



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar

Hőhatásnak kitett emlőssejtes tápoldatporok vizsgálata infravörös spektroszkópiai- és preparatív, lombikos minősítési módszerekkel

Szabó Éva

Biomérnök szakos hallgató

MSc II. évfolyam

Témavezető: **Dr. Gergely Szilveszter** egyetemi docens
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Konzulens: **Párta László** csoportvezető
Zalai Dénes kutató-fejlesztő
Richter Gedeon Nyrt., Biotechnológiai Osztály, Upstream csoport

TDK dolgozat
Budapest, 2014

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
Az ábrákon alkalmazott jelölések.....	5
1. Bevezetés és célkitűzés.....	6
2. Irodalmi áttekintés	8
2.1. Fehérje alapú biotechnológiai gyógyszerhatóanyagok.....	8
2.2. A rekombináns fehérje termelésben felhasznált tápoldatok	9
2.3. A PAT fontossága a biotechnológiai termelésben.....	11
2.3.1. A PAT-hoz kapcsolódó analitikai eszközök	13
2.4. Az infravörös spektroszkópia	15
2.4.1. Az infravörös spektroszkópia elméleti háttere	15
2.4.2. Az infravörös spektrométer	15
2.4.3. Az infravörös spektroszkópia alkalmazása a gyógyszeriparban, mint lehetséges PAT eszköz	17
3. Anyagok és módszerek.....	20
3.1. A vizsgált minták előkészítése	20
3.1.1. Kísérletterv.....	20
3.1.2. Minták hőkezelése	21
3.2. Referencia vizsgálatok.....	22
3.2.1. Sejtek tenyésztése rázatott lombikokban	22
3.2.2. A referencia eredmények feldolgozása	23
3.3. Infravörös spektroszkópiai mérések.....	24
3.3.1. Diszperziós, látható és közeli infravörös tartományú mérések (VIS-NIR)	24
3.3.2. Fourier-transzformációs, közeli infravörös tartományú mérések (FT-NIR).....	25
3.3.3. Fourier-transzformációs, közép infravörös tartományú mérések (FT-IR).....	26
3.3.4. A spektroszkópiai adatfeldolgozáshoz felhasznált szoftverek	27
3.4. Alkalmazott matematikai eljárások.....	27
3.4.1. Spektrum előkezelések	27
3.4.1.1. Normálások	28
3.4.1.2. Simítással kombinált deriváltak.....	29
3.4.2. A spektrumok minőségi értékelése.....	31
3.4.2.1. Klaszteranalízis (CA)	31
3.4.2.2. Főkomponens-analízis (PCA)	33

3.4.3.	A spektrumok mennyiségi értékelése (PLS).....	34
4.	Eredmények és értékelések.....	36
4.1.	Az előkísérletek eredményei.....	36
4.2.	Referencia eredmények kiértékelése.....	40
4.2.1.	A hőkezelés során tapasztalható tömegváltozás értékelése.....	40
4.2.2.	Az elősejt-koncentráció változásának értékelése.....	42
4.2.3.	A termelt rekombináns fehérje koncentrációjának értékelése.....	45
4.3.	Spektrális adatok kiértékelése.....	49
4.3.1.	A diszperziós VIS-NIR készülék Si detektorának régiójában kapott spektrumok kiértékelése (400–1100 nm).....	49
4.3.2.	A diszperziós VIS-NIR és az FT-NIR spektrométerrel kapott NIR spektrumok elemzése (1100–2500 nm).....	51
4.3.3.	Az FT-IR spektrumok elemzése (4000–650 cm ⁻¹).....	54
4.3.4.	A tápoldatpor minták spektrumainak minőségi elemzése.....	56
4.3.4.1.	A klaszterelemzés eredményei.....	57
4.3.4.2.	A főkomponens-analízis eredményei.....	61
4.3.5.	A PLS kalibrációk értékelése.....	66
5.	Összefoglalás.....	77
6.	Irodalomjegyzék.....	79

