

Válasz
Dr. Klebovich Imre egyetemi tanár opponensi véleményére

Köszönöm Klebovich Imre professzor úrnak értekezésem áttanulmányozását és a hozzá fűzött megjegyzéseket és kérdéseket, valamint dicsérő szavait. A felvetett kérdésekre azok sorrendjében a következőket válaszolom:

1,

Valóban, a különböző gyógyszervegyületek, így a kefalosporinok és a temozolomid meghatározásának/vizsgálatának analitikai módszereinek ismertetésekor kimaradtak az egészségügyi hatóságok által előírt irányelvek. Ebben bizonyára szerepe van annak is, hogy az analitikus vegyész viszonya a gyógyszerkönyvekhez kevésbé szoros, mint a gyógyszerész analitikusok esetén. A gyógyszerkönyvekbe akkor kerülnek be egyes analitikai eljárások, módszerek, amikor azok megfelelőségéről teljes bizonyossággal meggyőződött a szakma. Mivel a kapilláris elektroforézis egy 25 éves, viszonylag fiatal módszer, valószínűleg mostantól várható, hogy mind több elektroforetikus módszer jelenik meg az egészségügyi hatóságok ajánlásaiban.

A kefalosporinok meghatározását a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv (Ph. Hg. VIII.), az Európai Gyógyszerkönyv (Ph. Eur. 8.) és az Amerikai Gyógyszerkönyv (USP) is folyadékkromatográfiával végezteti C18-as oszlopon. A meghatározáshoz izokratikus és gradiens elúció alkalmazását is leírják, a detektálás pedig 220-270 nm-en UV spektrofotometriásan javasolt.

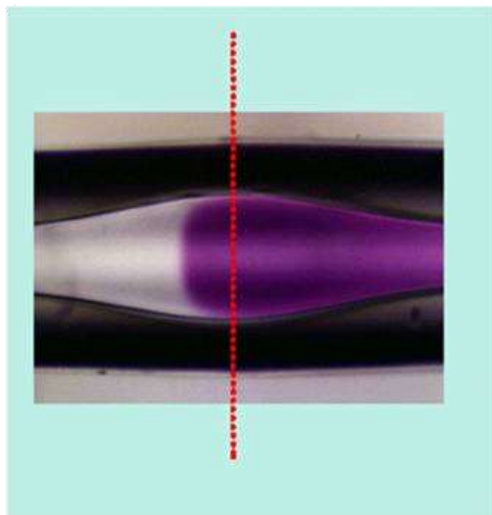
A temozolomid hatóság által megszabott vizsgálatait az Amerikai Gyógyszerkönyvben (USP 37-NF 32) található meg, itt is HPLC-t és 270 nm-en történő spektrofotometriás detektálást alkalmaznak.

A kapilláris elektroforézis alkalmazását előíró gyógyszerkönyvi cikkelyek viszonylag későn, az Európai Gyógyszerkönyv 6. kiadásának 6. pótkötetében (Ph. Eur. 6.6) 2010 január elsején lépett életbe. A kapilláris elektroforézist elsősorban immunglobulinok, radiofarmakológiai készítmények, vakcinák, géntechnológiai készítmények vizsgálataihoz javasolják. Az értekezésben vizsgált gyógyszervegyületek esetén a kapilláris elektroforézis alkalmazhatóságáról nem találunk adatokat.

