegerinc konformációjának változása jelentősen befolyásolja. Éppen ezért egy adott fehérje minden egyes konformációjához a 2D spektrumokban egy specifikus keresztcsúcsmintázat tartozik, vagyis a spektrumok amolyan kétdimenziós „ujlenyomatként” használhatók.

2. ábra. Egy ~20 kDa molekulatömegű rekombináns fehérje természetes izotóp-előfordulás mellett felvett ^1H - ^{15}N HSQC-spektruma. Minden egyes keresztcsúcs a spektrumban egy N-H-kötéshez rendelhető





Másrészt, míg a fehérje egyes aminosavai egy, esetleg két N–H-kötést tartalmaznak, a segédanyagokban nincs ilyen egység, ezért a spektrumok jelentősen egyszerűsödnek és a segédanyagok sem adnak jelet. Ugyanakkor a mérésekhez szükséges időt jelentős mértékben megnöveli, hogy a spektrumokat szükségszerűen természetes izotóp-előfordulás mellett (^{13}C és ^{15}N természetes előfordulása 1,07, illetve 0,37%) kell felvenni. 2D ^1H – ^{15}N HSQC-spektrumok alkalmazásával sikeresen vizsgálták például inzulin [11] és interferon-alpha [12] készítmény hatóanyagának szerkezetét.

Aubin és munkatársai [13] izotópjelölt fehérjék vizsgálatával igazolták, hogy akár egy aszparagin-oldallánc deamidációja ($\text{NH}_2 \rightarrow \text{OH}$ csere) is jól detektálható változást okoz a fehérje ^1H – ^{15}N HSQC-spektrumában. Ugyanakkor arra is rámutattak, hogy az oldatkörülmények (pH, ionerősség) kismértékű eltérései is jelentős hatással vannak az amidcsoportok kémiai eltolódására.

Arbogast [14] metilcsoportokra szelektív ^1H – ^{13}C HMQC-spektrumok alkalmazását javasolta az eltérő oldatkörülményekből adódó anomáliák kiküszöbölésére. A hidrofób metilcsoportok kémiai eltolódását ugyanis kevésbé befolyásolja a pH, mint a vízzel csefolyamatban lévő amidcsoportokét.

Adott fehérje-méretehatár fölött, például monoklonális antitestek esetében, a 2D spektrumok is túlságosan zsúfoltá válhatnak. Arbogast és munkatársai [15] enzimatisz emésztéssel az ilyen molekulákat kettévágták, ezzel jobb minőségű HSQC-spektrumok felvételére nyílt módjuk. Igazolták, hogy a hasítás érdemben nem befolyásolta a fehérje szerkezetét.

A bioszimiláris hatóanyagok jellemzése, ún. összehasonlító vizsgálatok (*comparability studies*) keretében történik, ahol a bioszimiláris és az originátor termékek különböző fizikokémiai paramétereit páronként vetik össze. Az, hogy ez az összevetés pontosan milyen módszerrel történjék meg, jelenleg intenzíven fejlesztett és egyúttal vitatott terület: elvi szinten természetesen az lenne kívánatos, ha az összehasonlítandó analitikai adatok között a hasonlóság mértékét valamilyen kemometria módszerrel számszerűsíteni lehetne, és így egyértelmű megfelelőségi kritériumokat lehetne definiálni, a gyakorlatban azonban ez számos nehézséget vet fel. Az NMR-spektrumok összehasonlításának leg egyszerűbb módja a vizuális összevetés, ami nem mentes a szubjektív elemektől és a hasonlóság mértékének számszerűsítését sem teszi lehetővé, azonban a módszer előnye, hogy több spektrum összevetésére ad módot és a „szakértői szem” jó eséllyel azonnal értelmezni tudja az eltérések szerkezeti okát, biológiai relevanciáját. A kemometria módszerek növelik az objektivitást, azonban eltérések esetén továbbra is szükséges a vizuális értékelés. A kemometria értékelés során alkalmazandó matematikai módszerek kiválasztása függ a spektrumok minőségétől és számától. Kevésbé zsúfolt, jó felbontású spektrumok esetében lehetőség van az úgynevezett peak-to-peak (csúcsról csúcsra) analízisre, ahol a jelek kémiai eltolódását és jelintenzitását a vizsgált minták spektrumaiban egyenként vethetjük össze. [13] Nagyméretű fehérjék esetében, ahol a spektrumok gyakran zsúfoltak és jelátfedésekkel terheltek, célravezető lehet a spektrumok kis részletekre való osztásán alapuló ún. bucketing vagy binning alapú feldolgozás. [16] Az így kapott adatsorokat más-más statisztikai eszközökkel dolgozhatjuk fel attól függően, hogy két vagy nagyszámú adatsort kívánunk összevetni. [17]

Posztranszlációs módosítások vizsgálata

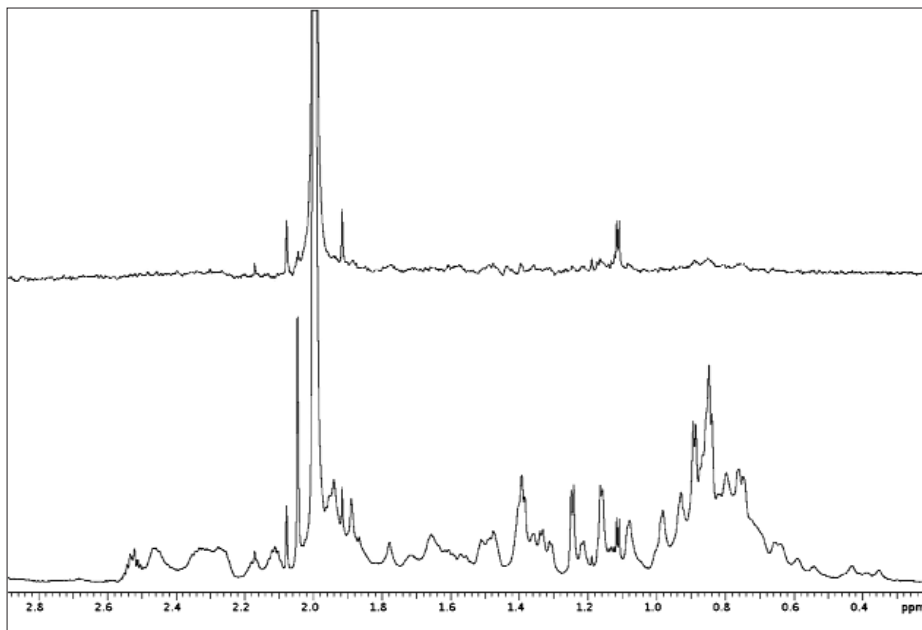
A fehérjék bioszintézisének azt a szakaszát, mely során egy összetett biokémiai láncolatot keresztül a nukleinsavakban kódolt genetikai kódnak megfelelő polipeptidlánc kialakul, transzláció-

nak nevezzük (utalva ezzel egyik „nyelvről” vagy kódolási mód-ról egy másikra történő lefordításra). Ezen nevezéktan mentén az olyan változásokat, melyek a fehérjék szerkezetében a transzláció után történnek, posztranszlációs módosításoknak nevezzük. Az ilyen módosítások közé soroljuk például a fehérjemolekulán belül bizonyos ciszteinpárok közötti kénhidak kialakulását, a bizonyos aminosav-oldalláncokhoz kovalensen kötött összetett szerkezetű oligoszacharidok kapcsolását, a deamidációt, de tágabb értelemben például a fehérje-polietilén-glikol (röviden PEG) konjugátumok mesterséges létrehozását („pegilációt”) is. Az ilyen változtatások a fehérje magasabb rendű szerkezetének kialakításában és biológiai szerepének betöltésében is kulcsfontosságú szerepet töltenek be, ezért analitikai vizsgálatuk is a hatóanyag jellemzésének kritikus eleme.

A molekulán belül létrejövő diszulfidhidak megléte és kapcsolódási sorrendje esszenciális a fehérjék magasabb rendű szerkezetének kialakításában és stabilizálásában. A diszulfidhidak mintázatának meghatározása a biomolekuláris NMR-területen sem mondható triviális kérdésnek, ugyanis amennyiben a fehérje adott pontossággal meghatározott térszerkezetéből a geometriai és távolság jellegű kritériumok alapján az nem következik egyértelműen, csupán két megközelítést kínálkozik: az összetartozó ciszteinpárok β -hidrogénjei közötti távolságmérés NOESY módszerekkel, vagy a ciszteinegységek szelenociszteinre való cseréje, és az így keletkező diszelenid hidak Se-atomjai közötti direkt csatolások mérése. [18] Ezek a megközelítések egyrészt biotechnológiai és NMR-méréstechnikai szempontból is számos nehézségbe ütközhetnek, másrészt a fent már részletezett okokból (pl. a készítmény izotópos dúsításának problematikája) gyógyszeripari körülmények között nem kivitelezhetők. Viszont miután a diszulfidhidak mintázata meghatározza a harmadlagos és negyedleges szerkezetet, az originális és bioszimiláris hatóanyagok NMR-spektrumainak összehasonlításával közvetett módon mégis egyértelmű információt nyerhetünk a diszulfidhidak hasonlóságáról vagy az esetleges eltérésekről.

A pegiláció során a fehérje adott NH-csoportjához (vagy csoportjaihoz) kovalensen polietilén-glikol-láncot kapcsolnak, ezzel javítva a terápiás fehérjék farmakodinamikai és farmakokinetikai tulajdonságait. Bioszimiláris fehérjék esetében kiemelten fontos azt igazolni, hogy ez a kapcsolódási pont az originátor termékével megegyezik. Ennek meghatározását leggyakrabban a fehérje enzimatisz emésztését követően az emésztmény LC–MS-analízisével végzik, ami az MS-módszer sajátosságai miatt elsősorban közvetett információt ad a PEG-lánc kapcsolódási pontjára. Az MS- és NMR-módszerek az ilyen kérdésekben egymást kiegészítő információt szolgáltathatnak, amire jó példa Wang és munkatársai munkája [19], melyben pegilált interferon alfa-2b fehérje enzimatisz emésztését, majd a keletkező peptidek kromatográfiás elválasztását követően, 1D, illetve 2D NMR-spektrumok segítségével – ilyen módon a „nagymolekulás” kérdést „kis-molekulás” kérdéssé alakítva – klasszikus NMR módszerekkel közvetlenül is igazolták a PEG kapcsolódásának helyét.

A glikoproteinek esetében – mely csoportba például a terápiás monoklonális antitestek is tartoznak – a polipeptidhez kapcsolódó oligoszacharidok szerkezete és a különböző glikoformák eloszlása jelentős mértékben befolyásolhatja a fehérje biológiai aktivitását és immunológiai tulajdonságait. A glikánláncok vizsgálata komplexitásuk és heterogenitásuk miatt komoly kihívás elé állítja az analitikát. Mivel az emberi immunrendszer által idegenként felismert cukorformák már kis mennyiségben való előfordulás esetén is nemkívánatos immunreakciót válthatnak ki, a



3. ábra. A megfelelő NMR-mérési módszer alkalmazásával a nagy molekulatömegű összetevők jelei kiszűrhetők a spektrumból anélkül, hogy az egyes komponenseket fizikailag elválasztanánk. [21] Az alsó ábrán egy fehérjekészítmény ^1H NMR-spektrumának részlete, még a felsőn ugyan-ezen minta „relaxációs szűrt” ^1H NMR-spektrumának részlete látható. Míg az alsó spektrumon a fehérje jelei zsúfolttá teszik a spektrumot, a felső spektrumban jól azonosítható egy pufferkomponens (~ 2 ppm) és egy kioldódó szennyező jele (1,17 ppm)

glikánmintázat jellemzése az esetek többségében összetett enzim-es emésztéssel kombinált, nagy érzékenyséű LC–MS-módszerekkel történik. Az NMR-spektroszkópia glikoformák vizsgálatában betöltött szerepe olyan esetekben kerül előtérbe, amikor az MS módszerekkel nem megkülönböztethető (ún. izobár) cukoregységek elkülönítése vagy a kapcsolódó cukoregységek kapcsolódásának pontjai vagy anomer-konfigurációjának meghatározása a cél. Ilyen esetekben célravezető lehet az NMR- és LC–MS-módszerek együttes használata, melyre szép példát láthatunk Wiegandt és munkatársai publikációjában [20], melyben a cetuximab nevű terápiás antitest glikánmintázatát vizsgálták NMR- és LC–MS-módszerek kombinációjával és rámutattak, hogy ezzel a megközelítéssel el lehet különíteni az akár 15 pmol koncentrációban előforduló izobár N-glikán szerkezeteket is, ami fontos lehet az immunogén struktúrák jelenlétének kizárásában.

Alapanyagok minőségellenőrzése és technológiai eredetű szennyezők azonosítása

A biotechnológiai fejlesztések során az NMR szerepe messze túlmutat a hatóanyagok szerkezetvizsgálatán. A fejlesztés egymásra épülő, sokszor egymással párhuzamosan futó és igen összetett folyamatai során gyakran adódik olyan analitikai kérdés, melynek megoldásában az NMR kulcsfontosságú szerephez juthat, és módszertanilag a fent leírtaktól eltérő megközelítést követel. Az alábbiakban az ilyen jellegű analitikai kihívások és lehetséges megoldásaik közül sorolunk fel néhány példát.

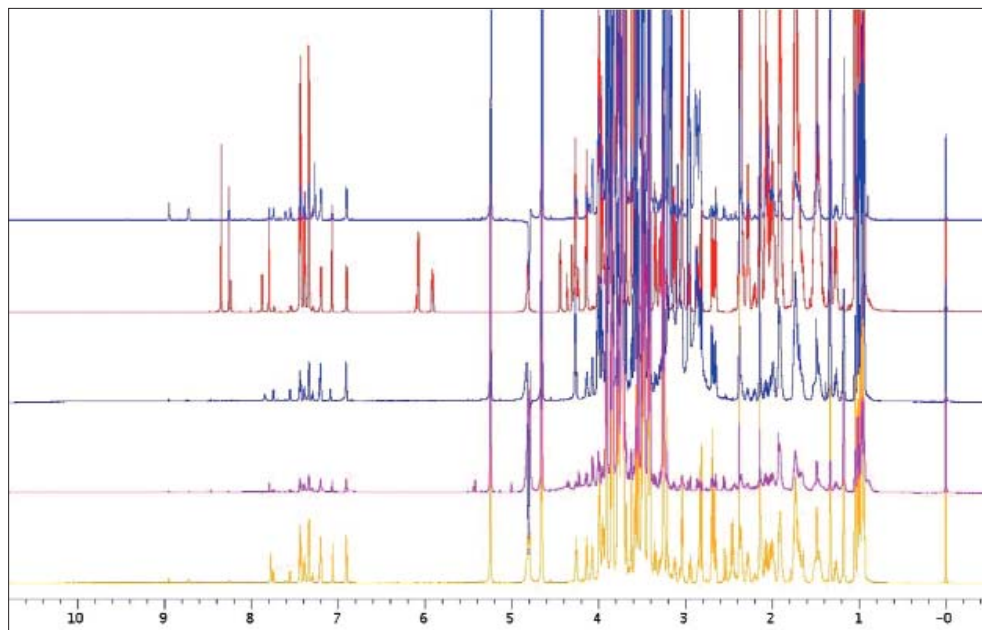
Kioldódó szennyezők vizsgálata

A biológiai készítmények gyártása során a tisztítási lépések hatékonyságának demonstrálása kiemelt szempont hatósági vizsgálatok során. A készítmények jellemzően olyan vizes oldatok, melyek a fehérje-hatóanyagon kívül kismolekulás összetevőket, például stabilizátorokat és pufferkomponenseket tartalmazhatnak. Ezekben a komplex oldatokban az ismert összetevők mellett azonosítani kell azokat a kismolekulás szennyezőket, melyek lehetnek magához a gyártás folyamatához köthető molekulák, vagy a gyártás során alkalmazott eszközökből kioldható vagy kioldódó szennyezők (utóbbiakra az angol nyelvű irodalomban az extractable and leachable, röviden E&L kifejezés használatos). A

gyártási folyamathoz köthető szennyezők lehetnek például a termelő sejt kultúrából származó anyagok (pl. az ún. gazdasejtből származó DNS és fehérje), a fermentáció tápközegéből származó tápanyagok és metabolitjai vagy a hatóanyag tisztítási lépéseinek valamelyikéből származó anyagok. A szennyezők másik lehetséges forrása a gyártás során és a termék tárolása során használt – a biotechnológia-iparban egyre elterjedtebb – egyszer használatos, jellemzően műanyag eszközök, melyekből például lágyítók, stabilizátorok, valamint ezek bomlástermékei oldódhatnak be a készítménybe. A szennyezők detektálása és azonosítása a fehérje hatóanyaga és a segédanyagok mellett különösen nehéz feladat, és gyakran többféle analitikai módszer (VRK, HPLC–MS, GC) együttes alkalmazását igényli. Ezen a területen az NMR kiemelt szerephez juthat, mivel a többi technikához képest egyedülálló módon a kvázi-intakt mintáról módosítás vagy fizikai elválasztás nélkül egyszerre kaphatunk minőségi és mennyiségi információt az összes előforduló szennyezőről. Ezek az adatok egyrészt fontos kiindulási pontot vagy kiegészítő információt szolgáltatnak a többi módszerrel történő vizsgálatokhoz, másrészt olyan szennyezők is azonosíthatóvá válnak, melyek más analitikai módszerekkel, például a hozzájuk köthető minta-előkészítési lépések miatt, nem detektálhatók (3. ábra). Skidmore és munkatársai olyan NMR-mérési módszert dolgoztak ki, mely alkalmas a kis molekulatömegű molekulák vizsgálatára olyan oldatok esetében, melyek nagy koncentrációban fehérjét is tartalmaznak [21]. A módszer azt a jelenséget használja ki, hogy a gerjesztő pulzusokat követően a kismolekulák és a fehérjék H-atomjai jelentősen más sebességgel térnek vissza a termikus egyensúly állapotába, azaz más a relaxációs idejük. Ezt a különbséget kihasználva, egy speciális pulzusszekvencia segítségével, a fehérjétől származó jelek intenzitása nagymértékben csökkenthető (akár teljesen elnyomható), így a kismolekulás szennyezők minőségi és mennyiségi azonosítása egyetlen mérésben, elválasztás nélkül is megvalósítható.

