

Közeli infravörös spektroszkópia/mikroszkópia: roncsolásmentes kutakodás

GERGELY Szilveszter,¹ PÁRTA László,^{1,2} és SALGÓ András^{1,*}

¹ Budapesti Műszaki Egyetem, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

² Richter Gedeon Nyrt., Biotechnológia Osztály

Több mint kétszáz esztendeje annak, hogy Sir William Herschel kísérleteivel (1800. február 11.) kimutatta a közeli infravörös (NIR, near-infrared) – vörös szín alatti– frekvenciatartomány jelenlétét, és rámutatott ennek fontosságára.^{1,2} A 780-2500 nm (vagy 12800-4000 cm⁻¹) hullámhossz- (ill. hullámszám-) tartományban a kémiai kötések első, második, harmadik rezgési felharmónikusainak és kombinációinak gerjesztése révén komplex rezgési állapotváltozások érhetők el, amely változások hullámhossz függvénye a spektrum. A spektrumok a molekuláris állapotváltozások összességéként, mint kémiai és fizikai „ujjlenyomatok” értelmezhetőek. Az ilyen „ujjlenyomatok” valamely jelenség, rendszer jellemzőit, összefüggéseit kifejező, ábrázoló, jelképező logikai vagy matematikai formulák lehetnek, melyek komplexitásukból eredendően különféle (pl. kémiai, fizikai, fiziko-kémiai, biológiai, biokémiai stb.) információkat tartalmazhatnak, hordozhatnak.

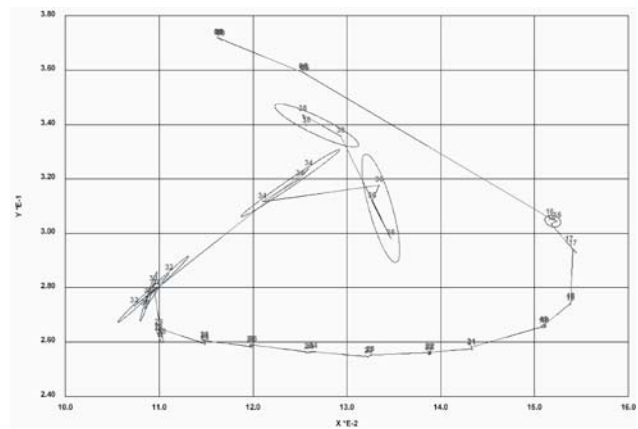
A spektrumok valós információtartalmát azonban nem mindig egyszerű felismerni, a bennük rejlő hordozott információkat gyakran különféle transzformációs módszerek, „lényegkiemelő” módszerek alkalmazásával lehet hatékonyan kinyerni. A transzformációs módszerek széles tárházából érdemes kiemelni, a spektrumok deriválásával (első és második deriváltak), az optikai szóródás korrekciójával (többszörös szóródási korrekció), valamint az adatredukciós módszerekkel (euklideszi távolság, Mahalonobis-távolság, polár távolság számítások) végzett eljárásokat, amelyek segítségével olyan transzformált spektrumokat vagy adatsorokat nyerhetünk, amik nagyságrendekkel több információt hordozhatnak, mint maga a primer spektrumserleg.³⁻⁹ A spektrumok információtartalma kiemelésének egy további hatékony útja a főkomponens analízis (PCA; principal component analysis), ami a spektrumok matematikai változékonyságának elemzésével, a lényeges (nagy változékonyságú) és lényegtelen (változékonyságot nem hordozó, kollineáris) részletek megkülönböztetésére nyújt lehetőséget.¹⁰

A biotechnológiai és gyógyszeripari gyakorlatban azért van szükségünk ezen matematikai, kemometriai módszerek egyre kifinomultabb használatára, mert nagyon gyakran egyedül csak a spektrum áll rendelkezésünkre – minden további kémiai, fizikai vagy bármely más, ún. referencia adat nélkül –, mint információforrás a vizsgált objektumokról. A biotechnológiai alapú gyógyszer- vagy hatóanyag-előállítási folyamatok különösen igénylik ezen spektrumalapú vizsgálati megközelítést, hiszen a klasszikus gyógyszer-előállításhoz képest itt a vizsgálandó anyagok, molekulák méretükben nagyobbak, komplexebbek, molekuláris környezetük (kísérő anyagok, metabolitok, fragmentumaik)

sokkal heterogénebb, a klasszikus analitikai vizsgálati módszerek nehezen vagy egyáltalán nem használhatók. Ezen vizsgálati megközelítés alkalmazása korábban jól bevált különféle természetes biológiai rendszerekben zajló folyamatok részleteinek elemzésére.¹¹

A biotechnológia alapú gyógyszer-előállítás általunk vizsgált két organizmusa az *Escherichia coli* és egy emlősejtes (CHO; Chinese hamster ovary) tenyészet, melyek fermentációs folyamatokban kerültek alkalmazásra. A fermentációs folyamatok közben tartására különféle PAT (process analytical technology) eszközöket használhatunk:

- hagyományos in-line érzékelőket (pl. pH, pO₂, pCO₂, T szondák);
- real-time eszközöket (pl. in-line NIR, ABER, on-line HPLC);
- korszerű és gyors at-line mérőeszközöket;
- adatgyűjtő (SCADA) rendszereket;
- kemometriai szoftvereket.