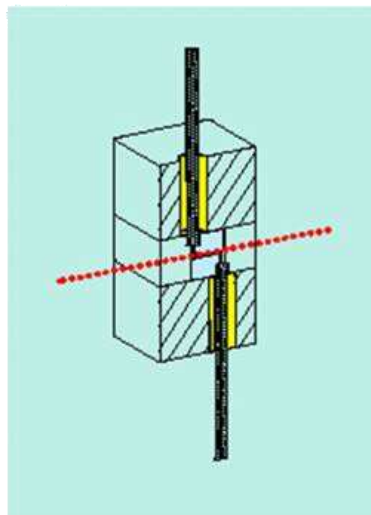
2,

Valóban, kapilláris elektroforézis alkalmazásánál a legnagyobb korlát a detektáláskor elérhető érzékenység, mivel az elemzéshez használható mintaoldat nagyon kis térfogatú (1-50 nL) és a kapillárison történő detektálás miatt rövid a detektálási úthossz (pl. 50 μm). A kapilláris görbülete miatt ráadásul a tényleges úthossz kisebb, mint a kapilláris belső átmérője, hiszen a fénynek csak egy kis része halad át pontosan a kapilláris közepén. Az érzékenység és a lineáris kimutatási tartomány ugyan javítható a kapilláris belső átmérőjének növelésével, ennek alkalmazási lehetőségét azonban korlátozza, hogy a nagyobb áramerősségek alkalmazása a kapilláris jelentős felmelegedését okozza. (A kapilláris átmérőjének megkétszerezése például a jelabszorbancia kétszeres, de az áramerősség négyszeres növekedéséhez vezet.) A túlzott áramfelhasználás (és így a túl nagy hőtermelődés) elkerülése érdekében olyan speciális kapillárisokat állítottak elő, melyek átmérőjét csupán az optikai fényút helyén növelték meg. Így születtek meg a "buborékcéls" és a "Z-céls" kapillárisok. A "Z-célskhöz" hasonló elven működnek az ún. nagyérzékenységű cellák is (a laborszlangben sokan ezeket a cellákat is "Z-célsknak" hívjuk), melyek végső soron 3 kapilláris darab megfelelő összeillesztését teszi lehetővé.

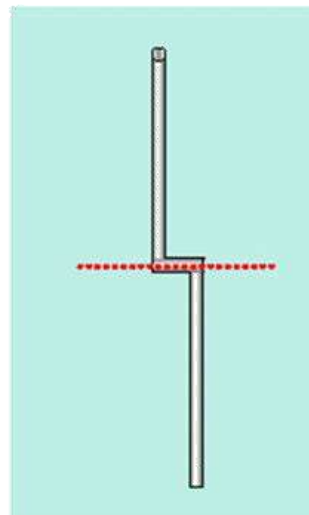
buborékcella



nagyérzékenységű cella



Z-cella



Agilent.com

Habár a nagy-érzékenységű cellát forgalmazó Agilent a termék leírásában [Agilent, Technical Note, Nov. 1 2006, 5989-9808EN] a nagyobb érzékenység mellett nagyfokú felbontást ígér, vizsgálataink szerint az elérhető felbontás csökken. Ez elméletileg is könnyen belátható, hiszen a detektálás a nagyjából 3 mm-nyi hosszúságú kapilláris szakaszon történik, így csak azok a csúcsok lehetnek az elektroferogramon teljes mértékben elválasztva, amelyek távolsága a kapillárisban legalább 3 mm. A nagyérzékenységű cella alkalmazásakor a további nehézség a 2 kapilláris darab szivárgásmentes és minimális holtterfoggal jellemezhető összeillesztése.

Mindezek miatt a bemutatott kapilláris elektroforetikus elemzéseink során a detektálás érzékenységének emeléséhez nem alkalmaztunk "Z-cellát". Nagyjából 10 évvel ezelőtt az egyik gyógyszergyártótól kaptunk ugyan egy ilyen eszközt (merthogy ők nem használták), de néhány kísérlet után, úgy találtuk, hogy ez nálunk sem válik be. Sokat mondó az is, hogy csak az Agilent forgalmaz ilyen "Z-cellát", a többi gyártó (pl. az ugyancsak nagy hagyományokkal rendelkező és kiváló konstrukciójú készülékeket kifejlesztett Beckman) tudtommal nem.

A detektálás érzékenységét szükség esetén "Z-cella" helyett inkább a buborékcellás kapillárisal javítottuk. A buborékcellás kapillárisok éppen azért gyakrabban alkalmazott alternatívák az érzékenység emeléséhez (igaz csak 3-4x faktoral), mert bár úgy növelik az optikai fényút hosszát, hogy a mintazóna hossza ugyanilyen mértékben rövidül, ezzel párhuzamosan azonban az illesztőegység (alignment interface) részének szélességét is csökkentik. Így az érzékenység javítása a felbontás romlása nélkül érhető el.

Egyébként a "Z-cella" kapilláris elektroforézisnél alkalmazott konstrukciójához nagyon hasonló módszer használatával többen is próbálkoztak a mikrofluidikai csipeknél is, ahol a Z-alakú csatornarész könnyen, zónaszélesedést okozó holtterfogat nélkül kialakítható. Az ilyen rendszerek FIA (flow injection analysis, mintabeinjektációs analízis) alkalmazásokhoz - ahol hosszabb mintazónákat kell detektálni - nagyon előnyösek lehetnek [pl. G.E.Collins és mtsa, Talanta, 2007; 72(1):301-4.].

3.