Fehérjék mennyiségi meghatározása

Egy gyógyszerkészítményben a hatóanyag koncentrációjának meghatározása mind farmakokinetikai, mind a biohasonlóság szempontjából az egyik legkritikusabb analitikai feladat. Ugyanakkor ismert jelenség, hogy fehérjeknél és peptideknél a meny-



4. ábra. A terápiás fehérjék gyártásához használt alapanyagok ^1H NMR-spektrumainak összehasonlítása

nyiségi meghatározás klasszikus módszerei egyes esetekben eltérő eredményeket adhatnak [22]. Az NMR-spektroszkópia elvben nagyon is alkalmas lehet az oldatban lévő hatóanyag mennyiségi meghatározására, hiszen megfelelő mérési körülmények között az ^1H NMR-spektrumban az egyes jelek jel alatti területei (integráljai) egyenesen arányosak a jelet adó protonok számával, függetlenül attól, hogy a kérdéses protonok ugyanabból vagy más molekulából származnak. Ismert koncentrációjú referencia alkalmazásával ezért elméletileg megoldható a fehérjekoncentráció meghatározása. A vizsgált oldathoz adott belső referenciavegyület a fehérjéhez való kötődés veszélye és az ebből eredő esetleges jelintenzitás-torzulások miatt nem lenne előnyös, ezért erre a célra általában külső referenciát alkalmaznak. A két külön oldatban mért integrálértékek összehasonlíthatósága számos mérés technikai és adatfeldolgozási kérdést vet fel, amit Wider és munkatársai részleteiben tárgyaltak, és az eltérések korrekciójára általános képletet is javasoltak [23]. Munkájukban kiemelten foglalkoztak a megfelelő vízelnyomási módszer (miután a fehérjét többnyire vizes oldatban mérjük, az ^1H NMR-spektrumban a víz sokszor hatalmas zavaró jelet ad, ennek csökkentésére számos mérés technikai lehetőség létezik) kiválasztásával, és szisztematikusan vizsgálták a különféle vízelnyomási technikák jelintenzitást torzító hatásának mértékét. Az NMR-rel történő fehérjekoncentráció-meghatározáskor – különösen nagy fehérjék esetében – az okozza a legnagyobb nehézséget, hogy a zsúfolt ^1H -spektrumban olyan jelet találunk, melyről biztosan tudhatjuk, hogy kizárólag a fehérjétől származik, továbbá ismernünk kell (vagy jó közelítéssel meg kell tudni becsülni) a jelhez vagy jelekhez tartozó H-atomok számát. A spektrum ebből a célból történő egyszerűsítésére az egyik kézenfekvő megoldás a minta 100%-os nehésvízben történő feloldása, ami egyrészt felvethet hatásági szabályozási szempontokat, másrészt a minta fagyaszttva szárítása szükséges hozzá, ami egyes fehérjékben drámai szerkezeti változásokat (pl. denaturációt) okoz. A másik megközelítés a fehérjétől származó jelek elkülönítésére a felbontás 2D módszerrel való növelése által. A jelenleg elérhető 2D NMR módszerek zöme azonban számos ismert mérés technikai ok miatt [24, 25] (melyeket itt nem részletezünk) nem tekinthető kvantitatív módszernek. Remélhetőleg a jelenleg is folyó új NMR-módszerfejlesztések révén a közeljövőben elérhetővé válnak olyan kvantita-

tív kétdimenziós pulzus-szekvenciák, melyek egyszerű, gyors és egzakt alternatív módszert kínálnak a fehérjék más komponensek jelenlétében történő mennyiségi meghatározására.

A hatóanyagot termelő sejt kultúrák metabolomikai vizsgálata

A sejt rendszerben előállított biológikumok fejlesztése és gyártása során a biotechnológus számára felbecsülhetetlen értékű információt jelent a fermentáció tápközeg-összetételének minél részletesebb ismerete [26, 27]. A kismolekulák komplex folyadékkeletyben történő parallel azonosítása és mennyiségi meghatározása módszertanilag azonos a metabolomikával (melynek nem meglepő módon szintén az MS és az NMR a két legjellemzőbb műszeres vizsgáló módszere). Bradley és munkatársai sikerrel alkalmaztak NMR-mérés technikákat terápiás fehérjék előállítására használt emlőssejtes fermentációk tápközeg-összetételének elemzésére, és ezt a megközelítést összefoglaló néven fermentanomikának nevezték el [27]. A fermentációs közegből a gyártás különböző időpontjaiban mintát vettek, melyekről NOESY-spektrumokat gyűjtöttek belső referencia használatával. A mintákban található szerves komponensek koncentrációval arányos jeleinek analízisével olyan korábban nem detektált komponensek mennyiségi meghatározása is lehetségessé vált, mint például az ecetsav és hangyasav. Továbbá, bizonyos a sejtnövekedés és a fehérjetermeltetés szempontjából kritikus tápanyagok időbeli fogyása alapján való tápközeg-optimalizálással a hatóanyag-kihozatal növekedését érték el [28]. A mérések automatizálásával és az adatok többváltozós statisztikai módszerrel történő feldolgozásával módszerüket továbbfejlesztették [29]. Ezzel a megközelítéssel összefüggést találtak bizonyos fermentációs körülmények és a termék minőségi jellemzői (pl. a fehérje glikozilációs mintázata) között. A fermentanomikával megegyező módszertannal megközelíthető egy igen fontos, a hatóanyaggyártás során felmerülő minőségbiztosítási kérdés is: a fermentációhoz használt táptalajok összetételének sarzsról sarzsra való azonoságának igazolása. A gyártáshoz használt, részben készen kapható alapanyagok sokkomponensű vízben oldható porkeverékek, melyek vizes oldatai a fentiekben leírtakkal azonos módon jól vizsgálhatók, és az így kapott NMR-spektrumok kiválóan alkalmasak az adott táptalaj ujjlenyomat szerű azonosítására (4. ábra).



Összefoglalás

Napjainkban a biotechnológiai úton előállított gyógyszerek, különösen a bioszimiláris fehérje-hatóanyagok és -készítmények analitikai módszertana igen intenzíven fejlődő terület, amelyen belül a különböző műszeres technikák szerepköre és egymással való kapcsolata még nem tekinthető kiforrottnak. Ez különösen igaz az NMR-spektroszkópiára, amelynek lehetőségeit és korlátait ebben a biotechnológiai „milióban” több olyan „mítosz” is övezi, amik abból adódnak, hogy sokan hajlamosak az NMR-nek a kismolekulák, illetve a tisztított és izotópjelzett fehérjék szerkezetvizsgálatában betöltött, nagy hagyományokra visszatekintő, jól körülhatárolt és jól ismert szerepét a bioszimilárisok világára spontán „extrapolálni”. Mindez pedig könnyen e „drága és bonyolult” módszer túl- vagy alábecsüléséhez vezethet a biohasonlók analitikájában. A biohasonlók analitikai jellemzése igen komplex feladat, amelyben minden egyes analitikai technika szoros együttműködésére van szükség, amelyhez viszont elengedhetetlen, hogy az egyes szereplők jól lássák az egyéb módszerek lehetőségeit és korlátait. A jelen közleményben ehhez akartunk támogatást nyújtani azzal, hogy tapasztalataink és a legfrissebb szakirodalom alapján összefoglaltuk azokat az analitikai kihívásokat, melyek az NMR tekintetében a bioszimiláris fehérjék fejlesztése és gyártása során felmerülhetnek. Igyekeztünk rávilágítani az NMR-spektroszkópia ezen a területen sok tekintetben egyedülálló szerepére és sokrétű alkalmazásainak lehetőségeire, valamint korlátaira is.



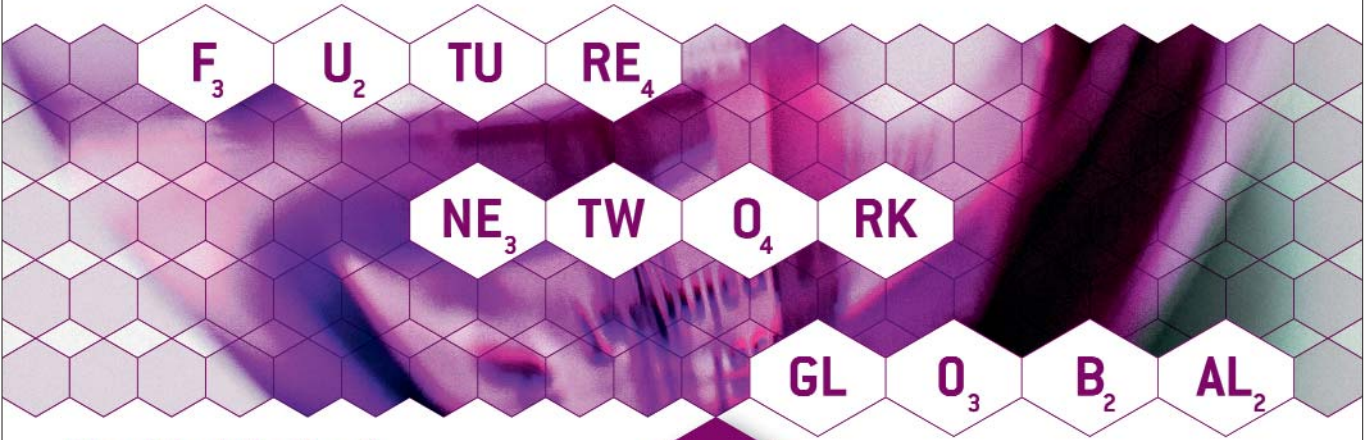
Köszönetnyilvánítás. A jelen közleményben bemutatott ábrákat az 5-ös irodalmi hivatkozásnál megadott közleményünkből vettük át az Elsevier kiadó engedélyével.

IRODALOM

- [1] CDER/CBER, FDA, Guid. Ind., 2015.
- [2] European Medicines Agency (2014) 1–7.
- [3] Cavanagh, J., Protein NMR spectroscopy: principles and practice, 2007.
- [4] S. Rule, G. Hitchens, T. K., Fundamentals of Protein {NMR} Spectroscopy, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2006.
- [5] Kiss, R., Fizil, A., Szántay, C., J. Pharm. Biomed. Anal., 2017. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.004>)
- [6] Sorgel, E., Schwebig, A., Holzmann, J., Prasch, S., et al., BioDrugs (2015) 29, 123–131.
- [7] Visser, J., Feuerstein, L., Stangler, T., Schmiederer, T., et al., BioDrugs (2013) 27, 495–507.
- [8] Poppe, L., Jordan, J. B., Lawson, K., Jerums, M., et al., Anal. Chem. (2013) 85, 9623–9629.
- [9] Franks, J., Glushka, J. N., Jones, M. T., Live, D. H., et al., Anal. Chem. (2016) 88, 1320–1327.
- [10] Freedberg, D. I., Dev. Biol. (Basel). (2005) 122, 77–83.
- [11] Jin, X., Kang, S., Kwon, H., Park, S., Anal. Chem. (2014) 86, 2050–2056.
- [12] Panjwani, N., Hodgson, D. J., Sauvé, S., Aubin, Y., J. Pharm. Sci. (2010) 99, 3334–3342.
- [13] Aubin, Y., Hodgson, D. J., Thach, W. B., Gingras, G., et al., Pharm. Res. (2015) 32, 3365–3375.
- [14] Arbogast, L. W., Brinson, R. G., Marino, J. P., Anal. Chem. (2015) 87, 3556–3561.
- [15] Arbogast, L. W., Brinson, R. G., Formolo, T., Hoopes, J. T., et al., Pharm. Res. (2016) 33, 462–475.
- [16] Amezcua, C. A., Szabo, C. M., J Pharm Sci (2013) 102, 1724–1733.
- [17] Japelj, B., Ilc, G., Marušič, J., Senčar, J., et al., Sci. Rep. (2016) 6, 32201.
- [18] Mobli, M., King, G.F., Toxicon (2010) 56, 849–854.
- [19] Wang, Y. S., Youngster, S., Bausch, J., Zhang, R., et al., Biochemistry (2000) 39, 10634–10640.
- [20] Wiegandt, A., Meyer, B., Anal. Chem. (2014) 86, 4807–4814.
- [21] Skidmore, K., Hewitt, D., Kao, Y. H., Biotechnol. Prog. (2012) 28, 1526–1533.
- [22] Conibear, A. C., Daly, N. L., Craik, D. J., Biopolymers (2012) 98, 518–24.
- [23] Wider, G., Dreier, L., J. Am. Chem. Soc. (2006) 2571–2576.
- [24] Fardus-Reid, E., Warren, J., Le Gresley, A., Anal. Methods (2016) 8, 2013–2019.
- [25] Giraudeau, P., Magn. Reson. Chem. (2014) 52, 259–272.
- [26] Gronemeyer, P., Ditz, R., Strube, J., (2014) 188–212.
- [27] Bradley, S. A., Ouyang, A., Purdie, J., Smitka, T. A., et al., J. Am. Chem. Soc. (2010) 132, 9531–9533.
- [28] Read, E. K., Bradley, S. A., Smitka, T. A., Agarabi, C. D., et al., Biotechnol. Prog. (2013) 29, 745–753.
- [29] Rathore, A. S., Kumar Singh, S., Pathak, M., Read, E. K., et al., Biotechnol. Prog. (2015) 31, 1586–1599.



Messe München
Connecting Global Competence



The World's No. 1

A világ legnagyobb labortechnikai kiállításán megtalálja az ipari és kutatólaboratóriumok termékeit és megoldásait. Tudományos kísérő rendezvénye az analytica konferencia, ahol a fő témák a világújdonosságok, termékismertető, egyedülálló élő bemutatók, különbemutatók, fórumok és fókusznapok.

Információ: Münchener Väsärképviselet, Promo Kft. Tel. 1/224-7764, messemunchen@promo.hu

April 10–13, 2018 | analytica exhibition
April 10–12, 2018 | analytica conference
 26th International Trade Fair for Laboratory Technology,
 Analysis, Biotechnology and analytica conference
www.analytica.de





analytica



Gáspár Attila

■ Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Kromatográfiás töltetek alkalmazása mikrofluidikai csipekben



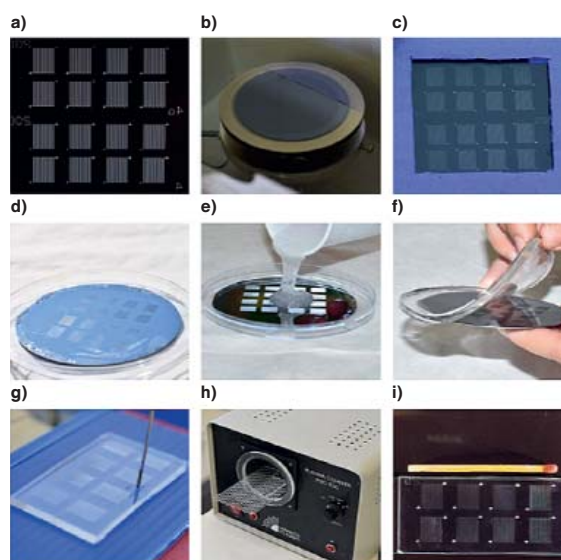
Bevezetés

Az utóbbi 20 évben kifejlesztett mikrofluidikai rendszerek, a „lab-on-a-chip” technológia termékei egyre inkább átalakítják a laboratóriumi kísérletezést és az analitikai vizsgálatokat. Az analitikai mérőrendszerek miniatürizálása ugyanis nem csupán a jelenlegi technológia méreteinek csökkentését jelenti, de egyúttal egészen újfajta analitikai rendszerek megszületését is lehetővé teszi. Amellett, hogy a mikrocsipek többnyire olcsók és sok esetben egyszer használatosak, a mikrocsipekben végzett vizsgálatok sokkal gyorsabbak, pikoliternyi mintaoldatot, illetve nanoliternyi reagensoldatot igényelnek. Ezek a kutatások intenzíven folynak a biotechnológiai, klinikai és analitikai területeken.