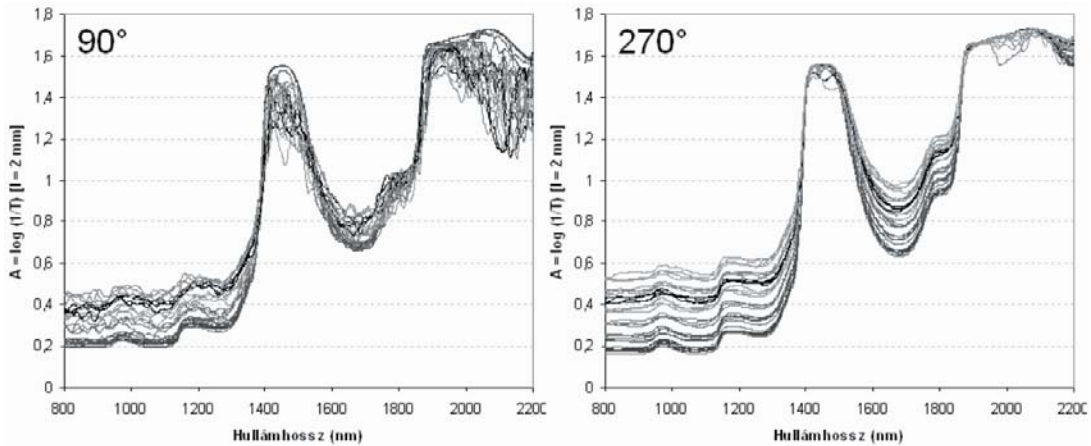
1. Ábra. NIR spektrumokból számított PQS minőségpontok változása az *E. coli* fermentáció lefutása során (0-38 óra).

Az 1. ábrán egy *E. coli* fermentáció off-line nyomon követésének eredményei láthatóak, ahol a spektrumok feldolgozását az ún. polár minősítő rendszerrel (PQS; polar qualification system), egy adatredukciós eljárással végeztük el. A fermentáció folyamatát (0-38 óra) a spektrumok alapján számított ún. „minőségpontok” időbeli változásával követjük. A minőségpontok időbeli rajzolata (trajektóriája) jellemző a biotechnológiai folyamatra, és az egyes minőségpontokhoz tartozó megengedhető szórás megadva, a fermentációs folyamat a spektrumok mérése és elemzése révén szabályozható, a technológiai célértékek jól közelíthetőek. Az eljárás különös előnye a gyors spektroszkópiai mérés (tipikusan fél perc) és az azonnali beavatkozás lehetősége.

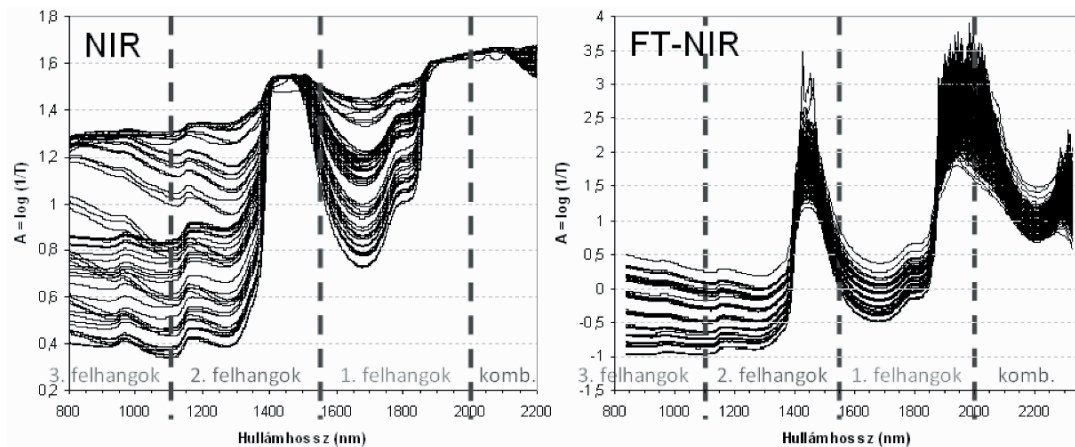
* email: salgó@mail.bme.hu

Egyszerűen fogalmazva azt mondhatjuk, hogy pontosan nem ismerjük a rendszerben lezajló biokémiai-molekuláris