A 2. táblázatban a vizsgált anionok valós és számított koncentrációja többnyire valóban nem mutat nagyobb eltérést, a táblázatot kiegészítve az eltérések százalékos értékével az állapítható meg, hogy a belső univerzális standardként használt tioszulfáthoz hasonlóan nagy mozgékonyaságú komponensek esetén (bromid, klorid, szulfát, nitrit, nitrát) az eltérések +/- 3%-on belül voltak. Az eltérések azért lehetnek kicsik, mert a belső standard alkalmazása az egyes hibákat kompenzálja, másrészt a komponensek elektroforetikus mozgékonyasága hasonló. Elvileg 0%-os eltérés akkor lenne várható, ha a vizsgált komponens és az univerzális belső standard mozgékonyaságai teljesen megegyeznének. A táblázatban látható eltéréseket az oldatok készítésének vagy a csúcsok integrálásának hibái is eredményezhetik.

A foszfát ionnál mutatkozó nagyobb, 6%-os eltérés leginkább abból adódik, hogy annak mozgékonyasága lényegesen (több mint 30%-al) kisebb a tioszulfát mozgékonyaságánál. Az eltérés csökkentéséhez egy másik, a tioszulfáthoz hasonló mozgékonyaságú univerzális belső standardot kellene alkalmazni. A foszfát esetén a csúcstorzulás (elektrodiszperzió) jelensége is számottevő (a futtatópuffer háttérionja és a foszfát mozgékonyaságai közötti nagyobb eltérés miatt), ami a jelintegrálás hibáját is növeli.

2. táblázat. A (21) egyenlet alkalmazhatóságának vizsgálata ismert koncentrációjú anionok esetén. Belső univerzális standardként (IUS) a tioszulfátot használtuk.

anion	Csúcsterület	Valós koncentráció (μM)	A (21) egyenlettel számított koncentráció (μM)	eltérés (%)
tioszulfát*	3,271	240	-	
bromid	0,674	100	98,0	- 2
klorid	2,681	400	393	- 2
szulfát	2,730	200	200	0
nitrit	2,641	400	387	+ 3
nitrát	5,470	800	802	+ 0,2
foszfát	1,443	100	106	+ 6

* IUS

4.

Valóban, az értekezésben hivatkozott közlemények 11%-a az elmúlt 10 évben, 5%-a az elmúlt 5 évben jelent meg. Folytatva a statisztikát, a közlemények több mint fele az elmúlt 15 évből származik, ami jelzi a tudományterület újszerűségét. Az, hogy a közleményeknek csak 5%-a származik az elmúlt időszakból, annak egyik oka az, hogy a hivatkozott közlemények nagyjából fele kapilláris elektroforézissel kapcsolatos, ezek a hivatkozások pedig jellemzően 10 évnél régebbiek, mivel egy régebbi technikáról van szó. Másrészt az értekezésben bemutatott kapilláris elektroforetikus munkáink jórésze is 5 évnél régebbi, és így természetesen a más szerzők kapcsolódó munkái is. Az is igaz lehet, hogy az értekezés írása során nem törekedtem a hivatkozási listának a legfrissebb irodalmakkal való frissítésére.

Kétségtől, a mikrofluidikai területen intenzív szabadalmaztatás miatt a hivatkozható közlemények száma is kisebb lehet, hiszen a műszergyártó cégek nem a közlemények írásában, hanem a szabadalmak közlésében érdekeltek. Az alábbi diagramokból jól látható, hogy 2004-ig a közlemények számával hasonló nagyságrendű szabadalmat jelentettek meg, de mind a mai napig a szabadalmak száma jelentős, a tudományos közlemények számának 15-20%-a.

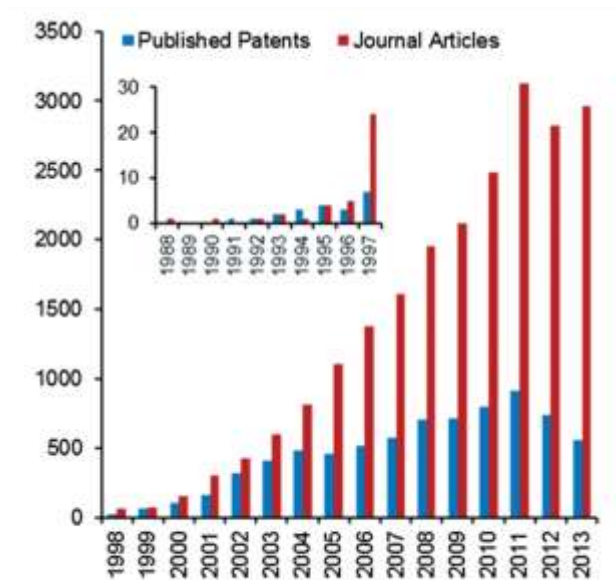


Fig. 2 The number of published patents and journal articles in microfluidics between 1988 and 2013.²⁵