Melléklet

Rövidítések jegyzéke

ANOVA	<i>analysis of variance</i>	varianciaanalízis
API	<i>active pharmaceutical ingredient</i>	hatóanyag
ATR	<i>attenuated total reflectance</i>	gyengített teljes reflexió
CA	<i>cluster analysis</i>	klaszteranalízis
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>	kínai hörcsög petesejt
CQA	<i>critical quality attribute</i>	kritikus minőségi jellemző
DoE	<i>design of experiments</i>	kísérlettervezés
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i>	differenciális pásztázó kalorimetria
FIR	<i>far-infrared</i>	távoli infravörös
FT	<i>Fourier transform</i>	Fourier-transzformáció
IgG	<i>immunoglobulin G</i>	G típusú ellenanyag
IVC	<i>integral of viable cell</i>	élő sejtek integrált összege
LOD	<i>limit of detection</i>	kimutatási határ
mAb	<i>monoclonal antibody</i>	monoklonális antitest
MIR	<i>mid-infrared</i>	közép infravörös
MLR	<i>multiple linear regression</i>	többszörös lineáris regresszió
MSC	<i>multiplicative scatter correction</i>	többszörös szóródás korrekció
MVDA	<i>multivariate data analysis</i>	sokváltozós adatelemzés
NIR	<i>near-infrared</i>	közeli infravörös
PAT	<i>process analytical technologies</i>	folyamatelemző technológiai eljárások
PCA	<i>principal component analysis</i>	főkomponens-analízis
PLS	<i>partial least squares</i>	részleges legkisebb négyzetek
QbD	<i>quality by design</i>	minőségközpontú fejlesztés
R	<i>Pearson's correlation coefficient</i>	Pearson-féle korrelációs koefficiens
RMSE	<i>root-mean-square error</i>	átlagos hiba négyzetösszeg
RPD	<i>residual predictive deviation</i>	relatív korrigált tapasztalati szórás
SNV	<i>standard normal variate</i>	standard normál változó
UV	<i>ultraviolet</i>	ibolyántúli
VIS	<i>visible</i>	látható

Az ábrákon alkalmazott jelölések

Az *Eredmények és értékelések* fejezetben valamint a *Mellékletben* egységes színeket, szimbólumokat és rövidítéseket alkalmazok az egyes minták jelölésére a bemutatott spektrumokon, CA dendrogramokon és PCA *score plot* ábrákon.

<i>vonal színe</i>	<i>szimbólum</i>	<i>hőkezelés</i>	<i>rövidített jelölés</i>
	+	30 °C, 1 h	30.01
	○	30 °C, 7 h	30.07
	▲	30 °C, 13 h	30.13
	+	50 °C, 1 h	50.01a, 50.01b, 50.01c
	○	50 °C, 7 h	50.07
	▲	50 °C, 13 h	50.13
	+	70 °C, 1 h	70.01
	○	70 °C, 7 h	70.07
	▲	70 °C, 13 h	70.13
	◇	Kontroll minták	Ka, Kb, Kc

1. Bevezetés és célkitűzés

A biotechnológia és az orvostudomány fejlődésének köszönhetően az elmúlt évtizedben előtérbe kerültek olyan nagymolekulás gyógyszerhatóanyagok, melyekkel eddig nehezen gyógyítható vagy gyógyíthatatlannak hitt betegségek kezelése vált lehetségessé. A terápiás célokra termelt fehérjék, köztük a monoklonális antitestek (mAb-ok) a gyógyszeripar feltörekvő, mind gyógyászati, mind ipari szempontokból nagy lehetőségekkel kecsegtető ágát képviselik.