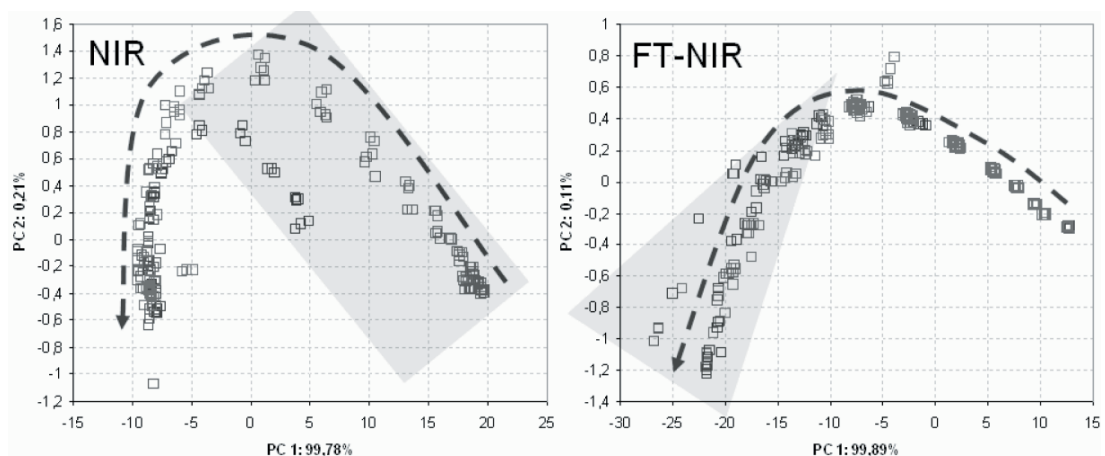
folyamatok és a molekuláris környezet változásának pontos részleteit, de a mért spektrum segítségével a fermentációs folyamatot ellenőrzött értékek között tudjuk tartani.



2. **Ábra.** Glicerín-víz modell rendszer NIR spektrumainak változása 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600 és 2000 rpm kevertetés hatására a szonda 90°-os (balra) és 270°-os (jobbra) beállításai mellett.



3. **Ábra.** *E. coli* fermentációk NIR (balra) és FT-NIR (jobbra) spektrumainak változása a művelet során.