Mivel a kromatográfiás elválasztások az analitikai kémia egyik leggyakrabban alkalmazott módszerei, a mikrofluidikai kutatásokban is fontos terület a kromatográfiás állófázisok kialakítása a mikrocsipek csatornáiban. A mikrocsipek kromatográfiás állófázisaként monolitokat [1], kereskedelmi forgalomban levő, 1–5 μm méretű kromatográfiás részecskéket [2], újabban pedig nanorészecskéket [3] is használnak. E nagy felület/térfogat aránnyal jellemezhető mikrotöltetek jól alkalmazhatók akár nagy hatékonyságú kromatográfiás elválasztásokhoz, on-line minta-előkészítési eljárásokhoz vagy enzimreaktorok hordozóanyagaiként. Jelen közleményben a hagyományos kromatográfiás részecskékből mikrocsipekben kialakított töltetéről lesz szó. A kutatási terület tömör áttekintése mellett az elmúlt években elért, a témához kapcsolódó saját eredményeinkről is beszámolok.

Mikrofluidikai csipek készítése

A mikrofluidikai csipeket eleinte az elektronikai ipar által is használt kemény anyagokból (szilícium, kvarc, üveg) készítették a mikroelektronikai fejlesztésekben alkalmazott módszerek (pl. maratási eljárások, finom rétegek kialakítása) segítségével. A későbbiekben egyre inkább az olcsóbb és könnyebben megmunkálható műanyagok [plexi, poliimid, polidimetilsziloxán (PDMS)] alkalmazása felé fordult a kutatók figyelme. Különösen népszerűvé vált a PDMS-ből készült mikrofluidikai csipek elkészítésére alkalmas ún. lágy litográfias módszer, mellyel kevesebb mint 24 óra alatt elkészíthetők a mikrocsipek egy átlagos felszereltségű laborban [4]. A módszer lényege, hogy egy szilíciumlap hordozón először egy vékony fényérzékeny réteget (fotoreziszt) alakítanak

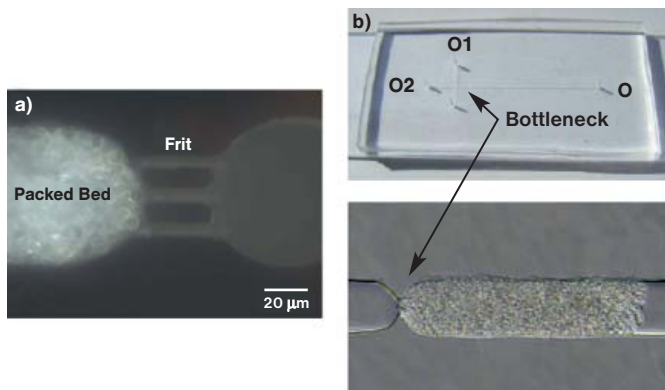


1. ábra. Mikrofluidikai csip készítésének lépései lágy litográfias módszerrel [4]: a) a fotolitográfias maszk, b) egyenletes vastagságú fényérzékeny réteg kialakítása Si-lapka forgatásával (3200 rpm), c) a Si-lapka fotolitográfias maszkon keresztül történő besugárzása UV-fénnyel, d) a kész öntőforma az előhívó szerrel láthatóvá tett csatornamintázattal, e) PDMS és térhálósító adalék keverékének öntőformára öntése, f) a megkeményedett polimer lehúszása, g) portok kialakítása lyukasztóval, h) felületek reaktívá tétele levegőplazmás aktiválással és i) a kész mikrofluidikai csip (a szerpentin alakú csatornák átmérője 50 μm) [5]

ki, majd erre helyezik rá a csatornák mintázatát tartalmazó litográfias maszkot (a csatornamintázat átlátszó a fekete alapon), amit UV-fénnyel besugároznak, majd a mintázatot „előhívják”. Ezzel az eljárással a maszk mintázata átvihető az öntőformára, az öntőforma pedig egy többlépéses eljárást használva alkalmas a PDMS-csipek készítésére (1. ábra).

Kromatográfiás töltetek kialakítása mikrocsipekben

A mikrocsipekben a kromatográfiás részecskéket általában valamilyen frit vagy fizikai akadály (gát, pillér, szűkület) segítségével tartják vissza, hogy ily módon kromatográfiás töltetet kapja-



2. ábra. Kromatográfias töltetek kialakítása a kromatográfias részecskék frit [2] (a) vagy szűkület [7] (b) segítségével történő visszatartásával

nak. Az egyik leghatékonyabb eljárást az Agilent cég kutatói dolgozták ki, akik a mikrocip kemény polimíd anyagában alakították ki a csatornákat lézerablációval, kifejlesztve a HPLC-csip rendszert (2.a ábra) [2]. Ez a mikrocip alkalmas volt nagy nyomású hatékony elválasztásokra és tömegspektrométerhez való illesztéshez).

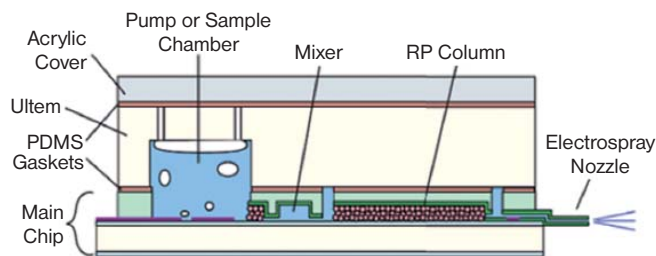
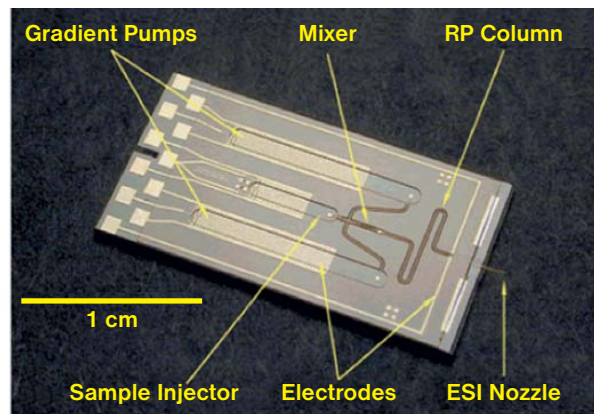
Kutatócsoportunk olyan egyszerű eljárásról számolt be (2.b ábra), ahol a kromatográfias részecskék rugalmas PDMS-ből készült csipbe történő integrálása frit kialakítása nélkül is lehetséges [6, 7]. Az ún. zárókő-hatás miatt a szűkület felé áramoltatott részecskék közül az előlő részecskék megszorulnak a csatornában, és ezek tartják vissza a mögöttük jövő részecskéket.

Analitikai alkalmazási területek

Kromatográfias elválasztások

A mikrofluidikai csipekben folyadékkromatográfias (LC) vagy elektrokromatográfias (CEC) elválasztások egyaránt végrehajthatók. Az előbbi módszer esetén a mobilfázist és a mintát nyomással, az utóbbi esetén elektromos térérő (elektroosztatikus áramlás) segítségével hajtják át az állófázison. A CEC alkalmazása azért vált népszerűvé, mert a mikrofluidikai eszközökben való megvalósítása viszonylag egyszerű és az elektrokinetikus áramlás profilja lapos. Az egyik elsőként kifejlesztett LC-mikrocipben 1,5 µm méretű C18 részecskékből kialakított tölteten két komponens CEC-elválasztása 20 s-on belül 2 µm tányérmagassági érték elérése mellett elvégezhető volt [8]. A technikai fejlesztéseknek köszönhetően a HPLC mikrociprendszerek (pl. az Agilent terméke [2]) hasonló vagy akár jobb elválasztási hatékonyságot, szimmetrikusabb és keskenyebb csúcsokat kínálnak, mint a létező nano-HPLC rendszerek.

A kromatográfias elválasztások mikrocipben történő alkalmazására elegáns példát mutattak be Lee és mtsai [9]. Mikrofluidikai rendszerük 3 elektrolízisen alapuló pumpát integrált, melyből egy a mintaoldat szállítását, kettő pedig az oldószergradiens kialakítását és a mobilfázis mozgását végezte (3. ábra). Az alkalmazott Pt-elektrodok egyrészt a pumpák, másrészt az elektrospray működtetéséhez szükségesek. A fordított fázisú töltetet a kromatográfias részecskék frittel való visszatartásával alakították ki. A mikrocip MS-hez on-line kapcsolható, így a fehérjék tripszines bontásával kapott peptidegy közvetlenül elemezhető. A szerzők hasonló elválasztási felbontásról, de sokkal rövidebb analízisidőről számoltak be a kereskedelmi nano-LC-MS rendszerekhez képest.



3. ábra. LC-mikrocip fotója és felépítésének vázlatos rajza [9].

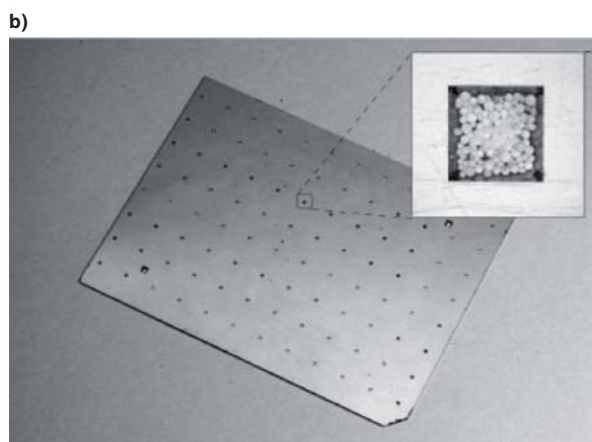
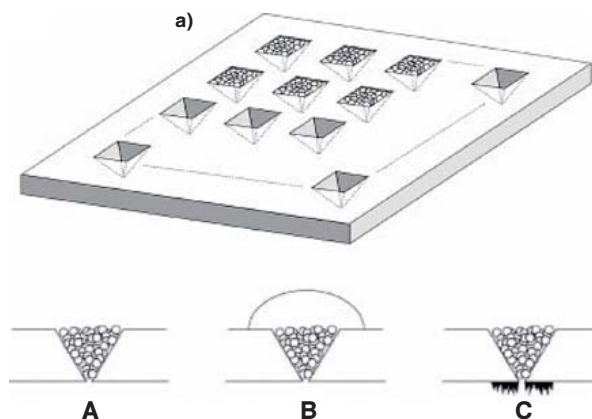
A pumpák azon az elven működnek, hogy a mobilfázis zárt tartályában elektrolízist végezve a fejlődő gázok (akár 17 bar nyomással) kinyomják a folyadékot a kromatográfias töltet, majd az elektrospray-kapilláris felé

Mintaelőkészítés

A mikrocipekbe integrált kromatográfias tölteteken nem csupán nagy hatékonyságú elválasztások, de olyan minta-előkészítési eljárások is elvégezhetők, melyek nagy felületű szilárd állófázist/hordozót igényelnek. Ezek a mikrotöltetek – hasonlóan a szilárd fázisú extrakció (SPE) tölteteihez – alkalmasak lehetnek egy sokkomponensű minta valamely vizsgálandó komponensének dúsítására vagy más (zavaró) komponensek (pl. sók, fehérjék) eltávolítására. A mikrofluidikai eszközök alkalmazásának előnye, hogy könnyen kialakíthatók olyan rendszerek (array), amelyekben párhuzamos műveletek egyidejűleg végezhetők.

Ekström és mtsai [10] olyan, fehérjeminták előkezelésére szolgáló platformot fejlesztettek ki, mely egyúttal a MALDI-MS mintatartó lemeze is volt. A platform 96 perforált mintatartó edénykéi 40 nL-nyi fordított fázisú töltetet tartalmaztak (4. ábra). A töltet anyaga változatosan funkcionálizálható a megfelelő szelektivitás elérése érdekében. Az edényké alján a 15 µm-es nyílások visszatartották a töltetrészecskéket a rajtuk adszorbeálódott peptidekkel, míg a mozgófázis szabadon eltávozhatott. A feldúsult peptideket ezt követően acetonitril/MALDI mátrixeleggyel közvetlenül eluálták a nyílás körüli 500 µm-nyi részbe. A peptidek gyors kikristályosodását követően a platformot megfordítva a mintatartó megfelelő pozícióiban a minta MALDI-MS-sel elemezhető. A módszer minimalizálja a minta kezeléseinek és áthelyezéseinek számát, így növelve az elemzés érzékenységét.

Kutatócsoportunkban a kromatográfias tölteteket (mint egyfajta SPE-mikrooszlopokat) tartalmazó mikrofluidikai csipeket láng-atomszorbpció (FAAS) [11] és lézer indukált plazma (LIBS) [12] spektrométerekkel on-line összekapcsoltuk. A megfelelő reprodukálhatóságú és érzékenyséű FAAS-méréshez szükséges minimális mintatérfogot (30 µl) biztosításához a mikrocipben 20



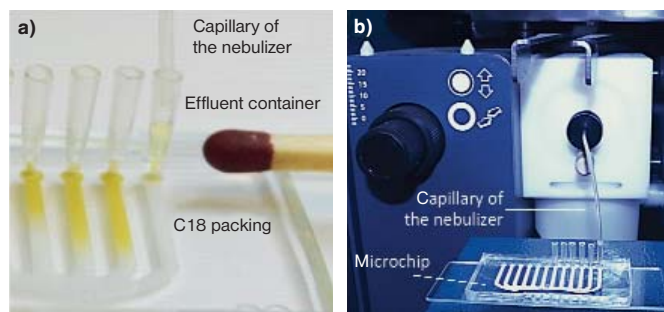
4. ábra. a) A MALDI-MS mintatartóján elhelyezhető, szelektív dúsítást elősegítő platform felépítésének rajza. A keresztmetszeti rajzok illusztrálják a fordított fázisú kromatográfiás részecskékkel töltött mintatartó edénykét (A); az eluens/mátrix keverék hozzáadását a mintatartó edényke tetejére (B); és az eluált minta kristályosodását (C) a mintatartó edényke kifolyó nyílása körül (a mintának e formája alkalmas a MALDI-elemzésre).

b) A platformról készített fotó, kinagyítva egyetlen mintatartó edénykét, az abba integrált kromatográfiás részecskékkel [10]

mm hosszú, 1 mm széles és 0,1 mm vastag, 5 μm -es C18 kromatográfiás tölteteket alakítottuk ki. A Cr(VI) elválasztását/dúsítását ionpár-kromatográfiás módszerrel végeztük el, azaz a minták Cr(VI)-tartalmát ionpárképzés után a fordított fázisú tölteten megkötöttük, majd a koncentrált komponens metanollal eluáltuk a töltet végén elhelyezett mintatartó edénykébe. Innen az oldatot a spektrométer porlasztójának kapillárisa felszívta, és a minta Cr(VI)-tartalma így közvetlenül a spektrométer lángjába jutott (5. ábra) [11].

Enzimreaktorok

Az utóbbi időben egyre fontosabb tendenciát mutat az enzimek immobilizálása mikrofluidikai eszközökben analitikai kémiai célból. Az immobilizált mikrofluidikai enzimreaktorban lejátszódó reakciók gyakorlatilag megegyeznek az oldatban való emésztés során lejátszódó reakciókkal. A mikrofluidikai csipek használatának azonban számos előnye van. Egyrészt lehetővé teszi a kis (μL -nél kisebb) mintatérfogatok alkalmazását, ami kifejezetten előnyös biológiai mintáknál. Másrészt a mikrofluidikai reaktorokban sokkal rövidebb reakcióidő szükséges az oldatban történő emésztéshez képest, hiszen a felületen való immobilizálással

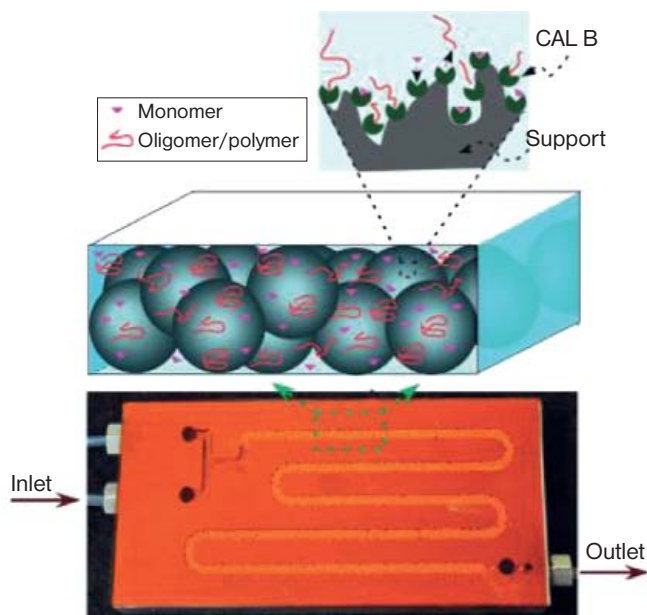


5. ábra. Az effluensek összegyűjtésére készített tárolóedények mikrosziphez csatlakoztatása (a), illetve a mikroszip és az FAAS-készülék összekapcsolása (b) [11]

nagy felületi enzimkoncentráció érhető el. Természetesen a mikrofluidikai reaktoroknál is célravezető minél nagyobb fajlagos felületű, porózus anyagot (kromatográfiás részecskék, polimerek, gélek) használni az enzim szilárd fázisú hordozójaként. Enzimek immobilizálására sok példa található a szakirodalomban, de leggyakrabban kovalens kötással történik az enzim rögzítése. Kovalens kötésű immobilizáláskor a reaktor élettartama növelhető, mivel a kovalensen rögzített enzim gyakorlatilag nem mobilizálódhat a felületről. A kötés az enzim egy aminosav-oldallánca és a felület egy reaktív csoportja között alakul ki.