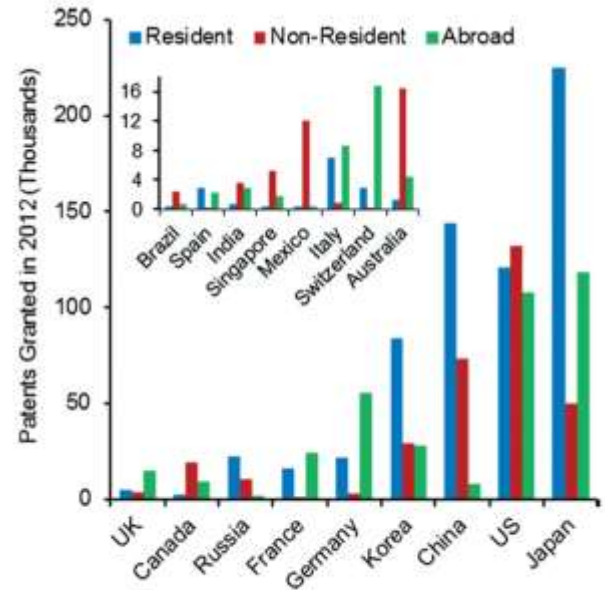
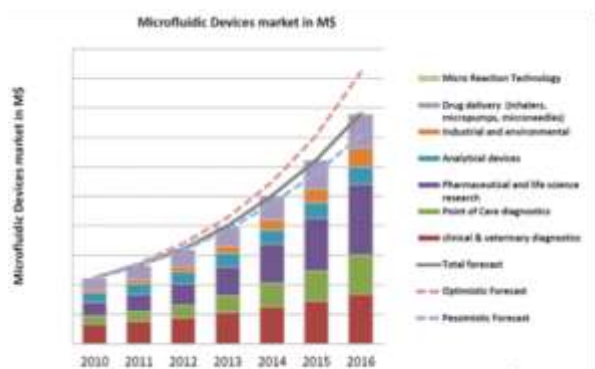


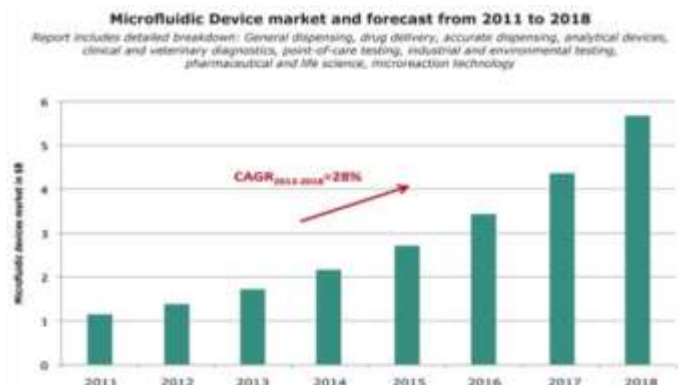
Fig. 3 The number of patents granted in 2012 in developed and developing economies as classified by applicant type.⁴⁵

forrás: A.K. Yetisen, L.R. Volpatti, Lab Chip, 2014, 14, 2217

Mindazonáltal, az előadásomban is be kívánom mutatni, hogy az elmúlt 2 évtizedben milyen nagy mértékben nőtt a mikrocsipek fejlesztésével és alkalmazásával kapcsolatos kutatások, közlemények száma és hogy az előrejelzések szerint jelentősen tovább emelkedik a mikrofluidikai eszközök piaca a közeljövőben.



forrás: Global Information, Inc



forrás: Yole Development

Mindezek alapján valóban az analitikai kémiában a mikrocsipek, lab-on-a-chip-ek fejlesztése az egyik legfontosabb, "legforróbb" irányzatnak tekinthető jelenleg és jó eséllyel a jövőben is, különösen, ha a jövőbeni műszaki fejlesztésektől új lendületeket kaphat (pl. újfajta miniatúr, érzékeny detektorok, vagy mikrocsip készítési technológia kifejlesztése következtében). Így, a reményeink szerint kifejlesztésre kerülő mikrocsipek parányi minták sokaságával is képesek párhuzamosan kémiai reakciókat lejátszani és komponenseket analizálni. Az egyik álomszerű cél például az lehet, ha a gyógyszergyártó cégek mikrofluidikai csipek párhuzamos elemzőegységeiben egyszerre ezernyi lehetséges gyógyszervegyületet szintetizálhatnak és határozhatnak meg biokémiai sajtóságokat óránként csupán nanoliternyi reagensoldatokat felhasználva, így rendkívüli módon csökkentve a költségeket és fokozva az elemzési sebességet.

Végezetül még egyszer köszönöm a dolgozatom bírálatának elkészítését és azt, hogy az értekezés nyilvános vitára való bocsátását javasolja.

Debrecen, 2015. szeptember 23.

Dr. Gáspár Attila