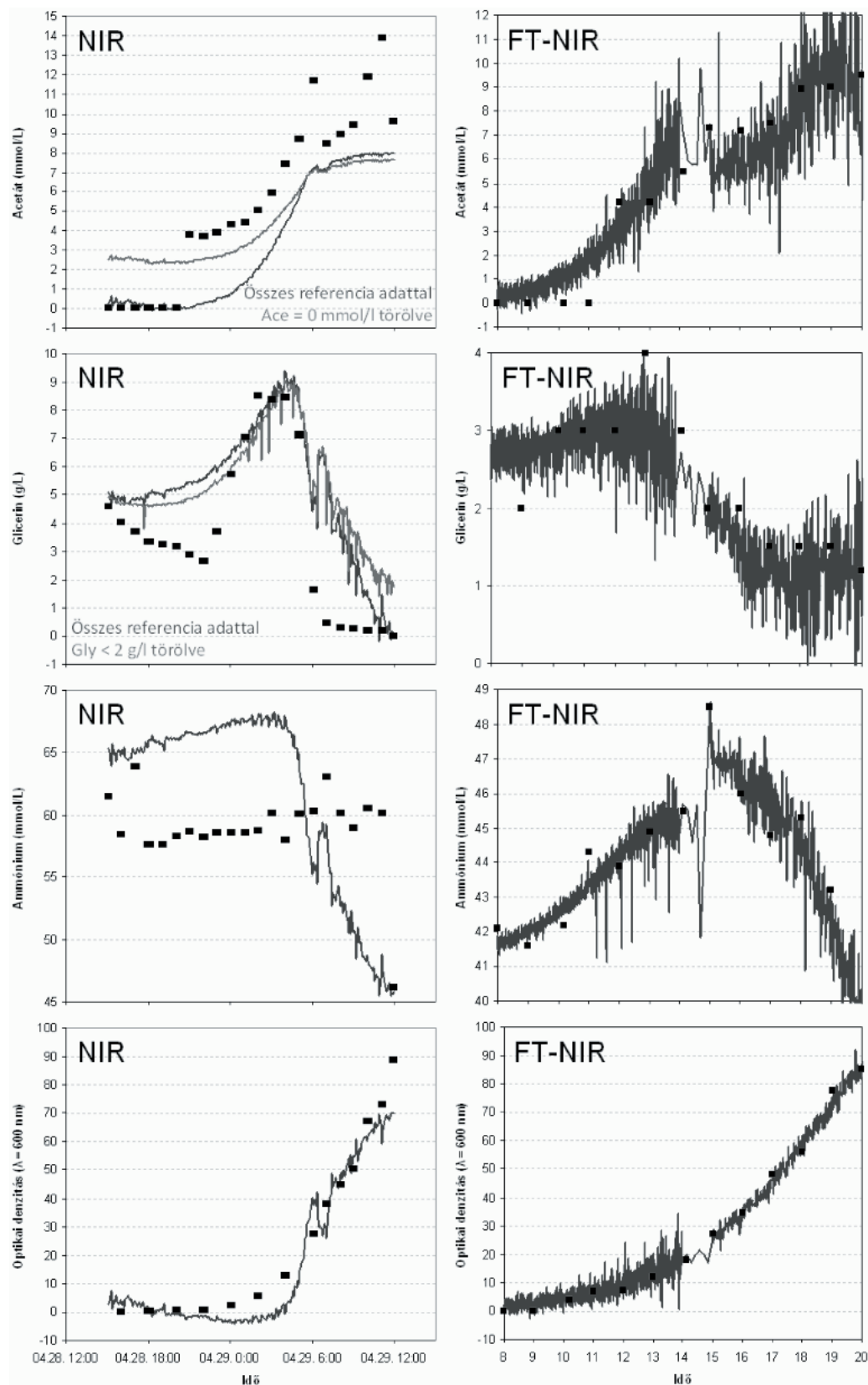
4. **Ábra.** A 3. felhangok (800-1100 nm) PCA szóródási ábrái az F1-F4 fermentációk NIR (balra), valamint az F5-F8 fermentációk FT-NIR (jobbra) technikával felvett spektrumai alapján.

A NIR spektrumok a kémiai, molekuláris információk mellett fizikai tulajdonságokat is hordozhatnak, tükrözhetnek. Ilyenek lehetnek az anyagok szemcsemérete, felületi tulajdonsága, homogenitása stb.

A2. ábrán egy glicerín-víz modell rendszer látható száloptikás módszerrel követve: a szonda elhelyezés (90°, 270°) és kevertetési sebesség (400-2000 fordulat/perc) hatásait mutatjuk be. A fermentációs műveletek során képződő

buborékok (képződés helye, nagysága, leszakadásuk) jelentősen befolyásolják a spektrum pontosságát, jel/zaj viszonyait. A bemutatott eredmény szerint, bármely

fordulatszám alkalmazása mellett a 270°-os szonda elhelyezés megfelelőbb, itt észlelhető a legalacsonyabb, keverés okozta „spektrumzaj”, vagyis a mérési feltételek optimalizálásában is segítségünkre van.



5. Ábra. *E. coli* fermentációk esetén az acetát, a glicerín, az ammónium koncentráció és az optikai denzitás időbeli változásának monitorozása NIR (balra) és FT-NIR (jobbra) technikával (—) és referencia adatokkal (■).

Négy-négy párhuzamos *E. coli* fermentációt végezve a folyamatok időbeli lefutását vizsgáltuk száooptikával ellátott diszperziós és Fourier-transzformációs (FT) NIR spektrométerek alkalmazásával, mely eredményeit a 3. ábrán mutatjuk be. Mindkét technika alkalmazása jól szemlélteti a fermentációs sarzsok óriási változékonyságát a művelet során. Ezen spektrumok PCA feldolgozásával a főkomponensek időbeli változását szemléltetjük a 4. ábrán. A párhuzamos fermentációk esetén (F1-F4 és F5-F8) kialakult trajektóriák hasonlósága jól megfigyelhető.