A rekombináns fehérjék jelentős része olyan polipeptid, mely bonyolult poszttranszlációs módosításokat követően nyeri el aktív formáját. Az ilyen hatóanyagok termeltetése legtöbb esetben csak emlős sejtvonalakkal valósítható meg, melyek érzékenyek a környezeti változásokra: a hőmérséklet, a pH, a tápanyagok és metabolitok szintjének ingadozása mind befolyásolhatja a végtermék koncentrációját. A biotechnológiai úton előállított hatóanyagok gyártása során összetett tápoldat biztosítja a sejtek számára a szükséges fiziológiás környezetet. A felhasznált alapanyag kiválasztása és ellenőrzése különösen nagy odafigyelést igényel, hiszen egy rossz összetételű vagy nem megfelelő minőségű tápközeg jelentős anyagi veszteséget okozhat.

Kísérleteim fő célja az volt, hogy meghatározott hőmérsékletű és időtartamú kezelések tápoldatporra gyakorolt hatását vizsgáljam. A témát egy gyógyszeripari szakemberek számára rendezett konferencián elhangzottak ihlették, miszerint a gyártók és a vásárló közötti út során a készítmény nem várt hőhatásokat szenvedhet. A por jellegű tápoldat alapanyagok többsége 2–8 °C közötti tárolást igényel, de eme feltétel teljesülését a szállításuk során csak az esetek kis részében követik, így az áthelyezések és nem tervezett raktári elhelyezés vagy reptéri várakoztatás során ért felmelegedés a felhasználó előtt rejtve marad.

Ezért TDK munkám keretein belül kínai hörcsög petesejtekkel (CHO) végzett fermentációknál felhasznált tápoldatporokat vizsgáltam, hogyan reagálnak különböző időtartamú és hőmérsékletű hőhatásokra. Az ilyen módon kezelt minták felismerésében, elkülönítésében a látható (VIS) és közeli infravörös (NIR) tartományú diszperziós, valamint közeli és közép (analitikai) infravörös tartományú Fourier-transzformációs (FT-NIR/FT-IR) spektrofotométerek felhasználási lehetőségeit tanulmányoztam.

Főbb célkitűzéseink:

- a kísérlettervezést (DoE) felhasználva előkísérletek eredményein nyugvó hőkezelés-sorozat megtervezése és végrehajtása;

- a hőkezelésnek kitett minták vizsgálata VIS-NIR, illetve FT-IR és FT-NIR spektrofotométerekkel, a mintacsoportok közötti spektrális különbségek feltérképezése, a hőhatásnak kitett tápoldatpor felismerésére alkalmas infravörös spektroszkópiás módszer kifejlesztése;
- megvizsgálni, milyen hatásokat gyakorol a hőkezelés a CHO sejtek kezdeti növekedési sebességére és a termelt rekombináns fehérje koncentrációjára a mintákból készített tápoldatokban;
- a spektrális különbségek korreláltatása a referencia módszerek eredményeivel a hőkezelés okozta változásra irányuló mennyiségi kalibráció létrehozása érdekében.

2. Irodalmi áttekintés

2.1.Fehérje alapú biotechnológiai gyógyszerhatóanyagok

A biogyógyszerészeti ipar az elmúlt két évtizedben rendkívüli fejlődésen ment keresztül, melyet a rekombináns DNS és hibridóma technológiák tettek lehetővé. Az egykori, természetes forrásból kinyert gyógyászati fehérjék tárháza kiegészült a mesterségesen megalkotott, speciális proteinekkel, melyek számos betegség kezelésében megoldást jelenthetnek.

Az első forgalomba hozott és terápiában alkalmazott rekombináns fehérje, a rekombináns inzulin megjelenése óta (1982) számos új gyógyászati fehérje jelent meg, melyek farmakológiai hatásuk szerint négy csoportot alkotnak [1]:

- enzimatis vagy szabályozó aktivitású fehérjék,
- speciális célzott aktivitással rendelkező fehérjék,
- vakcinációs proteinek,
- diagnosztikai felhasználású fehérjék.