Kundu és mtsai [13] gyűrűnyitási polimerizáció (ϵ -kaprolakton $\rightarrow$ polikaprolakton) enzim katalizálására alkalmas mikrofluidikai reaktort fejlesztett ki (6. ábra). A *Candida antarctica* Lipase B (CAL B) enzimet a kereskedelmi forgalomban levő Novozym 435[®] részecskékhez rögzítették. E heterogén reakciót folyamatos módban, szerves oldószerek közegében és magas hőmérsékleten játszották le. Azt állapították meg, hogy a mikrofluidikai reaktorral a polimerizációs reakció gyorsabban ment végbe,

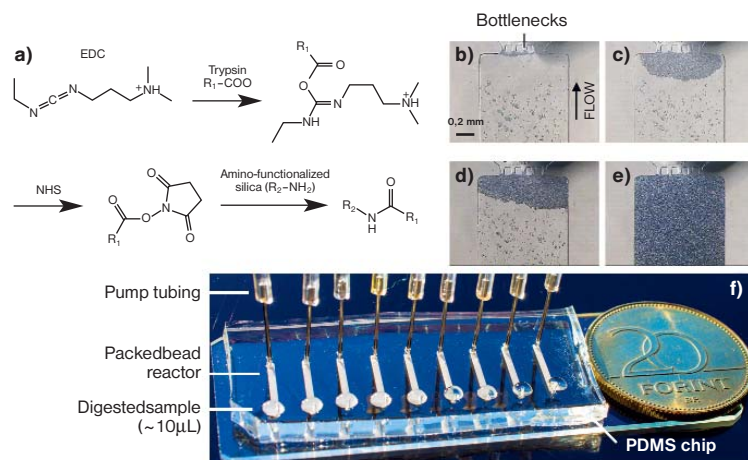
6. ábra. Folyamatos működésű, enzim által katalizált polimerizációs mikroreaktor fényképe és felépítésének vázlatos rajza. A CAL B enzimet szilárd gyöngyökre [makropózus poli(metilmetakrilát)] immobilizálták, és a mikroszatornába töltötték. A reaktánsok mikroreaktorbeli tartózkodási idejét az áramlási sebesség változtatásával lehetett szabályozni [13]





ráadásul nagyobb molekulatömegű polimereket kaptak, mint a hagyományos reaktorokban.

A mikroreaktorokban az egyik leggyakrabban alkalmazott enzim a tripszin, amely proteolitikus enzimként a fehérjéket peptidre bontja. A kapott enzimelegyet elválasztástechnikai módszerrel (HPLC vagy kapilláris elektroforézis) és tömegspektrometriával elemezve, adatbázisok felhasználásával a mintában található fehérjék azonosíthatók. A mikrofluidikai immobilizált enzimreaktorok (IMER) off-line vagy on-line is kapcsolhatók a tömegspektrometriás rendszerekhez, sőt olyan rendszereket is kifejlesztettek már, ahol a mikrocipen nem csupán a fehérjetartalmú minta emésztése, de az emésztett minta SPE-sómentesítése és LC-elválasztása is megtörténik. A kromatográfiás részecskékből kialakított tölteteken kovalensen immobilizált tripszines reaktor



7. ábra. a) A tripszin kovalens kötással (EDC/NHS reagensek segítségével) történő immobilizálása amino-funkcionált szilikarészecskék felületére. b–e) Optikai mikroszkópos felvételek a mikroreaktortöltet kialakításáról a részecskék szűkületek segítségével történő visszatartásával. A szilikarészecskék szuszpenziójának áramoltatása a szűkületek felé történik. f) A 9 minta egyidejű emésztésére szolgáló mikrofluidikai enzimreaktor fényképe [14]

előnye, hogy aktivitását akár több hónapig is megőrizheti megfelelő körülmények között tárolva, és ez idő alatt a reaktor többször felhasználható fehérjék emésztésére. Míg a hagyományos, oldatban történő emésztéshez sokszor 16 óra is szükséges, addig a mikrocip IMER-egységekben, például az általunk kifejlesztett IMER-ben (7. ábra), 10 s-nál rövidebb időtartam is már elegendő [14].

Várható trendek, kilátások

A kromatográfiás töltet tartalmazó mikrocippek fejlesztései várhatóan i) új típusú mikrofluidikai eszközök tervezésére és előállítására, ii) különböző mechanizmusú elválasztások (LC, CEC, CE) kombinálására, új állófázisok integrálása, illetve iii) a kifejlesztett mikrofluidikai eszközök orvosi diagnosztikai, gyógyszer- és környezetanalitikai alkalmazásaira fognak irányulni. Fontos lenne olyan mikrocippek előállítása, amelyeknek párhuzamos csatornáiban nagyszámú kromatográfiás tölteten lehetne nagy nyomással hatékony elválasztást végezni, hogy ezáltal nagy elemzési sebességű analitikai eszközökhöz juthassunk, amely akár több hagyományos analitikai labor elemzési sebességével érhetne fel.

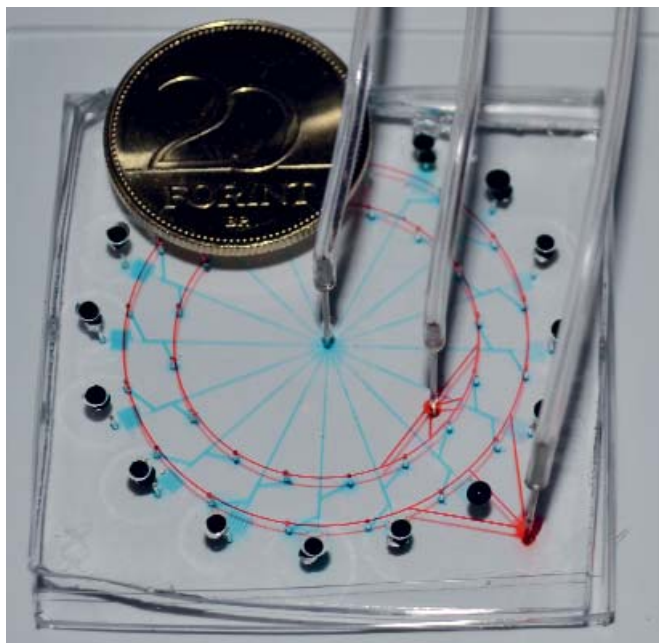
A sokcsatornás rendszerek egyetlen mikrocipen történő megvalósítása lehetőséget adhat 2D elválasztások (pl. CEC–LC) végrehajtására is. A kifejlesztett csipeket alkalmazva kihasználhatók a technológiából adódó olyan jellemző előnyök, mint a csupán minimális minta- (100–500 pL) és reagensmennyiség (1–10 uL) szükségessége, gyors analízis (1–2 perc) és egyszerű multiplex (2 vagy több elválasztóegység ugyanazon a csipen) lehetősége.

Olyan várakozások is ismeretesek a jövőbeni fejlesztésekkel kapcsolatban, amelyek szerint a mikrocipekben parányi minták sokaságával lehetünk képesek párhuzamosan kémiai reakciókat lejátszani (pl. enzimreaktorokban) és komponenseket analizálni, így módon csökkentve drasztikusan a költségeket és fokozva az elemzési sebességet a diagnosztikában és a gyógyszerkutatásban. Ráadásul a mikrofluidikai csipekben elvileg akár ezernyi lehetséges gyógyszervegyület (bio)kémiai sajátosságai is meghatározhatók egyidejűleg, gyorsan és csupán néhány nL-nyi mintarészleket felhasználva.

Köszönetnyilvánítás. Köszönöm, hogy a bemutatott témák kutatásában együttműködött velem Nagy Andrea, Kecskeméti Ádám, Nagy Cynthia, Dr. Lázár István (DE), Prof. Galbács Gábor (SZTE), Prof. Frank A. Gomez (CSU Los Angeles). Köszönöm az OTKA (K111932) és a GINOP (2.3.2-15-2016-00008 és 2.3.3-15-2016-00004) támogatását.

IRODALOM

- [1] Ericson, C.; Holm, J.; Ericson, T.; Hjertén, S.: *Anal. Chem.* (2000) 72, 81–87.
- [2] Ehlert, S.; Trojer, L.; van de Goor, T.; Tallarek, U.: *J. Mass. Spectrom.* (2010) 45, 313–320.
- [3] Lavrik, N. V.; Taylor L. T.; Sepaniak, M. J.: *Anal. Chim. Acta* (2011) 694, 6–20.
- [4] Duffy, D. C.; McDonald, J. C.; Schueller, O. J. A.; Whitesides, G. M.: *Anal. Chem.* (1998) 70, 4974–4984.
- [5] Nagy, C. N.: Könnyminták fehérjetartalmának tripszines emésztése mikrofluidikai enzimreaktoron; BSc szakdolgozat, DE-TTK, Debrecen, 2017.
- [6] Gáspár, A.; Piyasena, M. E.; Gomez, F. A.: *Anal. Chem.* (2007) 79, 7906–7909.
- [7] Gáspár, A.; Nagy, A.; Lázár I.: *J. Chromatogr. A.* (2011) 1218, 1011–1015.
- [8] Oleschuk, R. D.; Shultz-Lockyear, L.L.; Ning, Y.; Harrison, D. J.: *Anal. Chem.* (2000) 72, 585–590.
- [9] Xie, J.; Miao, Y.; Shih, J.; Tai, Y.C.; Lee, T. D.: *Anal. Chem.* (2005) 77, 6947–6953.
- [10] Ekström, S.; Wallman, L.; Malm, J.; Becker, C.; Lilja, H.; Laurell, T.; Marko-Varga, G.: *Electrophoresis* (2004) 25, 3769–3777.
- [11] Nagy, A.; Baranyai, E.; Gaspar, A.: *Microchem. J.* (2014) 114, 216–222.
- [12] Metzinger, A.; Nagy, A.; Gáspár, A.; Márton, Z.; Széles, É.; Buzás, A.; Galbács, G.: *Spectrochim. Acta B* (2016) 126, 23–30.
- [13] Kundu, S.; Bhargale, A. S.; Wallace, W. E.; Flynn, K. M.; Guttman, C. M.; Gross, R. A.; Beers, K. L.: *J. Am. Chem. Soc.* (2011) 133, 6006–6011.
- [14] Kecskeméti, A.; Gaspar, A.: *Talanta* (2017) 166, 275–283.



Braun Mihály¹ – Galbács Gábor²¹ Atomki, Hertelendi Ede Környezetanalitikai Laboratórium² Szegei Tudományegyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

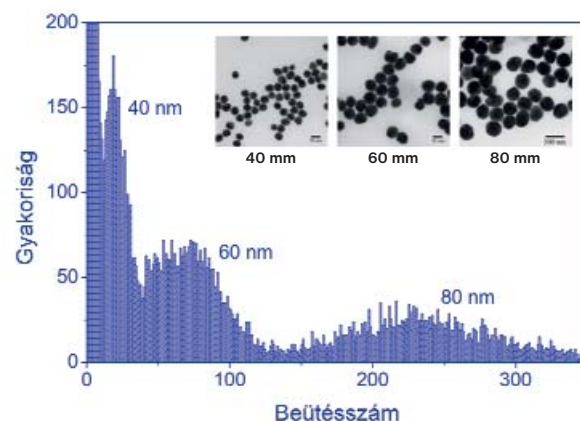
Aktuális kutatási irányzatok az induktív csatolású plazma tömegspektrometriában

Bevezetés

Az induktív csatolású plazma tömegspektrometria (ICP-MS) ma az egyik legszélesebb körben elterjedt, sokoldalú és hatékony nyomelem- és stabilizotópanalitikai módszer. Alkalmazásai a környezetvédelemtől és az anyagtudománytól az ipar különböző szektorain át az orvosi diagnosztikáig és a régészetig nagyon sok területre kiterjednek, ennek megfelelően az ICP-MS alapkutatási témák is igen sokrétűek. A szakirodalom éves termése alapján már közel két évtizede az ICP-MS és a lézerindukált plazma-spektrometria (LIBS) tekinthető az analitikai atomspektrometria két „szupersztárjának” [1–5].

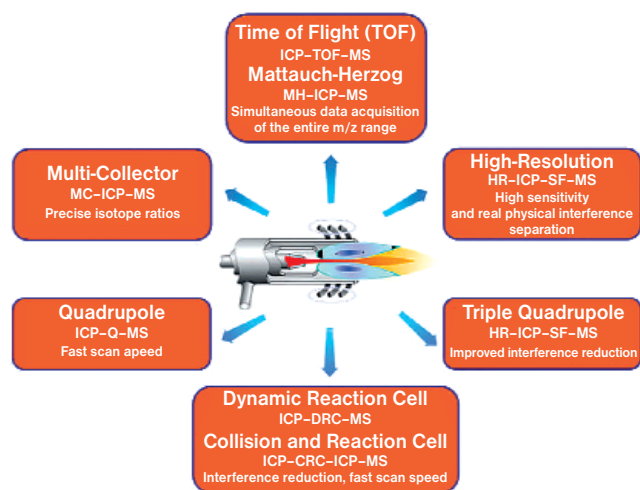
Elterjedtsége miatt ma az ICP-MS-spektrométereknek már a sokadik generációja van forgalomban, és az egyes analitikai feladatokra külön-külön optimalt kivitelű műszerek is kaphatók (pl. nagy felbontású tömeganalizátor, nagy adatgyűjtési sebességű elektronika, ütközési és reakciócellák az interferenciák csökkentésére stb., **1. ábra**).

Az ICP-MS-terület szakirodalmának bősége miatt a jelen köz-



2. ábra. Ezüst nanorészecskék elegyének spICP-MS-hisztogramja és a részecskék elektronmikroszkópos képe

1. ábra. Korszerű ICP-MS tömegspektrométer-változatok [3]



lemény szerzői semmiképpen nem vállalkozhatnak arra, hogy a rövid formátum adta keretek között részletes áttekintést nyújtsanak a terület kutatásairól – ehelyett mindössze arra törekcszenek, hogy a főbb aktuális irányzatok („hot topics”) koncepcióját, fejlődését ismertessék röviden. Ezek a főbb irányzatok nagyjából ma a következők: i) részecskék karakterizálása, ii) biomolekulák analízise, iii) elem- és izotópeloszlások vizsgálata.

Részecskék karakterizálása

Az ICP-MS-kutatások egyik korszerű irányzata az ún. egyrészecske- (spICP-MS) módszer. Ez a módszer, amelyet Degueldre és társai 2003-ban vezettek be [6], nanorészecskék vizes diszperzióinak hatékony vizsgálatára alkalmas. A módszer alapját az ICP-MS-mérések időfelbontásos (time resolved analysis) üzemmódban való elvégzése képezi – kellően híg (pl. 10^4 – 10^6 /ml koncentrációjú) nanodiszperzió beporlasztásakor az egyes nanorészecskék ugyanis individuálisan detektálhatók. Mivel a jelcsúcsok magassága (területe) az egyes részecskékben található anyagmennyiséggel (térfogattal) lesz arányos, a jelek statisztikai kiér-



tékelése révén a részecskék koncentrációja és méreteloszlása megállapítható (2. ábra). Az ICP–MS-detektálás szelektivitása a részecskék elem- vagy izotóp-összetételének meghatározását is lehetővé teszi. Míg a hisztogramon a háttérjel Poisson-eloszlású, kis intenzitású csúcsként jelenik meg, addig a nanorészecskék log-normális függvényvel illeszthető csúcsot adnak, ezért a mérendő elem oldott és részecske formái elkülöníthetők. A mérés 100–120 s időtartama alatt több ezer vagy akár tízezer részecske jelcsúcsainak detektálása is megtörténik, ezért a kapott eredmények ismételhetősége kiváló. A mérés tehát gyors, megbízható és a jelek kalibrációihoz csak néhány ismert méreteloszlású nanorészecske-standard szükséges.