Ezen eredmények alapján érzékelhető, hogy a kizárólag spektrumváltozásokat elemző módszerrel képesek vagyunk a fermentációs folyamatot monitorozni, és szükség esetén a folyamatba beavatkozni.¹²

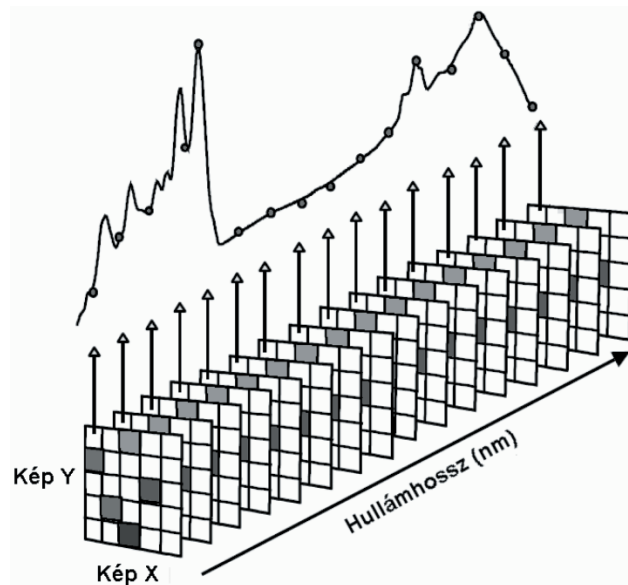
A fermentációk során párhuzamosan gyűjtött referencia adatok (mért kémiai, fizikai, fiziko-kémiai stb. paraméterek) felhasználásával, vagyis az optikai (spektrum) és referencia adatok összefüggéseinek meghatározása révén (a kalibráció és validálás lépéseit alkalmazva), olyan kvantitatív mérési módszerek alakíthatók ki, amelyek egyetlen spektrum felhasználásával az összes kalibrált paraméter meghatározására alkalmas lehet. Az 5. ábra *E. coli* fermentáció során detektálható acetát, glicerin, ammónium koncentráció és optikai denzitás paraméterek változásait mutatja a fermentáció során, diszperziós NIR és FT-NIR módszerek alkalmazása mellett. A spektrumok alapján prediktált, kvázi folyamatos koncentráció értékek mellett a pontszerűen ábrázolt referencia mérések adatai és tendenciái azt jelzik, hogy a NIR és FT-NIR módszerek egyaránt alkalmasak a fermentációs folyamatok kvantitatív monitorozására.¹³

Az infravörös spektroszkópia, annak különböző frekvencia tartományai (közele, ill. közép – analitikai – infravörös) egyaránt alkalmasak anyagazonosítási célokra. Ilyen célú használat esetén a spektrumkönyvtárak felépítését követő validálását követően nyílik lehetőség a csak spektroszkópiai információ alapján való azonosításra.¹⁴ A spektrumkönyvtárak használata során kétféle választ kaphatunk a vizsgált anyagra vonatkozóan:

- mi minőségileg a vizsgált anyag – vagyis azonosítjuk a spektrum hasonlóság alapján;
- mennyire hasonlít a könyvtárunkban hasonló, azonosított (standard) anyagokhoz – vagyis minőségileg mennyire tér el azoktól.

Az általunk felépített, gyógyszeripari célokat szolgáló könyvtár 65 különféle anyag összesen 390 tételét tartalmazza. A könyvtár dinamikus bővítésével (majd újra validálásával) fontos analitikai igény elégíthető ki és nagyszámú „nedves kémiai” analízis takarítható meg.

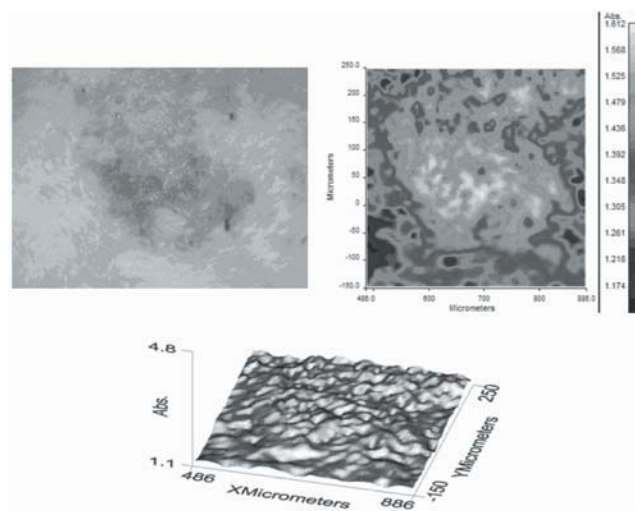
A gyógyszeripari és egyéb (biológiai, fiziológiai, orvosi stb.) területeken széleskörűen terjednek a közeli infravörös spektroszkópiai alapú képalkotó eljárások. A NIR alapú képalkotás során egy szokásos kétdimenziós mikroszkópos elemi képmezőben (képpontban), harmadik dimenzióképpen NIR spektrum kerül felvételre, amint azt a 6. ábra mutatja.¹⁵ Az általunk használt PerkinElmer Spotlight 400 FT-NIR mikroszkóp esetén a jellemző elemi képmező (pixel) méret $6,25 \mu\text{m} \times 6,25 \mu\text{m}$. Amennyiben egy $625 \mu\text{m} \times 625 \mu\text{m}$



6. Ábra. A „spektrális hiperkocka”.