A monoklonális antitestek (mAb-ok) a célzott aktivitással rendelkező gyógyászati fehérjék csoportjába sorolhatóak be. A tumorok sejtfelszíni marker fehérjéire specifikus mAb-okkal különböző rákbetegségek gyógyítása válik lehetségessé – ezen belül a B-sejtes leukémiák kezelésében fontos CD20 antitestek bizonyulnak legelterjedtebbnek –, a gyulladásos folyamatok bizonyos mediátoraira specifikus antitestek pedig az autoimmun kórképek terápiájában alkalmazhatóak. Létezik már patogén specifikus rekombináns IgG is: az FDA által 2012-ben engedélyezett *raxibacumab* az inhalált *Bacillus anthracis* fertőzés profilaxisában használják. [1, 2]

2009-2012 között a mAb piac méretének számított növekedési aránya elérte a 13%-ot, mely magasabb, mint a biotechnológiai gyógyszerkészítmények teljes piacára ebben az időszakban számított érték. Az új generikus készítmények megjelenési gyakorisága és a kereslet erőssége alapján gazdasági szakértők a monoklonális antitestek piacának további 12%-os növekedési arányára számítanak 2013-2017 között, így 2017-re elérheti a 141 milliárd USD értéket. Az ipar szempontjából jelenleg Európa a vezető kontinens. 6 vezető készítményének (Infliximab, Etanercept, Bevacizumab, Rituximab, Adalimumab, Trastuzumab) forgalmazása 2012-ben 45 milliárd USD értékben teljesített, ami a globális

forgalom 57,7%-a. A monoklonális antitest iparának növekedési arányai arra utalnak, hogy 2017-re Kína előtérbe kerülése várható. [3]

A rekombináns fehérjék gyógyászati felhasználásának elterjedését mutatja, hogy 2013-ban a legnagyobb értékben eladott gyógyszerek listáján az első nyolc helyezett közül hét, továbbá az első 15 hely közül nyolc készítmény biotechnológiai termék. [4] E nyolc vezető biogényszer hatóanyagát, jellegét és 2012-2013-as eladási forgalmát is mutatja az 1. táblázat.

1. táblázat: A 2013-as év legmagasabb eladási értékeit elérő gyógyszerkészítmények listája. [5 6]

Készítmény (hatóanyag)	Típus	2012-es eladás (milliárd USD)	2013-as eladás (milliárd USD)
Humira (adalimumab)	Mab	9,27	10,66
Enbrel (etanercept)	Fehérje	7,97	8,74
Lantus (insulin glargine)	Peptide	6,12	7,59
Rituxan (rituximab)	Mab	7,05	7,50
Remicade (infliximab)	Mab	6,56	6,96
Avastin (bevacizumab)	Mab	6,06	6,75
Herceptin (trastuzumab)	Mab	6,19	6,56
Gleevec (imatinib)	Kismolekulás	4,72	4,69
Neulasta (pegfilgrastim)	Fehérje	4,09	4,39
Copaxone (glatiramer acetate)	Fehérje	4,00	4,36
Revlimid (lenalidomide)	Kismolekulás	3,77	4,28

2.2. A rekombináns fehérje termelésben felhasznált tápoldatok

A biogényszereket rekombináns úton állítják elő baktérium, élesztő, rovar vagy emlős sejtek segítségével. Mivel a fehérjék jelentős része bonyolult poszttranszlációs módosításokat követően nyeri el aktív formáját, termelésük sokszor csak emlős sejtvonalakkal valósítható meg. A négy polipeptid egységből felépülő, diszulfid-híddal és cukor oldalláncokkal is rendelkező mAb-ok fermentációja leggyakrabban kínai hörcsög petesejt (CHO) és egér mielóma (NS0, Sp2/0) sejtvonalakkal történik, melyek érzékenyek a tenyésztés és termeltetés körülményire. Az alkalmazott tápoldatokban reprodukálni kell ezen sejtek természetes környezetét.

Harry Eagle 1955-ben publikálta emlőssejtek fenntartására kifejlesztett tápközegét, mely későbbiekben alapjául szolgált több kiegészített, fejlesztett médium létrehozásához.