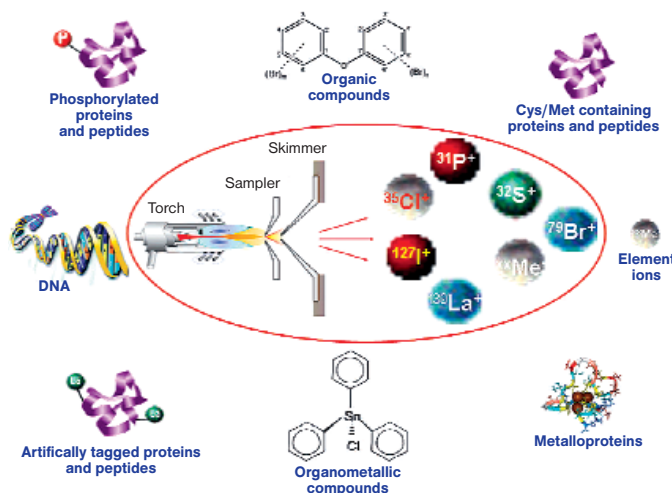
A nanodiszperziók fenti számos paraméterének együttes meghatározására más módszer (pl. pásztázó elektronmikroszkópia energiadiszperzív spektroszkópiával, UV–Vis-spektroszkópia, dinamikus fényszórásmérés, röntgen fotoelektron-spektroszkópia stb.) nem képes, ezért az spICP–MS-módszert mostanában komoly érdeklődés övezi a szakirodalomban [7, 8]. A műszerek érzékenysége jelenleg a 10–15 nm átmérőnél nagyobb nanorészecskék detektálását teszi lehetővé, bár egyes speciális esetekben nanokompozitok ultrakis méretű (pl. 1,6 nm-es) részecskéinek kimutathatóságát, sőt kvantitatív meghatározhatóságát is sikeresen demonstrálták [9]. A kimutathatóságot, illetve a méretbeli felbontást természetesen az is befolyásolja, hogy a detektált izotóp milyen gyakoriságú, illetve a plazmabeli mérési körülmények mennyire optimalizáltak [10]. A mérés kivitelezhetőségéhez az is fontos, hogy a szuszpenzió stabil maradjon a mérés ideje alatt, aminek biztosítására szonikálás és stabilizáló adalék hozzáadása (pl. poliakrilsav, citromsav, tanninsav stb.) szükséges.

A kutatások egyik fontos iránya azoknak a különleges spektrális zavaró hatásoknak a felderítése, amelyeket a nanodiszperziók jellegzetességei okoznak. Ezen hatások közé tartoznak az oldott anyagtól, a plazmában képződő többatomos adduktumoktól, a stabilizálószer-től és a többkomponensű nanorészecskék alkotóinak egymásra hatásától származó effektusok [11]. Megmutatható, hogy az ütközési cella és a nanodiszperzió hígításának körülmektől alkalmazása hatékony módszer a legtöbb zavarás hatásának csökkentésére.

A korszerű, sokadik generációs ICP–MS-készülékek ma már nem csak ms, de akár ms időfelbontással is lehetővé teszik az spICP–MS-mérések elvégzését [12]. Ez már lehetőséget ad a részecskejelnek az oldott anyag tartalomtól való jobb elkülönítésére, a mérések szélesebb koncentrációtartományban való elvégzésére és a nanorészecskék ionfelhője áthaladási idejének vizsgálatára is. Mindezek révén számos új alapvető kutatási irány és alkalmazás számára adódik lehetőség. A legújabb publikációk például megmutatták azt is, hogy a normál (ms) és nagy (ms) időfelbontású mérések kombinálásával és az ionfelhő tulajdonságai alapján a nanorészecskék alakja (pl. gömb, pálcika, cső) és struktúrája (pl. ötvözet vagy mag-héj) is felderíthető, és kétkomponensű nanorészecskék pontos összetétele is meghatározható [13, 14]. Az spICP–MS-módszer sokoldalúságát, gyorsaságát és teljesítő-képességét jól jelzi gyors elterjedése. Sikeres alkalmazásainak száma ma már gyorsan emelkedik az olyan komplex, környezeti mintamatrixokban is, mint pl. a víz- [15], talaj- [16], élelmiszer- és biológiai minták [17], de legújabbban egyre több olyan sikeres kísérletről is beszámolnak, amelynek során individuális sejteket vizsgáltak (single cell ICP–MS vagy SC–ICP–MS) [18]. Különálló nukleáris részecskék (pl. törvénytörési vagy biztosítéki rendszerből származó minták) karakterizálásának lehetőségeit lézerezablációs (LA) ICP–MS-módszerrel is vizsgálják [19].

Biomolekulák analízise

A biomolekulák vizsgálata sokféle analitikai kémiai kutatás fókuszában áll, a terület egyre növekvő gyakorlati jelentősége miatt. A kutatók hamar felismerték, hogy az ICP–MS-spektrometria kínálja ultranyomelem-analitikai lehetőségek igen előnyösen alkalmazhatók ezen a területen is (3. ábra). A biokémiai gyakorlatban korábban elterjedt más optikai módszerekhez képest



3. ábra. Biomolekulák analízise ICP–MS-módszerrel [3]

az ICP–MS főként igen alacsony kimutatási határaival, széles dinamikus tartományával, többféle komponens (elem) meghatározási lehetőségével és a méréseknek a mátrixtól való nagyfokú függetlenségével tűnik ki [3, 20].

A biomolekulákban előforduló fémek (pl. Fe, Cu, Zn) mellett egyes organogén elemek (pl. S, P, Se, I) érzékeny detektálhatósága révén az elmúlt egy-két évtizedben dinamikus fejlődő területté vált az ICP–MS alkalmazása sokféle bioaktív molekula, pl. fehérjék, nukleinsavak, foszfolipidek, fémorganikus vegyületek vagy növényvédő szerek kvantitatív meghatározására. Itt meg kell jegyezni, hogy a biomolekulák analízise területén hagyományosan alkalmazott módszerek kvantitatív célokra kevésbé alkalmazhatók a jelképzés összetettsége (pl. ESI–MS vagy MALDI–MS) vagy az érzéketlenség és szűk dinamikus tartomány (pl. 2D gélalapú elválasztástechnika) miatt. Az ICP–MS-meghatározási módszerek ezért a metallomika, proteomika és speciációs analitika fontos eszközeivé váltak [21, 22, 23].

Noha a kvantitatív meghatározások több esetben közvetlenül lehetségesek egyes kis tömegű heteroatomok (pl. P, S, Se) koncentrációjának mérése révén, a kimutatási határokat ilyenkor gyakran korlátozzák a jól ismert poliatomos zavaró hatások [2]. Ennek a problémának a kiküszöbölésére ma egyre gyakrabban alkalmazzák a biomolekulák elemekkel való szelektív megjelölésének módszerét („exogenous tagging”, „elemental labeling”). Az eljárás során egy olyan elemet kötnek a vizsgálandó biomolekulához, amely biológiai mátrixokban praktikusan nem fordul elő, ugyanakkor kis zavarások mellett jól detektálható. A gyakran alkalmazott módszerek közé tartozik a „címkézés” lantanida kelátképző reagensekkel vagy nanorészecskékkel (pl. Au, Ag), továbbá a fémtartalmú vegyületek (pl. CH_3Hg^+ , p -kloromercuribenzoát, ferrocén) kapcsolása [20, 21]. Minden esetben feltétel, hogy az eljárás kémiai nagy szelektivitást, koncentrációarányosságot és biokompatibilitást kínáljon, emellett a címkével el-



látott konjugátum elválasztására is kell találni alkalmasan egyszerű és hatékony módszert. A nehézségek ellenére az irodalomban már nagyszámú, sikeresen alkalmazott eljárást ír le [20]. A szervesetlen elemeken alapuló címkézési eljárások használatának további előnye, hogy ezek olcsók és stabilak.

A kvantitatív bioanalitikai alkalmazások számára történő módszerfejlesztések során a megfelelő kalibrációs megoldások megtalálása is jelentős feladat. A biomolekulák sokfélesége miatt a mátrixazonos kalibráció lehetősége ugyanis korlátozott, mivel a legtöbb esetben nem állnak rendelkezésre megfelelő standardok. Noha alapvetően az alternatív kvantitatív eljárások pontosságát az ICP-MS-mérések pontossága még egyszerű (nem mátrixillesztett), közvetlen kalibráció esetén is könnyedén eléri vagy meghaladja (10–20% hiba), a nagyobb pontosságú mérésekhez leggyakrabban a standard addíciós és izotóphígítási kalibrációs módszereket alkalmazzák. Az izotóphígítás kimagasló pontosságot biztosít, azonban nem használható monoizotópos elemeknél (pl. P vagy As). A belső standard alkalmazásán alakuló korrekciós eljárás is jól használható, sok esetben kihasználva a biomolekulákban egyébként is jelenlévő egyes jól mérhető elemeket (pl. S, P) [21, 22].

Tekintettel arra, hogy a biomolekulák vizsgálata összetett biológiai mátrixokban történik, a mérések igen gyakran szükség van az ICP-MS különböző kromatográfiás műszerekhez (pl. GC, HPLC, HILIC, SEC) való kapcsolására is, sőt a legkorszerűbb megoldás az atomi és molekula-tömegspektrometria komplexen alkalmazása (pl. ICP-MS és ESI-MS) [23, 24].

Elem- és izotópeloszlások vizsgálata lézerablációs ICP-MS (LA-ICP-MS) technikával

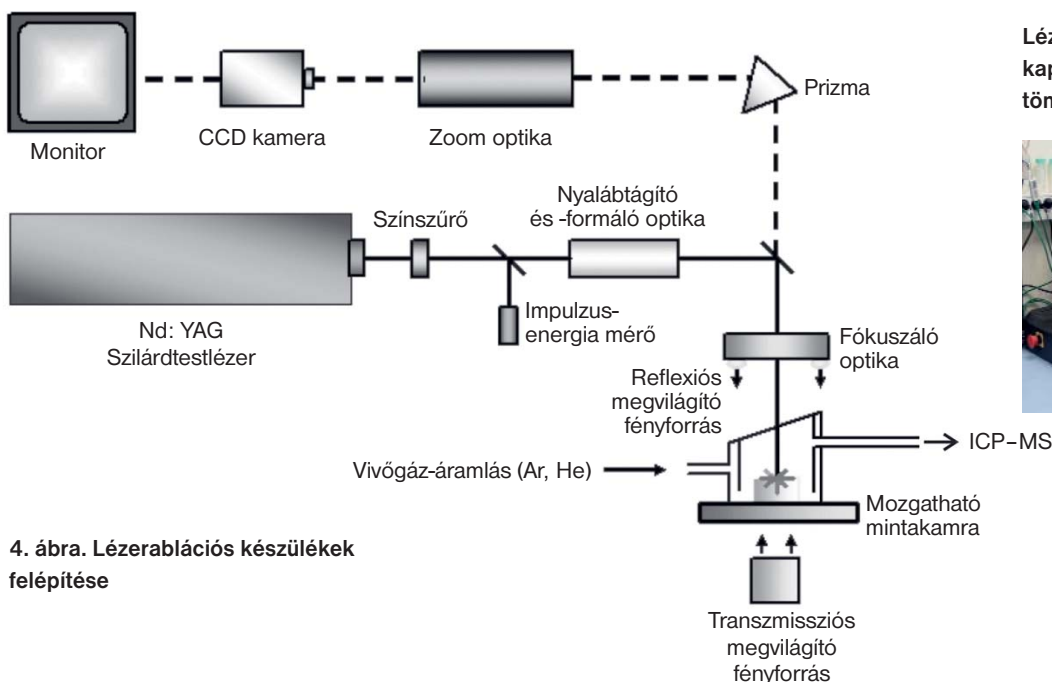
A lézerablációs induktív csatolású tömegspektrometria (LA-ICP-MS) hatékony technika szilárd minták közvetlen elemzésére. Ezzel a módszerrel mikroanalízis is végezhető, lehetséges mélység szerinti profil elemzése, valamint az elemeloszlások kétdimenziós térképezése. Az oldatos módszerekhez képest viszonylag csekély minta-előkészítést igényel. Mivel az analízis csupán csekély mértékben roncsolja a mintát (szabad szemmel nem, vagy alig kivehető módon), alkalmas régészeti anyagok, műtárgyak vizs-

gálására is. Lényegesen érzékenyebb (optimális esetben a ng/kg is elérhető), mint a gyakran alkalmazott roncsolásmentes mikroelemanalitikai módszerek (pl. SEM-EDAX, PIXE) és alkalmas izotóparányok (pl. $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$, $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$) meghatározására is. Az LA-ICP-MS-módszerrel elemezhetőek vezető és nem vezető, átlátszó és áttetsző minták is. Olyan anyagok is elemezhetők, melyeket igen nehéz oldatba vinni (pl. gyémánt, szilícium-karbid, különböző kerámiák). A forgalomban lévő lézerablációs készülékek viszonylag könnyen illeszthetők a különböző típusú ICP-MS-rendszerekhez (vö. **1. ábra**).

A lézerablációs berendezések felépítését a **4. ábrán** mutatjuk be. LA-ICP-MS célra elterjedten használják a 213 nm hullámhosszú (frekvencia-ötszörözött) Nd:YAG lézert, és a 193 nm hullámhosszú ArF excimerlézert. A mintát egy mozgatható mintatartó asztalon helyezik el. Mikroszkóp segítségével jelölik ki a vizsgált területet. A lézersugár átmérője általában 5–100 μm között állítható, az elterjedten használt kör keresztmetszet mellett a folt négyzet és téglalap alakú is lehet. A lézerimpulzus energiáját, a másodpercenkénti lövések számát, a folton töltött idő hosszát lehet beállítani. A képződő aeroszolt általában hélium vivőgáz szállítja az ICP-MS-készülék plazmájába [25].

Több lépésből álló folyamat végén kerülnek az ionok a detektorba, ezért a bejutó ionok gyakorisága nem biztos, hogy megegyezik a minta eredeti összetételével. A lézersugár és a minta felülete közötti kölcsönhatás (abszorpció, reflexió, hővezetés) anyagoként változhat. Az ablációs folyamat által termelt aeroszol szemcsemérete és a szemcsék alakja függ a mátrixtól. Az ablációs folyamat nem feltétlenül sztöchiometrikus, az illékony komponensek nagyobb arányban kerülhetnek a plazmába. A képződő aeroszol összetétele sem biztos, hogy homogén. A transzportfolyamat során méret, illetve tömeg szerinti szeparálódás is bekövetkezhet. A plazmába jutó részecskék atomizációs-ionizációs folyamatai eltérhetnek. Az ionnyaláb összetétele időben változhat a tömegspektrométerben [26].

A fent említett folyamatok miatt a kvantitatív analízis az LA-ICP-MS-módszerrel lényegesen bonyolultabb feladat, mint a hagyományos „oldatos” ICP-MS-technikával. A koncentráció/jel függvény meghatározásának egyszerű módja, ha rendelkezésre áll a vizsgált mintához hasonló mátrixú tanúsított anyagminta



4. ábra. Lézerablációs készülékek felépítése

Lézerablációs berendezéshez
kapcsolt induktív csatolású plazma
tömegspektrométer (LA-ICP-MS)





(„certified reference material”: CRM). Ezek közül elterjedten használják a NIST SRM 610, 612, 614 és 616 üvegeket. Karbonátos mintákhoz az USG MACS-1 és USG MACS-3 standardokat, valamint az NRC FEBS-1 jelű hal hallócsontból készült referenciaanyagot. Haj- és körömmintákhoz a BCR CRM 397 használható [27–28].

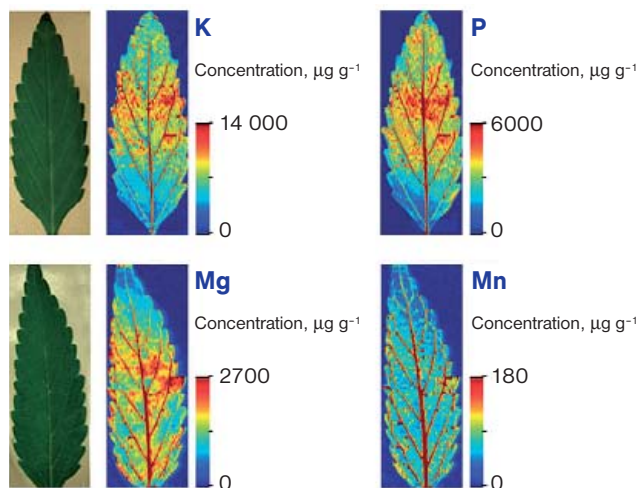
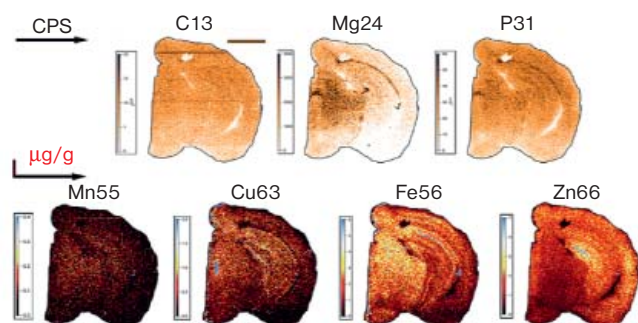
A kalibrációhoz használnak mátrixillesztett standardokat, amelyeket a mintával azonos alapanyagból készítenek. Leggyakrabban lítium-metaborátos ömlesztéssel, polimer gyantába ágyazással, vagy tablettapréseléssel készülnek a standardok. Bizonyos esetekben jól használható a „jelnormalizációs” módszer. Feltétele, hogy legyen olyan elem, melynek eloszlása viszonylag homogén a vizsgált mintában, és hasonló tulajdonságokat mutat az ablációs, transzport- és ionizációs folyamatokban. Ebben az esetben a vizsgált elem jelét a referenciaelem jelére normálják. Például haj- és körömmintáknál a kén, a csont-, cseppkő és csigahéj mintáknál a kalcium használható „referenciajelként” [29, 30]. Érdekes megoldás az ún. „folyadék-szilárd kalibráció”. Ennél a módszernél a mintából lézeralblációval előállított aeroszolhoz olyan aeroszolt kevernek hozzá, melyet oldatporlasztással állítanak elő. Az oldatból előállított aeroszol víztartalmát deszolvatáló berendezéssel távolítják el, hogy a plazmába az ablációval előállított száraz aeroszolhoz hasonló anyag kerüljön.