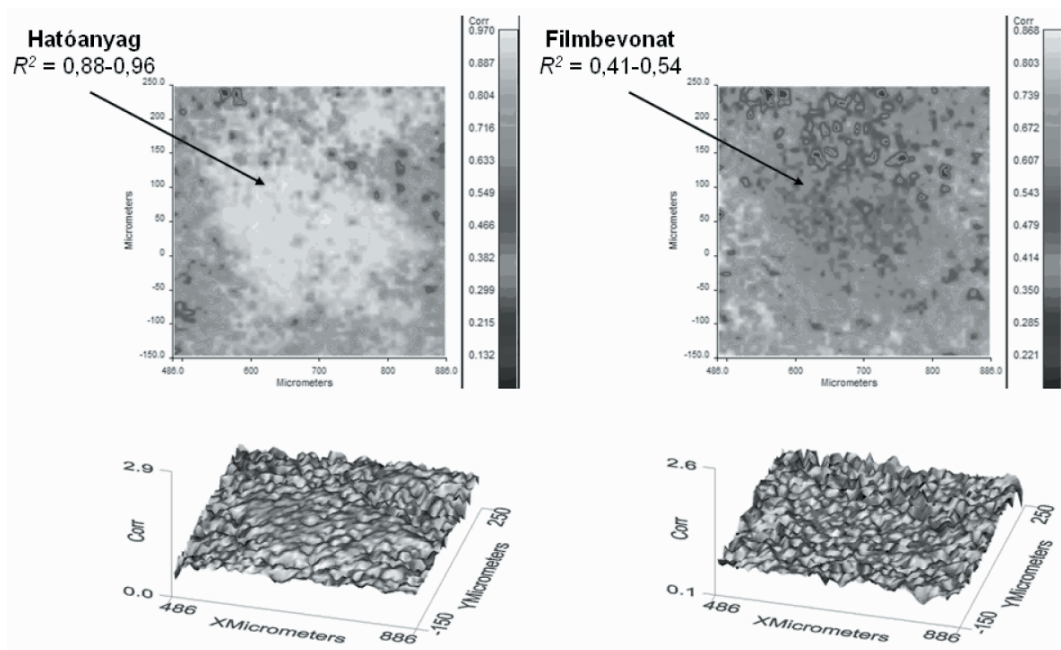
méretű képmezőt elemzünk, ez $100 \times 100 = 10\,000$ képpontot jelent, amelybe rendszerint 128 párhuzamos spektrum átlagolásával veszünk fel spektrumokat, ami végeredményben óriási mennyiségű adat feldolgozását igényli. A méréssel kialakuló, jellemzően háromdimenziós, hamis színezésű képek kiválóan alkalmasak a vizsgált objektumban található anyagok eloszlásának, homogenitásának vizsgálatára.

A következőkben két jellemző alkalmazási példán át mutatjuk be a képalkotó eljárás eredményét és előnyeit.

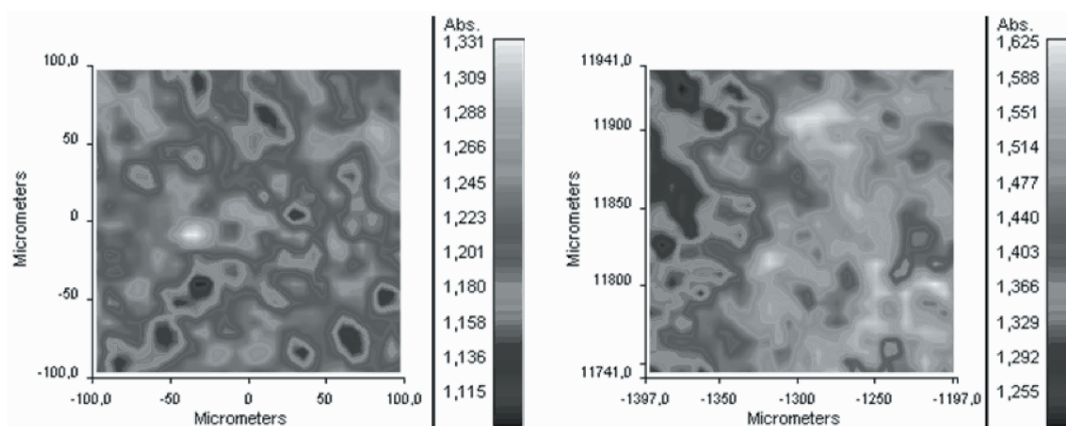


7. Ábra. A tabletta vizsgált területének mikroszkópos, szűrkeskálázott képe (középen a hibát okozó folttal), valamint 2D és 3D ábrázolása az átlagos abszorbancia értékek alapján.

