

Povzetek

Razvoj metode kromatografske metode pogosto vključuje pristop poskusov in napak, dokler ne dosežemo zastavljenih kriterijev. Prednost takšnega načina je razvoj ustrezne metode v sorazmerno kratkem času. Pomanjkanje sistematičnega pristopa pa nas lahko vodi v lokalni optimum s slabim poznavanjem kritičnih parametrov, ki vplivajo na ločevanje. To močno ovira našo zmožnost odpravljanja težav, kadar učinkovitost metode pade iz sprejemljivega obsega. Nasveti strokovnjakov na podlagi izkušenj iz kromatografije lahko rešijo številne težave, ki se pojavijo pri ločevanju na koloni z enim samim načinom zadrževanja. Na žalost takšno znanje ne zadošča za dešifriranje optimalne poti za pravilno ločitev na stacionarni fazi z mešanim režimom. Prisotnost več mehanizmov zadrževanja v kombinaciji z zelo zapletenimi molekulami, kot so beljakovine in druge biomolekule, onemogoča takšne napovedi. Za take primere lahko optimizacijo dosežemo z metodo vgrajene kakovosti (*angl.* Quality by Design). Zato je cilj te študije spoznati in razumeti vodilne dejavnike pri razvoju tovrstnih separacijskih metod. Naše delo se je začelo s pregledom najprimernejših kemijskih lastnosti stacionarnih faz za ločevanje sedmih variant inzulina, ki se pogosto uporabljajo pri zdravljenju diabetesa mellitusa. Pred optimizacijo sestave mobilne faze in gradientov vsebnosti acetonitrila, koncentracije pufru in pH smo se osredotočili na vpliv temperature in tlaka, ki sta pogosto zanemarjena dejavnika na učinkovitost ločevanja. Te učinke smo preučevali ločeno na ustreznih kolonah z enim mehanizmom zadrževanja, da smo izsledke lahko uporabili na koloni z anionsko izmenjevalnim in reverznofaznim mehanizmom ločevanja. Vpliv temperature na ločevanje inzulina je nasproten učinku majhnih molekul na obeh kolonah do 55 °C. Pri višji temperaturi poteka ločevanje inzulina na anionsko izmenjevalni koloni podobno kot prej, na reverznifazi pa se zadržuje kot majhna molekula. Vpliv tlaka smo opazili le na RP koloni in koloni z mešanimi režimi. V teh primerih se je zadrževanje inzulinov znatno povečalo, tudi ko se je tlak pri vstopu v koloni povečal za 100 barov. Na zadrževanje majhnih molekul je bil vpliv tlaka precej manjši. Tega niso opazili pri ločevanju na anionsko izmenjevalni koloni zaradi nenedenaturirajoče mobilne faze in s tem stabilnosti molekule inzulina. Ta učinek tlaka na anionsko izmenjevalni koloni smo nadalje preučevali z modelnimi molekulami (oligonukleotidi različnih dolžin), večjimi beljakovinami (BSA in tiroglobulin) in molekulo plazmidne DNA. Opazili smo znatno povečanje zadrževalnega časa pri izokraskih in gradientnih ločbah, kar je bilo odvisno od velikosti in fleksibilnosti molekul. Za raziskovanje adsorpcijskega mehanizma smo ta ločevanja opisali z uporabo modelov stehiometrične izmenjave in linearne gradientne elucije. Razvili smo model odvisnost porazdelitvene konstante od tlaka in ionske jakosti, z odvajanjem tega pa smo izračunali spremembe parcialnega molskega volumna. Analiza izračunanih parametrov je pokazala kompresijo makromolekul proti stacionarni fazi ob adsorpciji, česar posledica je več interakcij s stacionarno fazo.

Na koncu smo izvedli še sistematično študijo vpliva sestave mobilne faze na učinkovitost ločevanja sedmih variant inzulina in dveh pomožnih snovi na koloni z mešanimi režimi. Poleg tega smo razvili postopek čiščenja SPE za odstranjevanje motenj, prisotnih v formulacijah. Razvili smo dve metodi ločevanja, vsaka primerna za ločevanje devetih molekul na HPLC sistemih z binarnim ali kvartarnim sistemom za dovajanje topila. Metode omogočajo kvantificiranje človeškega inzulina in šestih najpogosteje uporabljenih terapevtskih analogov v formulacijah ali farmacevtskih surovinah.