Az LA–ICP–MS-mérések eredményeit össze lehet vetni a hagyományos „oldatos” ICP–MS-mérésekkel. Kőzeteknél, fémeknél lehetőség van arra, hogy a mikrofúrással vett anyagot feloldják, és a keletkezett lyuk alján LA–ICP–MS-méréseket végezzenek.

A fémek elemzésénél általában elegendő egy-két forgács, melyeket polimer gyantába ágyaznak és megcsiszolnak, de jól használhatók a spektrográfiában megszokott próbatestek is. Kisebb tárgyak (pl. érmék, gyűrűk) közvetlenül is, előkészítés nélkül elemezhetők. A felszíni szennyezéseket az analízishez használnál nagyobb átmérőjű lézernyalábbal el lehet távolítani. Kalibrációhoz a spektrográfiai fémetalonok, standardok használhatóak. A kőzetek, üvegek, csontok és fogak, csigák, kagylók és korallak, toll- és körömminták elemzése is közvetlenül elvégezhető.

Az LA–ICP–MS-technika lehetővé teszi lágy szövetek vizsgálatát is (5. ábra). A növényekből készült szövetmetszetek közvetlenül vagy poliészter gyantába ágyazva elemezhetők (6. ábra). Az állati és humán mintákból (pl. máj, agy, szem, vese) 5–20 µm vastagságú metszeteket készítenek, és a teljes réteget ablálják. A réteg alá vagy fölé belső standardként aranyat párologtatnak. Biológiai minták elemzésénél problémát jelenthet, hogy a mátrix mintán belül is változhat. A mátrixazonos kalibráció ilyenkor különösen fontosá válik. Cellulózban gazdag növényi mintáknál sikerrel alkalmaztak standard oldattal átitatott papírcsíkokat. Ál-

5. ábra. Elemek eloszlása egér agyában LA–ICP–MS-mérések alapján [32]



6. ábra. Elemek eloszlása a szálkamenta (*Elsholtzia splendens*) levelében [33]

lati szöveteknél pedig a fixáláshoz használt műgyantába kevert standardokkal kalibráltak [25].

Az izotóparány-mérések az izotópos nyomjelzéses módszereknek, az eredetvizsgálatoknál fontosak a bioanalitikában. Izotóparány-méréseket használnak a geokronológiában (pl. U/Pb), de fontosak a nukleáris iparban is. Az ICP-ionforrás instabil, és ehhez hozzájön a lézeralbláció okozta bizonytalanság. A kvadrupólus (ICP–QMS) rendszerekkel 0,2–1% relatív hiba érhető el, ha oldatporlasztást használnak. Lézeralbláció (LA–ICP–QMS) esetén ez 10–50%-ra nőhet. Az izotóparány-méréseknél számolni kell az izobár és a poliatomos zavarással, a tömeg-diszkriminációval, a detektor holt idejével, a memóriahatással, a lézeralblációhoz kötődő izotópfractionálódással és mátrixhatásokkal [31]. A frakcionálódást csökkenteni lehet nagyobb energiasűrűségű lézerrel (kb. 10^9 W cm^{-2}). A lézeralbláció közbeni frakcionálódás általában nem jelent jelentős gondot, ha ugyanazon elem izotópjainak arányát határozzák meg (pl. $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$), de jelentős lehet különböző elemek izotópjai esetében (pl. $^{206}\text{Pb}/^{238}\text{U}$). Ezeket a hibákat tanúsított izotóparány referenciamintákkal lehet kiküszöbölni. Az ütközési/reakciócellákkal kiegészített ICP–QMS-készülékek már képesek a molekulaionok okozta zavaró hatások kiküszöbölésére, a két kvadrupólus egység közé helyezett ütközési cellával pedig olyan zavaró hatások is megszüntethetők, melyek egyéb módon nem (pl. a ^{204}Hg és a ^{204}Pb elkülöníthető NH_3/He reakciógáz használatával, mert a Hg^+ -ion elveszíti a töltését, a Pb^+ viszont nem). Ezek a technikák jelentős lökést adtak a geokémiai kutatásoknak, mert olyan elemek izotópjai is mérhetővé váltak, melyeket a hagyományos izotóparány-mérési módszerekkel (pl. termikus ionizációs tömegspektrometria, TIMS) nem lehetett vizsgálni (pl. Fe-, Si-izotópok).

A multikollektoros (MC) készülékek lényegesen nagyobb precizitású izotóparány-méréseket tesznek lehetővé (0,01–0,1% relatív szórás is elérhető), míg a nagy felbontású („sector field”) készülékekkel a poliatomos interferenciák többsége kiküszöbölhető.

Köszönetnyilvánítás. Galbács Gábor köszöni az EFOP-3.6.2-16-2017-00005 által nyújtott pénzügyi támogatást a projekt számára.

IRODALOM

- [1] Winefordner, J. D.; Gornushkin, I. B.; Correll, T.; Gibb, E.; Smith, B. W.; Omenetto, N.: J. Anal. At. Spectrom. (2004) 19, 1061–1083.



- [2] Záray, Gy. (szerk.): Az elemanalitika korszerű módszerei, Akadémiai Kiadó, Budapest, 2006.
- [3] Pröfrock, D.; Prange, A.: Appl. Spectrosc. (2012) 66, 843–868.
- [4] Limbeck, A.; Galler, P.; Bonta, M.; Bauer, G.; Nischkauer, W.; Vanhaecke, E.: Anal. Bioanal. Chem. (2015) 407, 6593–6617.
- [5] Galbács, G.: Anal. Bioanal. Chem. (2015) 407, 7537–7562.
- [6] Degueldre, C.; Favarger, P. Y.: Colloids Surf. A. (2003) 217, 137–142.
- [7] Lee, S.; Bi, X.; Reed, R.B.; Ranville, J.F.; Herckes, P.; Westerhoff, P.: Environ. Sci. Technol. (2014) 48, 10291–10300.
- [8] Montañó, M. D.; Olesik, J.W.; Barber, A.G.; Challis, K.; Ranville, J.F.: Anal. Bioanal. Chem. (2016) 408, 5053–5074.
- [9] Sági, A.; Kéri, A.; Kálomista, I.; Dobó, D.G.; Szamosvölgyi, Á.; Juhász, K.L.; Kukovecz, Á.; Kónya, Z.; Galbács, G.: J. Anal. At. Spectrom. (2017) 32, 996–1003.
- [10] Kálomista, I.; Kéri, A.; Galbács, G.: Talanta (2017) 172, 147–154.
- [11] Kálomista, I.; Kéri, A.; Galbács, G.: J. Anal. At. Spectrom. (2016) 31, 1112–1122.
- [12] Montañó, H. D.; Badiei, H. R.; Bazargan, S.; Ranville, J.F.: Environ. Sci.: Nano (2014) 1, 338–346.
- [13] Kálomista, I.; Kéri, A.; Ungor, D.; Csapó, E.; Dékány, I.; Prohaska, T.; Galbács, G.: Colloquium Spectroscopicum Internationale XL, Pisa, Italy, 2017, Paper III/PP-23.
- [14] Wang, J.; Lankone, R. S.; Reed R. B.; Fairbrother H.D.; Ranville, J. E.: Nanoimpact (2016) 1, 65–72.
- [15] Mitrano, D. M.; Ranville, J. E.; Bednar, A.; Kazor, K.; Hering A.S.; Higgins, C. P.: Environ. Sci.: Nano (2014) 1, 248–259.
- [16] Navratilova, J.; Praetorius, A.; Gondikas A.; Fabienke W.; von der Kammer, E.; Hofmann, T.: Int. J. Environ. Res. Public Health (2015) 12, 15756–15768.
- [17] Peters R.; Herrera-Rivera Z.; Undas A.; van der Lee M.; Marvin H.; Bouwmeester, H.; Weigel, S.: J. Anal. At. Spectrom. (2015) 30, 1274–1285.
- [18] Miyashita, S.; Fujii, S.; Shiota, K.; Inagaki, K.: In Metallomics: Recent Analytical Techniques and Applications; Y. Ogra, T. Hirata; Eds.; Springer, Tokió, 2017, 107–124.
- [19] Mácsik Z., Vajda N., Széles, É.; Katona, R.: IAEA Safeguards symposium, Vienna, 2010, Paper IAEA-CN-184/177.
- [20] Liu, Z.; Li, X.; Xiao, G.; Chen, B.; He, M.; Hu, B.: Trends in Anal. Chem. (2017) 93, 78–101.
- [21] Bettmer, J.; Montes Bayón, M.; Encinar, J. R.; Fernández Sánchez, M. L.; del Rosario Fernández de la Campa, M.; Sanz Medel, A.: J. Proteomics (2009) 72, 989–1005.
- [22] Wang, M.; Feng, W.-Y.; Zhao, Y.-L.; Chai, Z.-E.: Mass Spectrom. Rev. (2010) 29, 326–348.
- [23] Hann, S.; Dernovics, M.; Koellensperger, G.: Current Opinions in Biotech. (2015) 31, 93–100.
- [24] Victor, G. M.; Tatár, E.; Virág, I.; Cseh, E.; Fodor, E.; Záray, Gy.: Anal. Bioanal. Chem. (2005) 383, 461–466.
- [25] Limbeck, A.; Galler, P.; Bonta, M.; Bauer, G.; Nischkauer, W.; Vanhaecke, E.: Anal. Bioanal. Chem. (2015) 407, 6593–6617.
- [26] Agatemor, C.; Beauchemin, D.: Anal. Chim. Acta. (2011) 706, 66–83.
- [27] Sinclair, D.J., Kinsley, L.P.J., McCulloch, M.T.: Geochim. Cosmochim. Acta. (1998) 62, 1889–1901.
- [28] Perkins, W.T.; Fuge, R.; Pearce, N.J.G.: J. Anal. At. Spectrom. (1991) 6, 445–449.
- [29] Phung, A.T.; Baeyens, W.; Leermakers, M.; Goderis, S.; Vanhaecke, F.; Gao, Y.: Talanta (2013) 6–14.
- [30] Jochum, K.P.; Scholz, D.; Weis, U.; Wilson, S.A.; Yang, Q.; Schwalb, A.; Börner, N.; Jacob, D.E.; Andreea, M.O.: Chem. Geol. (2012) 318, 31–44.
- [31] Pozebon, D.; Scheffler, G.L.; Dressler, V.L.; Nunes, M.A.G.: J. Anal. At. Spectrom. (2014) 29, 2204–2228.
- [32] Harel, D.J.; Kysenius, K.; Paul, B.; Knauer, B.; Hutchinson, R.W.; O'Connor, C.; Fryer, F.; Hennessey, T.P.; Bush, A.I.; Crouch, P.J.; Doble P.A.: J. Visualized Experiments (2017) 119, 1–8.
- [33] Becker, J.S.; Zoriy, M.; Wu, B.; Matusch, A.; Becker, J.S.: J. Anal. At. Spectrom. (2008) 23, 1275–1280.

Bozóki Zoltán – Szabó Anna – Ajtai Tibor – Szabó Gábor

■ MTA–SZTE Fotoakusztikus Kutatócsoport | Szegedi Tudományegyetem, Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék

A fotoakusztikus gázdetektálás gyakorlati alkalmazásai

Bevezetés

A gázkoncentrációt mérő műszerek piacán egyre jelentősebb szerephez jutnak az optikai abszorpciós spektroszkópián alapuló mérési módszerek, sok esetben háttérbe szorítva az alternatív mérési módszereket (pl. szilárdtest-szenzorok, katalitikus érzékelők stb.). Ehhez a gyors népszerűség-növekedéshez szükséges hajtóerőt döntő mértékben a spektroszkópiai módszerek megbízhatósága, szelektivitása biztosítja, mivel egy molekula optikai abszorpciós spektruma ujjlenyomatszerűen azonosíthatóvá teszi a molekulát még egy sokkomponensű gázkeverék esetében is. A fotoakusztikus spektroszkópia egyike a látványosan fejlődő spektroszkópiai módszereknek, ami nagyrészt a módszer egyedi előnyeinek köszönhető.

Jelen dolgozat keretében megvizsgáljuk, hogy melyek azok az alkalmazási területek, ahol a fotoakusztikus módszer a legelőnyösebben használható, és arra a következtetésre jutunk, hogy mind ez idáig a módszer egy speciális változata, amit a továbbiakban differenciális fotoakusztikának fogunk nevezni, terjedt el leginkább

a gyakorlatban. A differenciális fotoakusztika legfontosabb jellemzője, hogy az alkalmazott fotoakusztikus rendszer kétszatornás, és segítségével két, egymástól csak kismértékben eltérő gázáramban a két gázáram közötti kis koncentrációkülönbségek nagy pontosságú mérésére alkalmas (1. ábra).

A dolgozat felépítése a következő: a következő fejezetben ismertetjük a fotoakusztika alapjait és azokat az előnyös tulajdonságokat, amelyek a módszer gyakorlati elterjedését elősegítik. Ezután bemutatjuk a fotoakusztikus módszer néhány gyakorlati alkalmazását. Végül a módszer lehetséges új fejlődési irányait mutatjuk be.

A fotoakusztika alapjai

A fotoakusztikus jelkeltés alapja, hogy ha egy anyagmintában, amely lehet gáznemű, folyékony vagy akár szilárd halmazállapotú is [1], időben változó mértékben fény nyelődik el, akkor a mintában (illetve annak környezetében) akusztikus jel (hanghullám) keletkezik, melyet egy, a zárt vagy kvázizárt gáztérhez illesztett



mikrofonnal detektálni lehet. Ez az ún. fotoakusztikus vagy – a főleg az amerikai szakirodalomban időnként alkalmazott szóhasználat szerint – optoakusztikus effektus. A jelenséget A. G. Bell fedezte fel 1880-ban, amikor egy fonendoszkóp membránját, illetve a membránnal érintkező, erősen fényelnyelő folyadékot egy fényszaggató egységen (azaz egy forgó tárcsán) átvezetett, és így teljesítménymodulált napfényvel megvilágítva hangot észlelt. További vizsgálatai során azt is megfigyelte, hogy bizonyos fényszaggatási frekvenciákon a keletkező jel rezonáns módon megerősödik. Megállapította, hogy a rezonáns erősödés frekvenciái megegyeznek a mintatartó (későbbiekben fotoakusztikus kamra) egy-egy akusztikus rezonanciafrekvenciájával.

Már a múlt század negyvenes éveiben felvetődött, hogy a fotoakusztikus módszert alkalmazni lehetne gázkomponensek koncentrációjának mérésére, de a megfelelő fényforrás hiánya miatt csak néhány ilyen irányú próbálkozás történt. A lézerek felfedezése a tudomány és a technika számos területe mellett a fotoakusztikus gázdetektálásban is forradalmi fejlődést idézett elő. Szinte a lézerek felfedezésével egy időben elkezdték vizsgálni a lézerek alkalmazhatóságát fotoakusztikus mérésekben. Hamar nyilvánvalóvá vált, hogy lézerekre alapozva olyan mérőeszközöket lehet létrehozni, amelyekkel szennyező komponensek koncentrációját kiemelkedően kis koncentrációban (ppb vagy sub-ppb) és – a lézerek keskeny emissziós sávspeciességeinek köszönhetően – nagy szelektivitással lehet mérni (2–3. ábra).

Virágkorát a fotoakusztikus módszer a múlt század 80-as éveiben élte, amikor CO és CO₂ gázlézerekre alapozva ppb vagy ppb alatti koncentrációk kimutathatóságát demonstrálták különböző kutatólaboratóriumokban. A gázlézerek előnye, hogy fénytelsítményük a watt nagyságrendbe esik, és működési hullámhosszuk a közép-infravörösben található, ahol a legtöbb gázkomponens erős (jellemzően rezgési alapátmenetekhez tartozó) elnyelési vonalakkal rendelkezik. Azonban ezek a lézerrendszerek rendkívül bonyolultak és nehezen üzemeltethetők voltak, ezért a kezdeti lelkesedés elmúltá után egyértelművé vált, hogy a gázlézereken alapuló fotoakusztikus rendszerek gyakorlati alkalmazhatósága erősen korlátozott. Példaként megemlíthető az a zürichi ETH intézetben kifejlesztett CO₂-lézeres fotoakusztikus gázdetektáló rendszer [2], melyet egy kamionba telepítettek, és működtetéséhez jelentős szakembergárdára volt szükség. A rendszer bonyolultsága az elért nagy érzékenység ellenére meggátolta a módszer széles körű elterjedését.