Egy technológiai probléma során a tabletták felszínén elszíneződő foltosságot tapasztaltak, aminek okát kerestük. A 7. ábrán látható $400 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$ méretű képmezőről $6,25 \mu\text{m} \times 6,25 \mu\text{m}$ -es képpont mérettel $64 \times 64 = 4096$ képpontban, képpontonként 128 spektrumot átlagolva NIR képeket készítettünk hamis színezéssel. Mindkét képtípuson jól látható a folt és környezetének kémiai minőség szempontjából való különbsége. Két, ill. háromdimenziós



8. Ábra. A tabletta vizsgált területének 2D és 3D ábrázolása a hatóanyag (balra) és a filmbevonat (jobbra) spektrumaival kapott korrelációk során számított R^2 értékek alapján.



9. Ábra. A valódi (balra) és a hamisított (jobbra) tabletták vizsgált területének 2D ábrázolása az átlagos abszorbancia értékek alapján.

korrelációs térképeket készítettünk egyrészt a tabletták hatóanyagára, másrészt a bevonó anyag spektrumainak felhasználásával. Az eredményeket a 8. ábra mutatja be. A hatóanyaggal kapott korrelációs együttható $R^2 = 0,88-0,96$ között változott, ugyanezen érték a bevonó anyag esetén $R^2 = 0,41-0,54$ volt. Az eredmények tehát egyértelműen mutatják, hogy a „folt” a bevonó anyag hiányára utal, ami támpontot nyújthat a technológusok számára a bevonási művelet módosítását illetően.

A képkalkulációs eljárások megkönnyíthetik a tablettahamisítások kimutatását is. A valódi és hamisított tabletták gyakran vizuálisan nem vagy alig különböztethetők meg, esetleg a durvább szemcsészettség vagy felületi tulajdonságok utalnak a hamisításra. A NIR képkalkulációs eljárással azonban a kémiai és fizikai változékonyságba képesek vagyunk közvetlenül „betekinteni”. A 9. ábrán egy eredeti és egy hamisított tabletták képrészletét mutatjuk be. Míg az eredeti készítményben kisebb, elkülönülő csoportokban egyenletesen oszlanak el a különféle anyagok (hatóanyag, töltőanyag, hordozó), a hamisított készítményben az anyagok durva, egyenetlen eloszlását, erős

inhomogenitást tudunk kimutatni. A kimutatott különbségek a spektrumok abszorbancia értékei alapján is egyértelműek, ennél finomabb különbségtételt tesz lehetővé, ha a képeket a spektrumok főkomponens analízise után ábrázoljuk.

A fenti példák és alkalmazások azt jelentik, hogy a spektrum tulajdonságok és más kémiai, ill. fizikai módszerekkel mért anyagtulajdonságok között ok-okozati összefüggések vannak, vagy lehetnek. Ezen összefüggések feltárásában a különféle adatelemző, kemometriai módszerek alkalmazása révén eddig nem ismert, új felismerések tehetők.

Összefoglalóan elmondható tehát, hogy a különféle közeli infravörös spektroszkópiai módszerek (NIR, FT-NIR, NIR imaging) alkalmasak a klasszikus és biotechnológiai alapú gyógyszer-előállítás során:

- roncsolásmentes módon fermentáció, anyagazonosítás, homogenitás és bevonat vizsgálat, hamisítás, visszafelé ellenőrzés, csomagolóanyagok vizsgálatára;
- gyors, perces nagyságrendben képezhető jelsorozatok készítésére;

- rejtett, eddig fel nem ismert információk kiaknázására (adatbányászat, technológiai oknyomozások);
- gyors visszacsatolásra a technológiába, minőség-ellenőrzésbe, minőségbiztosításba.

A fenti tulajdonságok okán a közeli infravörös spektroszkópiai/mikroszkópiai módszereket az FDA mint „alternatív” módszereket elfogadja. A fenti technikák elsősorban adatfeldolgozási, kemometriai szempontból erősen tudás-intenzív módszerek. A felhasználók szempontjából a gyorsaságon túl talán legnagyobb előnye a módszereknek a rendkívül jó költséghatékonyság és nagy „áteresztőképesség”.

Összefoglalás

A közeli infravörös (NIR) spektrumok a molekuláris állapotváltozások összességéként, mint kémiai és fizikai „ujjlenyomatok” értelmezhetőek. A spektrumok valós információtartalmát azonban nem mindig egyszerű felismerni, a bennük rejlő hordozott információkat gyakran különféle transzformációs és kemometriai módszerek alkalmazásával lehet hatékonyan kinyerni.

A biotechnológiai és gyógyszeripari gyakorlatban azért van szükségünk ezen matematikai, kemometriai módszerek egyre kifinomultabb használatára, mert nagyon gyakran egyedül csak a spektrum áll rendelkezésünkre információforrás a vizsgált objektumokról. Vizsgálataink során bakteriális fermentációs folyamatok minőségi változásait követtük, monitoroztuk hatékonyan on-line NIR mérőszondás módszerrel. NIR és FT-NIR alapú mérőmódszerek alkalmazásával a fermentációs folyamatok során elfogyó, átalakuló és képződő anyagok (szubsztátum, intermedier, metabolit, sejttömeg) kvantitatív meghatározásra alkalmas kalibrációkat fejlesztettünk és validáltunk.

NIR mikroszkópiai képalkotó eljárásokat alkalmaztunk tabletta termékek homogenitásának vizsgálatára, ellenőrzésére és bemutattuk ezen vizsgálati technika alkalmazhatóságát a hamisítások kimutatásában.

Abstract

Near infrared (NIR) spectra are complex manifestation of molecular vibrations and as chemical and physical „fingerprint of molecules can be interpreted. The recognition of real information content in spectra is often not easy, in order to extract the information effectively different transformation and chemometric procedures can be used.

Effective chemometric methods needed in pharmaceutical and biotechnological practices even because the spectrum is the only source of information input. Bacterial fermentations were effectively monitored qualitatively using on-line fiber optic probes.

A közeli infravörös spektroszkópiai és mikroszkópiai módszerek gyorsaságuk, roncsolás-mentes jellegük és nagy információ tartalmuk valamint áteresztőképességük miatt a gyógyszer előállítás és ellenőrzés hatékony, perspektivikus mérés technikái.

Hivatkozások

1. McClure, W.F. *J. Near Infrared Spectrosc.* **2003**, *11*, 487–518.
2. Davies, A.M.C. *NIR news* **2005**, *16*, 9–11.
3. Savitzky, A.; Golay M.J.E. *Anal. Chem.* **1964**, *36*(8), 1627–1639.
4. Norris, K.H. *Extracting information from spectrophotometric curves. Predicting chemical composition from visible and near-infrared spectra. In Food Research and Data Analysis*, Ed by Martens H., Russwurm H. Jr., Applied Science Publishers Ltd: Barking **1983**, pp. 95–113.
5. Martens, H.; Jensen, S.A.; Geladi, P. *Multivariate linearity transformations for near-infrared reflectance spectrometry. In Proceedings from Nordic Symposium on Applied Statistics*, Stokkand Forlag Publishers, Stavanger **1983**, pp. 205–233.
6. Geladi, P.; MacDougall, D.; Martens, H. *Appl. Spectrosc.* **1985**, *39*, 491–500.
7. Mahalanobis, P.C. *Proc. Natl. Acad. Sci., India* **1934**, *2*, 49–55.
8. Kaffka, K.J.; Gyarmati, L.S. *J. Near Infrared Spectrosc.* **1998**, *6*, A191–A200.
9. Kaffka, K.J.; Seregély, Zs. *Acta Aliment. Hung.* **2002**, *31*, 3–20.
10. Martens, H.; Næs, T. *Multivariate calibration*, John Wiley & Sons Ltd: Chichester, **1991**.
11. Salgó, A.; Gergely, S. *J. Cereal Sci.* **2012**, *56*, 31–38.
12. Gergely, S.; Párta L.; Salgó A. *Monitoring of fermentation broths operated with E. coli cells—what is measured by near infrared spectroscopy? In Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 14th International Conference*, Ed by Saranwong S., Kasem-sumran S., Thanapase W., Williams P., IM Publications LLP, ISBN 978-1-906715-03-8, pp. 735–739 (**2010**).
13. Párta, L.; Gergely, S.; Salgó, A. *Pioneer experiences on PAT implementation of pharmaceutical biotech process development. In Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 15th International Conference* (in press).
14. Blanco, M.; Villar, A. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2003**, *92*, 823–830.
15. Lewis, E.N.; Carroll, J.E.; Clarke, F. *NIR news* **2001**, *12*, 16–18.

Quantitative calibration equations were developed and validated for testing source/sink effects of materials (substrate, intermedier, metabolite, optical density) during fermentation procedure.

NIR microscopy as imaging technology was used in the detection of material's homogeneity of tablets as well as in finding and demonstration of adulteration.

Based on the fast, non-destructive and high throughput character of these techniques the NIR spectroscopic and microscopic technologies are efficient and perspective methods can be used in production and quality control of pharmaceutical products.