Az 1990-es évek elejétől kezdve újfajta fényforrások alkalmazása tette lehetővé a fotoakusztikus módszer egyre szélesebb körű elterjedését az iparban és a környezetvédelemben. Különösen

előnyösen alkalmazhatóknak bizonyultak fotoakusztikus mérések céljára a szobahőmérsékleten működő, a lézerre adott áram változtatásával hullámhossz-hangolható, optikai szálba csatolt fényű diódalézerek, melyeket eredetileg telekommunikációs alkalmazásokra fejlesztettek ki. E lézerek várható élettartalma meghaladja a tíz évet, nagy mechanikai stabilitással rendelkeznek, és működésük teljesen automatizálható. A diódalézeres fényforrások alkalmazásával a fotoakusztikus rendszerek felépítése jelentősen leegyszerűsödött. Ugyanakkor, mivel a szoba-hőmérsékletű diódalézerek a közeli infravörös tartományban emittálnak, ahol a molekulák viszonylag gyenge rezgési felhangjai és kombinációs sávjai találhatók, a diódalézeres fotoakusztikus detektálással elért legkisebb kimutatható koncentráció jellemzően a ppm, néhány esetben a sub-ppm tartományba esik. Ezért a fotoakusztikus rendszerek fejlesztésének és alkalmazásának elsődleges irányává az emissziós mérések váltak, ahol viszonylag nagy koncentrációkat kell mérni, de kiemelkedő fontossággal bír a rendszer rövid (lehetőleg másodperc közeli) válaszideje, nagy megbízhatósága, robusztussága.

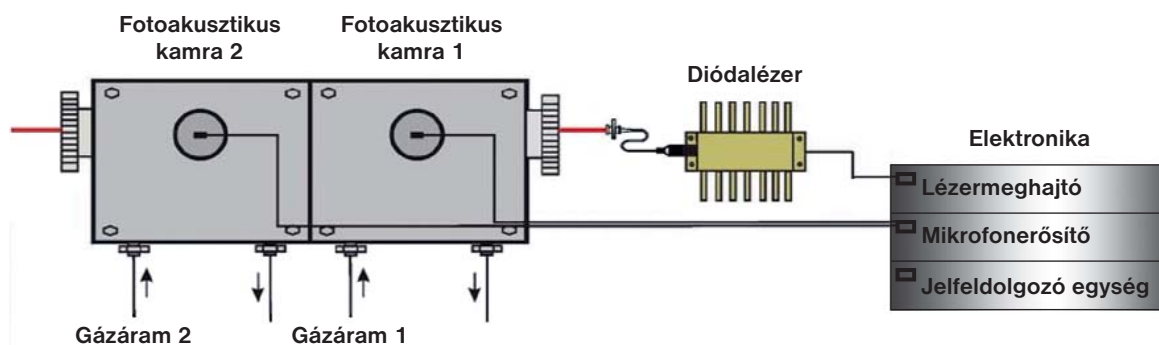
Továbbá a fotoakusztikus módszer egyik nagy előnye, hogy a fotoakusztikus jelet gerjesztő fény a fotoakusztikus kamrán áthaladva általában csak kismértékben gyengül, és mivel a fotoakusztikus mérések során nem a mérőkamrán áthaladó, hanem a kamrában elnyelt fény mérése történik, az áthaladó fény felhasználható egy második (esetleg egy harmadik stb.) kamrában a fotoakusztikus jel mérésére (1. ábra). Ennek megfelelően a fotoakusztikus mérési módszert korábban már számos olyan esetben alkalmazták sikeresen, amikor két vagy több gázáramban szimultán vagy kváziszimultán folyik egy vagy több komponens mérése.

Példák a fotoakusztika gyakorlati alkalmazásaira

Földgáz kén-hidrogén- és vízgőztartalmának mérése

A kén-hidrogén (H₂S) és a vízgőz (H₂O) mérése kiemelt fontossággal bír a földgáziparban, mivel a H₂S rendkívül korrozív hatással a csővezetésekre, különösen abban az esetben, amikor a földgáz nagy koncentrációban vízgőzt is tartalmaz. Továbbá a földgáz elégetésekor a H₂S-ből a környezetre káros kén-dioxid (SO₂) keletkezik. Ezért a kén-hidrogén-tartalom a vízgőz- és szén-dioxid- (CO₂) tartalommal együtt a földgáz kritikus minőségi paramétere, és mint ilyet szigorúan szabályozni és ellenőrizni kell. Különböző módszerek léteznek ezeknek a komponenseknek a koncentrációmérésére, de ezek hosszú távú megbízhatósága erősen korlátozott, ezért egyik módszer alkalmazása sem vált még

1. ábra. A fotoakusztikus mérési összeállítás két gázáramban történő mérésekhez. Ez az elrendezés optimálisan használható a két gázárambeli kis különbségek differenciális méréséhez



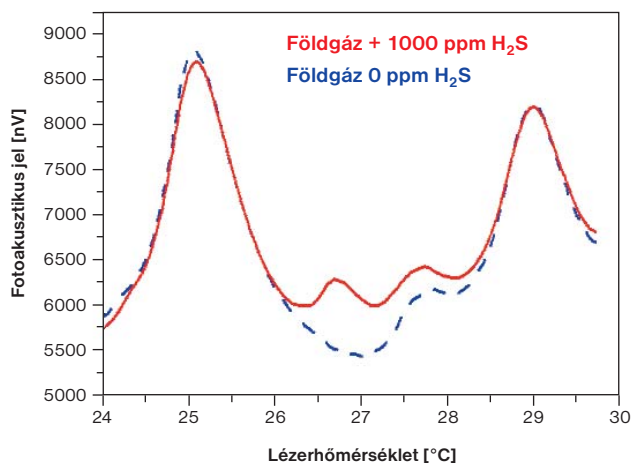


2. ábra. Fotoakusztikus kén-hidrogén-mérő fényképe. 1. A nyomás-állító tokozás, amelyben az elektronika és a lézerek találhatók, 2. a fotoakusztikus kamrákat tartalmazó rozsdamentes doboz



3. ábra. Kilélegzett levegő metánkoncentrációjának mérése fotoakusztikus műszerrel. Az alany egy csövön keresztül fújja egy üvegpalackba a kilélegzett levegőt, amelyet a műszer folyamatos gázáramlás mellett mintavételez

teljesen rutinszerűvé, illetve általánossá földgáziparban. A kén-hidrogén és a vízgőz olyan földgázszennyező komponensek, melyek koncentrációjának folyamatos mérését törvényi szabályozás írja elő. Spektroszkópiai elvű mérésekre kiválóan alkalmas a közeli infravörös tartomány, ezen belül vízgőz esetén az 1371 nm, míg kén-hidrogén esetében az 1574 nm körüli hullámhossztartomány. Azonban a spektroszkópiai elvű koncentrációméréseket nehezíti az a körülmény, hogy a közeli infravörös hullámhossztartományban a földgáz fő komponensei (azaz a szénhidrogének és ezen belül elsősorban a metán (CH_4), valamint a szén-dioxid) jelentős mértékű elnyeléssel bír. Valójában ezeknek a spektrális interferenciát okozó CH_4 -, CO_2 -elnyelési vonalaknak az egységnyi koncentrációra normált elnyelése nagyságrendekkel kisebb, mint a mérendő H_2S és H_2O komponenseké, azonban a koncent-



4. ábra. Földgáz fotoakusztikus spektruma mesterségesen megnövelt H_2S -tartalom mellett, illetve a kén-hidrogén-mentesített esetben (megjegyzés: a valódi mérési körülmények között, amikor néhány ppm H_2S -koncentráció mérésére van szükség, vizuálisan nem érzékelhető a H_2S -t tartalmazó és a nullgáz spektruma közötti különbség)

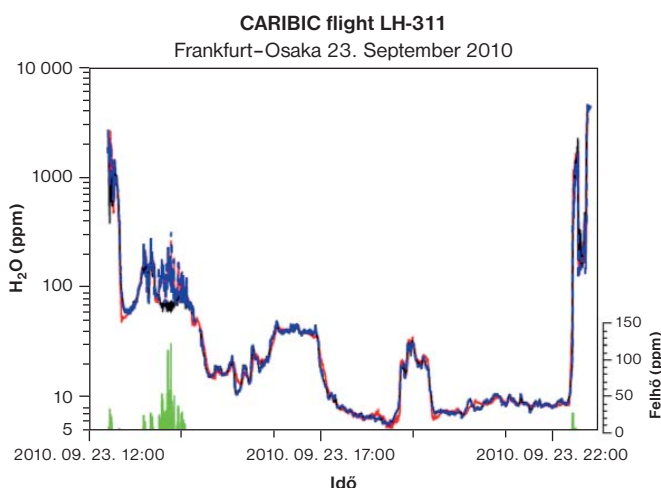
rációjuk nagyságrendekkel nagyobb (4. ábra). Ez teszi szükségessé a differenciális mérési elrendezést, amit úgy valósítunk meg, hogy az egyik kamrába a mérendő gázmintát juttatjuk, míg a másik kamrába bevezetett gázmintát előzetesen átvezetjük egy kén-hidrogén-mentesítő vegyszeren, azaz nullgázt (kén-hidrogén-mentes gázt) generálunk [3]. Mivel a vegyszer lényegében nem változtatja meg a H_2S -koncentrációt, így a mérőkamrában mért $\text{H}_2\text{S} + \text{CO}_2$ jelből levonva a referenciakamrában mért CO_2 jelet, a különbségi jel arányos lesz a H_2S -koncentrációval, azaz a differenciális mérés segítségével a H_2S -jel elfedését meg lehet szüntetni (vagy legalábbis nagymértékben csökkenteni lehet). Erre a differenciális mérési eljárásra alapozott fotoakusztikus mérőműszereket gyárt a holland Hobré Instruments BV cég, illetve magyarországi leányvállalata, a Hobré Laser Technology Kft. Eddig több mint 60 ilyen műszert telepítettek a világ számos részén, például Norvégiában, Brazíliában, többek között tengeri fúrótornyokra; és éveken át tartó folyamatos, hibamentes működésükkel bizonyítják a fotoakusztikus módszer előnyös tulajdonságait.

Repülőgépes vízgőz- és teljes víztartalom-mérés

A légkörben található vízgőznek, illetve a felhőknek a globális energiamérlegben játszott szerepének fontossága közismert. Ennek megfelelően évtizedek óta komoly erőfeszítések történnek arra, hogy minél több repülőgépet felszereljenek legalábbis vízgőz-, de optimális esetben kombinált vízgőz- és teljes víztartalom-mérő műszerekkel (lásd a különböző nemzetközi projekteket, pl. MOZAIC, CARIBIC, IAGOS). Ezen belül a CARIBIC-projektben egy Szegedi Tudományegyetemen kifejlesztett műszer szolgál a vízgőz és a teljes víztartalom mérésére az alábbiak szerint [4]. A repülőgépre telepített fotoakusztikus műszerbe a repülőgép külső testére szerelt speciális mintavevő egységből jut a két mérendő gázminta, méghozzá oly módon, hogy az egyik mérőkamrába (ami a levegő vízgőztartalmát méri) a levegőből csak a vízgőz jut, míg a másik mérőkamrába (ami a levegő teljes víztartalmát méri) a vízgőzön kívül bejutnak a levegőben található folyékony vagy szilárd fázisú ún. felhőcseppek is. (Megjegyzés: a mintavételezés úgy van kialakítva, hogy a felhőcseppek teljes mértékben elpárolognak, mire a fotoakusztikus mérőkamrába jutnak, azaz



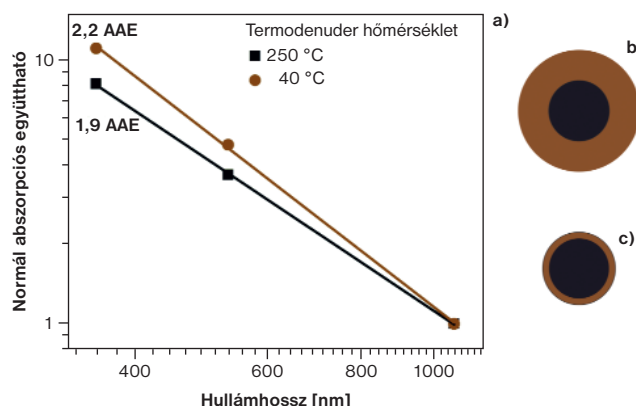
vízgőzként jelennek meg a teljes víztartalmat mérő kamrában). Ha a két mérőkamrában ugyanazt a vízgőz-koncentrációt mérjük, azt jelenti, hogy az aktuálisan mintavételezett levegőtérforrásban nincsenek felhőcseppek. Azonban, ha a teljes víztartalmat mérő kamrában mért vízgőz-koncentráció meghaladja a másik kamrában mért vízgőz-koncentrációt, akkor a repülőgép felhőn halad keresztül, és a teljes víztartalmat mérő kamrában mért vízgőz-koncentrációból levonva a vízgőzt mérő kamrában mért vízgőz-koncentrációt megkapjuk az ún. felhőcsepp-koncentrációt (5. ábra).



5. ábra. Atmoszférikus vízgőz (fekete görbe) és a teljes víztartalom (piros görbe: fotoakusztikusan mért, kék görbe: referencia-módszerrel mért), valamint a kettő különbségéből számolt felhőcsepp-koncentráció (zöld görbe) mérése fotoakusztikus rendszerrel egy repülőgépes út során

Légköri aeroszol-részecskék vizsgálata

A légköri fényelnyelő aeroszol-részecskék jellemzően a teljes látható tartományban elnyelik a fényt, de az elnyelés hullámhosszfüggése függ a részecskék összetételétől, és attól, hogy milyen forrásból származnak [5]. A részecskék abszorpciós spektrumának jellemzésére bevezették a log-log skálán ábrázolt abszorpciós spektrum meredekségét, az ún. Absorption Angström Exponent (AAE). Az AAE érték fotoakusztikus mérése így egyedülálló módon teszi lehetővé a légköri aeroszol-részecskék in-situ (természetes közegükben) és valós időben történő azonosítását. A fényelnyelő (korom) részecskéket bonyolult keveredési geometriájú, alacsony termális stabilitású (illékony) és magas hőtűrő képességgel rendelkező (nem illékony) komponensek alkotják. Az illékony komponenseket (pl. termikus módon, azaz felfűtve) eltávolítva a részecskékről, megváltozik az optikai abszorpció mértéke és hullámhosszfüggése, így az optikai mérésekből mennyiségi és minőségi információt kaphatunk a részecske keveredési állapotáról is. Ilyen célú mérésekre lett kifejlesztve egy több hullámhosszon működő kétkamrás fotoakusztikus rendszer, ahol az egyik kamra ki lett egészítve egy ún. termodenuder (TD) egységgel, amely alkalmas az aeroszol-részecskék illékony komponensének eltávolítására [6]. Ha a két mérőkamra egyikébe környezeti levegőt, míg a másikba a TD egységben, adott hőmérsékleten előkezelt környezeti levegőt juttatunk, akkor a két kamrában mért, az aeroszol által keltett fotoakusztikus jelek különbsége már nemcsak a részecske átlagolt spektrális sajátosságairól, hanem a keveredési állapotáról, az illékony komponensek kémiai



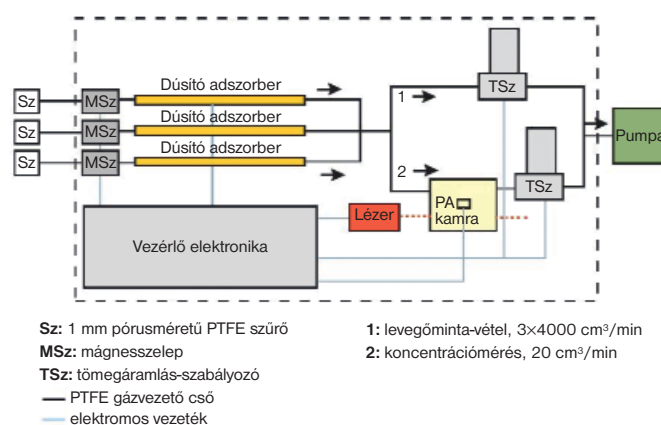
6. ábra. a) Fotoakusztikus aeroszolvérővel különböző termodenuder hőmérséklet mellett mért AAE értékek (szerves)mag – (szervetlen)burok aeroszolkeveredési geometriák esetén, illetve sematikus ábrák a különböző keveredési geometriákról: b) környezeti hőmérsékleten, c) termális kezelés után

és fizikai tulajdonságairól is hordoz információt. A légköri fényelnyelő részecskék fotoakusztikus, több hullámhosszú, többszörös, komplex, összetétel- és keveredési állapotfüggő spektrális válaszáinak in-situ vizsgálata a jövőben új lehetőséget teremthet a legfontosabb klimatikus és élettani kockázattal rendelkező részecskék szelektív és valós idejű monitorozásában (6. ábra).

Föld-felszín feletti koncentrációgradiensek mérése

A légkörben számos komponens koncentrációja változik a Föld-felszín feletti magasság függvényében, és a koncentrációgradiens, illetve az ebből számolt kibocsátási vagy üledési fluxus fontos információkat hordoz például a növényzetről. Egy háromszögletes fotoakusztikus rendszer bizonyítottan alkalmas ilyen (pl. ammóniafluxus) mérésre. A koncentrációprofil meghatározásához általában 2–6 különböző magasságban mért koncentrációértéket használnak. A fluxus számításához elvileg elegendő két különböző magasságban mérni, a további mérési pontok a számítás pontosságát, megbízhatóságát növelik. A Szegedi Tudományegyetemen fejlesztett terepi ammóniafluxus-mérő fotoakusztikus műszer (7. ábra) három mintavevő ággal rendelkezik, így három egyidejű, különböző magasságú mérést tesz lehetővé oly módon, hogy a rendszer mindegyik mérőága tartalmaz egy-

7. ábra. Három különböző mérési magasságban nagy pontossággú ammóniakoncentráció-mérésre alkalmas fotoakusztikus berendezés





egy dúsító abszorbert, amin első lépésben keresztüláramlik a különböző mérési magasságokból vett levegőminta, majd ezek egymás után történő kifűtésének segítségével visszanyerjük az elnyelt ammóniát, aminek összmenyiségét egy fotoakusztikus mérőkamrában mérjük [7]. Egy háromhetes nemzetközi összehasonlító méréssorozat eredményei bizonyítják, hogy a fotoakusztikus műszer kimutatási határa és időbeli felbontása megfelel a környezetvédelmi célú ammóniakoncentráció-mérés elvárásainak, továbbá lényegesen kevesebb karbantartást igényel és egyszerűbben működtethető, mint a legtöbb, más elven működő mérőműszer [8].

Orvosi alkalmazások

A kilélegzett gázok a szervezet anyagcseréjéről, biológiai állapotáról hordoznak információt, ezért detektálásuk az orvosi diagnosztikai kutatások egyik dinamikus fejlődő területe. A módszer valós idejű, non-invazív vizsgálatokat biztosít, alkalmazható diagnosztikai célra, terápia és fiziológiai folyamatok nyomon követésére. A kilélegzett levegőanalízishez használt mérőrendszerknél a kiváló szelektivitás és reprodukálhatóság alapkövetelmény, emellett fontos a folyamatok mintavételezési lehetősége, a rövid válaszidő, a hordozhatóság és a könnyű kezelhetőség. A lézerspektroszkópiai elven működő gázkoncentráció-mérőket – köztük a fotoakusztikus spektroszkópiai elvűeket – elterjedten alkalmazzák élettani és orvosi kutatásokhoz. A diódlézeres fotoakusztikus mérés különösen előnyösnek bizonyult a kilélegzett metánkoncentráció meghatározásához humán és állatmodellekben [9]. A vizsgálatok során a mérési tartomány tipikusan 0,5–200 ppmV között változhat. A Szegedi Tudományegyetem Sebészeti Műtéttani Intézetében az oxidoreduktív stresszállapotok és a vékonybél mikroeringési zavarainak kilélegzett metánkoncentráció-változásaival kapcsolatos összefüggéseit vizsgálják fotoakusztikus műszerrel [10]. Eredményeik alapján a kilélegzett metánkoncentráció mérése non-invazív, valós idejű diagnosztikai eljárásnak ígérkezik különböző nehezen észlelhető kórállapotokban [11].

Lehetséges új fejlődési irányok

Mindenképpen fontos megemlíteni az új fényforrások megjelenését, melyek ára folyamatosan csökken, míg megbízhatóságuk nő, így egyre inkább alkalmassá válnak arra, hogy a fotoakusztikus mérőrendszerek fényforrásaiként hasznosuljanak [12]. Ezek közül is kiemelkednek az ún. kvantumkaskád-lézerek, melyek a közép-infravörösben működnek, és segítségükkel a közeli infravörösnél nagyságrendekkel erősebb elnyelési vonalakon lehet fotoakusztikus méréseket végezni, azaz a közeli infravörös tartományra jellemző ppm helyett ppb vagy sub-ppb érzékenységek érhetők el. Félvezető lézerekben alapvetően a félvezető anyagok változtatásával érhetők el különböző, tipikusan 3 μm -nél kisebb emissziós hullámhosszak. A kvantumkaskád-lézerek esetén viszont a hullámhossz elsősorban a geometriai struktúrától függ, és megfelelő tervezéssel 4–24 μm között bármely hullámhosszú emisszió elérhetővé válik. A nagyobb érzékenységnek és a gerjeszthető hullámhossz-tartomány bővülésének köszönhetően új komponensek válnak mérhetővé, és ez által jelentősen bővül az alkalmazási lehetőségek köre is.

Az új fényforrások fotoakusztikus rendszerekbe történő integrálása mellett intenzíven kutatott az új típusú detektorok, valamint új kamratípusok bevezetése. Egyre szélesebb körben elterjedt például a kvarckristály detektoron alapuló mérés, amelynek a detektor egy hangvilla alakú kvarckristály [13]; legfőbb elő-

nyei a nagy érzékenység és a kis térfogatú gázminta mérésének lehetősége. A fotoakusztikus kamrák fejlesztésekor általános cél a mérés pontosságnak növelése, emellett azonban érdemes megemlíteni, hogy a valós idejű, rövid válaszidejű koncentrációadatokot igénylő alkalmazások megjelenése miatt gázkezelés nélküli, nyitott kamrák is készülnek [14, 15].

Köszönetnyilvánítás. Szerzők köszönetet nyilvánítanak a GINOP-2.3.2-15-2016-00036 és az EFOP-3.6.1-16-2016-00014 projektek által nyújtott támogatásért.

IRODALOM

- [1] Kovács M., Dóka O., Bicanic D., Ajtony Zs.: *Microchemical Journal* (2017) 135, 100–104.
- [2] Meyer, P. L.; Sigrist, M. W.: *Rev. Sci. Instrum.* (1990) 61, 779–1807.
- [3] Varga, A.; Bozókai, Z.; Szakáll, M.; Szabó, G.: *Appl. Phys. B* (2006) 85, 315–321.
- [4] Tátrai, D.; Bozókai, Z.; Smit, H.; Rolf, C.; Spelten, N.; Krämer, M.; Filges, A.; Gerbig, C.; Gulyás, G.; Szabó, G.: *Atmos. Meas. Tech.* (2014) 7, 6359–6384.
- [5] Utry, N.; Ajtai, T.; Filep, Á.; Pintér, M.; Török, Z.; Bozókai, Z.; Szabó, G.: *Atmos. Environ.* (2014) 91, 52–59.
- [6] Ajtai, T.; Pintér, M.; Utry, N.; Kiss-Albert, G.; Gulyás, G.; Pusztai, P.; Puskás, R.; Bereczky, Á.; Szabados, Gy.; Szabó, G.; Kónya, Z.; Bozókai, Z.: *Atmos. Environ.* (2016) 134, 109–120.
- [7] Pogány, A.; Mohácsi, Á.; Jones, S. K.; Nemitz, E.; Varga, A.; Bozókai, Z.; Galbács, Z.; Weidinger, T.; Horváth, L.; Szabó, G.: *Atmos. Environ.* (2010) 44, 1490–1496.
- [8] von Bobrutski, K.; Braban, C. E.; Famulari, D.; Jones, S. K.; Blackall, T.; Smith, T. E. L.; Blom, M.; Coe, H.; Gallagher, M.; Ghalaieny, M.; McGillen, M. R.; Percival, C. J.; Whitehead, J. D.; Ellis, R.; Murphy, J.; Mohácsi, A.; Pogány, A.; Junninen, H.; Rantanen, S.; Sutton, M. A.; Nemitz, E.: *Atmos. Meas. Tech.* (2010) 3, 91–112.
- [9] Tuboly, E.; Szabó, A.; Erős, G.; Mohácsi, Á.; Szabó, G.; Tengölics, R.; Rákhely, G.; Boros, M.: *J. Breath Res.* (2013) 7 (4), 046004.
- [10] Szabó, A.; Ruzsanyi, V.; Unterkofler, K.; Mohácsi, Á.; Tuboly, E.; Boros, M.; Szabó, G.; Hinterhuber, H.; Amann, A.: *J. Breath Res.* (2015) 9(1) 016009.
- [11] Tuboly, E.; Molnár, R.; Tőkés, T.; Turányi, R.; Hartmann, P.; Mészáros, A.; Striffler, G.; Földesi, I.; Siska, A.; Szabó, A.; Mohácsi, Á.; Szabó, G.; Boros, M.: *Sci. Rep.* (2017) 7, 7329.
- [12] Zhang, L.; Tian, G.; Li, J.; Yu, B.: *Appl. Spectrosc.* (2014) 68(10), 1095–1107.
- [13] Patimisco, P.; Scamarcio, G.; Tittel, F. K.; Spagnolo, V.: *Sensors* (2014) 14(4), 6165–6206.
- [14] Bozókai, Z.; Szabó, A.; Mohácsi, Á.; Szabó, G.: *Sensor Actuat. B* (2010) 147, 206–212.
- [15] Lang, B.; Bergmann, A.: *Proc. IEEE Sensors* (2016) 1–3.

A cikk első szerzője, Bozókai Zoltán 2017 végén Gábor Dénes-díjat kapott.

HUNGARIAN CHEMICAL JOURNAL *LXXIII. No. 2. February*

CONTENTS

ANALYTICAL CHEMISTRY – 2018

<i>Editorial remarks</i>	38
KATALIN KÖVÉR, FERENC RITZ, and GÁBOR GALBÁCS	
<i>Challenges in the analysis of biologics</i>	39
ZOLTÁN URBÁNYI	
<i>Characterization of therapeutic proteins: primary structure investigations with MS</i>	43
ZSOLT BIHARI, ATTILA BAGDI, SAROLTA BAGI-TIMÁRI, and VIKTOR HÁDA	
<i>Role of NMR in the analysis of biologics</i>	49
RÓBERT KISS, ÁDÁM FIZIL, and CSABA SZÁNTAY	
<i>Application of chromatographic packing in microchips</i>	56
ATTILA GÁSPÁR	
<i>Recent research trends in ICP–MS</i>	60
MIHÁLY BRAUN, and GÁBOR GALBÁCS	
<i>Practical applications of photoacoustic gas detection</i>	64
ZOLTÁN BOZÓKI, ANNA SZABÓ, TIBOR AJTAI, and GÁBOR SZABÓ	

14. Nemzetközi Junior Természettudományi Diákolimpia (Nijmegen, Hollandia, 2017. december 3–12.)

A Nemzetközi Junior Természettudományi Diákolimpiát (International Junior Science Olympiad, röviden IJSO) Indonézia alapította 2004-ben. A versenyen, ahol elvileg egyenlő arányban szerepel a három természettudományos tantárgy (fizika, kémia, biológia), csak 16. évüket be nem töltött diákok indulhatnak.

Ebben az évben mindössze 14 magyar diák jelentkezett a versenyre. Ez részben azzal magyarázható, hogy egy európai úticél kevésbé motiválja a diákokat a kemény, fél éves felkészülésre. A másik ok viszont sokkal súlyosabb, ugyanis egyre nagyobb sebességgel romlik a természettudományos oktatásunk színvonala. A természettudományos tárgyak általános iskolai heti 1 órás oktatása és a követelmények további zsugorítása mind ezt az irányt erősítik.

Ezt az olimpiát az oktatási kormányzat 2007 óta anyagi segítséggel is támogatja. A Richter Gedeon Nyrt. a verseny elejétől fogva jelentős anyagi támogatást nyújt a csapatnak. Ebben az évben – a viszonylag alacsony utazási költségek miatt – nem volt szükség nagy összegű szponzorálásra, így az előbb említetteken kívül csak a Servier Kutatóintézet Kft.-től kaptunk még anyagi támogatást. A Magyar Kémikusok Egyesülete szervezi a kiutazást és az ezzel járó adminisztrációt, továbbá az anyagi források megszerzését, a támogatási pályázatok elkészítését és teljes bonyolítását.

A versenyre való felkészítést ebben az évben is júniusban kezdtük meg. Az első válogató eredménye alapján a legalább 50%-os teljesítményt elérő legjobb nyolc diákot választottuk ki a szűkebb felkészítőbe. Őket szeptemberben és októberben minden hétvégén a korábbi versenyek tapasztalatai és a követelmények alapján az ELTE Apáczai Csere János Gimnáziumban készítettük fel (Gyertyán Attila fizikából, Ács Zoltán biológiából, Villányi Attila és Vörös Tamás kémiából). A második válogató után kialakult hatfős csapat az utolsó hónapban a további elméleti felkészítő mellett kipróbálhatta a gyakorlati forduló team-munkáját is.

Az idei magyar csapat tagjai: *Farkas Csanád*, a budapesti Eötvös József Gimnázium 10. osztályos tanulója, *Balogh Zsófia*, a győri Révai Miklós Gimnázium 9. osztályos tanulója, *Tóth-Rohonyi Iván*, a budapesti Fazekas Mihály Általános Iskola és Gimnázium 9. osztályos tanulója, *Csonka Zétény*, a pécsi Ciszterci Rend Nagy Lajos Gimnázium 9. osztályos tanulója, *Serban Andrada*, a budapesti Eötvös József Gimnázium 10. osztályos tanulója, *Bonifert Balázs*, a budapesti Baár-Madas Református Gimnázium 9. osztályos tanulója.

Ebben az évben a szervezők külön fizikai, kémiai és biológiai témájú feladatokat készítettek, nem próbálkoztak az integrálással, ám az egyes feladatokban fel-feltűntek a másik tantárgyhoz erősen kapcsolódó kérdések is. Ha röviden kellene összefoglalni a feladatok minőségét, akkor – az Európai Unió oktatási rendszerének megfelelően – a feladatok többségének megoldásában jelentős szerepet játszott a szövegértés, vagyis alapvetően természettudományi ismereteket ugyan elvártak, de a legtöbb összefüggést a feladatlap tartalmazta, és ezeket mindössze értelmezni kellett, vagy be kellett helyettesíteni a képletbe. Emiatt több európai ország sokkal jobban teljesített a versenyen, mint általában. Az eredmények alapján a biológia feladatsorok mutatkoztak a legnehezebbnek, a kémia átlagos nehézségű volt. Fizikából különösen a gyakorlati fordulónál látszott,



A magyar csapat (balról): Farkas Csanád, Balogh Zsófia, Serban Andrada, Villányi Attila felkészítő és kísérő tanár, Bonifert Balázs, Tóth-Rohonyi Iván, Csonka Zétény Előd

hogy az utolsó kérdésekre már nem maradt ideje a csapatok többségének.

A feladatok megvitatása az átlagosnál jóval zökkenőmentesebb volt. A szerzők általában elfogadták a kritikát és készségesen módosították a kérdéseket.

A versenyzők a versenyek közti napokban, a tanárok a diákok versenynapjain vettek részt különféle programokon. Igazi kirándulás csak az egésznapos amszterdami városnézés volt, a többi alkalommal elsősorban a verseny szponzorai tartottak előadásokat, bemutatókat. Ezek közül talán a legérdekesebb a hollandiai mélyföld csatornarendszereit működtető szervezetek bemutatói voltak. A programok lebonyolítását jelentősen megnehezítette a szokatlan időjárás, ugyanis Nijmegen és környékét erős hóesés és hideg időjárás sújtotta a verseny majdnem teljes időtartama alatt.

Az időjárás miatt több csapatban megfáztak a diákok. A magyar csapatot ennél is súlyosabb vírusfertőzés támadta meg (valószínűleg az egyik diákunk itthonról hozta). Ennek ellenére mindenki minden versenynapon részt vett, és nagyon szépen szerepelt.

Az idei versenyen 48 ország 285 versenyzője mérte össze tudását. Ebben az évben is valamennyi diákunk éremmel tért haza. Ezzel az országok nem hivatalos versenyében körülbelül a 13. helyen végeztünk. Farkas Csanád, Bonifert Balázs, Balogh Zsófia, Tóth-Rohonyi Iván és Serban Andrada ezüstérmet kapott, Csonka Zétény bronzérmes lett.

Az IJSO idei feladatsorait az érdeklődők hamarosan letölthetik a magyar csapat hivatalos honlapjáról (<http://ijso.kemavill.hu>).

Villányi Attila

TÁMOGATÓK



EMBERI ERŐFORRÁSOK
MINISZTERIUMA



GEDEON RICHTER LTD.

AOX analizátorok

manuális - félautomata - automata

behr

Labor - Technik

Düsseldorf

**Behr
SE-II,
SE-III**

Félautomata
mintaelőkészítő



- o gyors
- o pontos
- o egyszerű
- o robosztus



Behr CL-10

magashőmérsékletű
égető kemence
mikrocoulometriás titrálóval

választhatóan manuális vagy automata minta-adagolással



AKTIV INSTRUMENT Kft.

ANALITIKAI BERENDEZÉSEK, AUTOMATA ANALIZÁTOROK
1145 Budapest Pétervárad u. 14.
Tel.: (1)-789-2778, Fax: (1)-785-8489
Mail: kozpont@aktivinstrument.hu
web: www.aktivinstrument.hu

**Behr
PXS-24**

Teljesen
automatizált
aktívszenes
minta-
előkészítő
24 mintára



**Behr
AXS-48**

automata
kemence-
mintabeadó