Ilyenek a szintén Eagle által előállított MEM (Minimal Essential Medium), Ham és Waymouth fejlesztésein alapuló MCDB médiumok és a Dulbecco-féle DMEM. A fejlesztések során a komponensek száma jelentősen megnőtt. Míg a MEM oldatot összesen 6 szervetlen só, 13 aminosav, 6 vitamin és 4 egyéb összetevő (köztük D-glükóz) alkotja, a nyolcvanas években publikált médiumokban (pl. RPMI, RDA) már 40-50 különböző kismolekulás vegyület található. [7, 8]

2. táblázat: CHO sejtvonal számára kifejlesztett szérums- és fehérjementes tápközeg összetétele. [9]

Component	Specific concentration (mg/l)	Molar concentration (mM)
Inorganic salts		
CaCl ₂	211.288	1.90
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0012	4.81×10^{-6}
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.3336	1.20×10^{-3}
KNO ₃	0.0912	9.02×10^{-4}
KCl	485.44	6.51
MgCl ₂	22.888	0.24
MgSO ₄	117.204	0.576
NaCl	3039.6	52
NaHCO ₃	4099.2	48.8
Na ₂ HPO ₄	56.816	0.4
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	150	1.25
Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O	0.02601	9.89×10^{-5}
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.3452	1.20×10^{-3}
Carbohydrates		
D-Glucose	6120.8	34
L-Amino acids		
L-Alanine	33.56	0.377
L-Arginine-HCl	185.2	0.879
L-Asparagine-H ₂ O	40.084	0.267
L-Aspartic acid	41.32	0.31
L-Cysteine-HCl-H ₂ O	14.048	0.08
L-Cystine-2HCl	109.488	0.349
L-Glutamic acid	95.88	0.652
L-Glutamine	1052.28	7.2
Glycine	39	0.52
L-Histidine-HCl-H ₂ O	58.784	0.28
L-Isoleucine	127.576	0.973
L-Leucine	131.24	1.00
L-Lysine-HCl	189.8	1.04
L-Methionine	37.792	0.253
L-Phenylalanine	81.184	0.491
L-Proline	61.8	0.537
L-Serine	54.6	0.52
L-Threonine	118.76	0.997
L-Tryptophan	20.016	0.098
L-Tyrosine, disodium salt	128.164	0.569
L-Valine	117.48	1.00
Vitamins and miscellaneous compounds		
D-Biotin	0.01852	7.58×10^{-5}
DL-Pantothenic acid, calcium salt	4.992	1.09×10^{-2}
Choline chloride	10.384	7.44×10^{-2}
Ethanolamine	1.22	0.02
Folic acid	5.32	1.21×10^{-2}
Hypoxanthine ^a	13.6	0.1
<i>i</i> -Inositol	15.84	8.79×10^{-2}
Linoleic acid	0.0336	1.20×10^{-4}
Lipoic acid	0.084	4.07×10^{-4}
Methotrexate (MTX) ^b		1×10^{-4} to 0.1
Nicotinamide	4.8148	3.94×10^{-2}
Phenol red	18.48	5.21×10^{-2}
Pluronic F-68 ^c	2000	–
Pyridoxal-HCl	4.8	2.36×10^{-2}
Pyridoxine-HCl	0.0248	1.21×10^{-4}
Riboflavin	0.4952	1.32×10^{-3}
Sodium pyruvate	276	2.51
Thiamine-HCl	4.936	1.46×10^{-2}
Thymidine ^a	3.88	0.016
Vitamin B ₁₂	0.5596	4.13×10^{-4}
Peptones and proteins		
Fetuin ^d	10	–
Insulin	5	–
<i>holo</i> -Transferrin	5	–
Casein peptone soybean flour peptone broth ^e	5000	–

Az emlőssejtek fenntartása és a rekombináns fehérje termeltetése során alkalmazott tápoldatokban az alapvető tápanyagok és puffer-komponenseken kívül szabályozó faktorok és hormonok jelenléte is szükséges, amit legtöbbször állati forrásból származó, szigorúan ellenőrzött minőségű vészérum készítményekkel juttatnak be. A biotechnológiai cégek viszont egyre inkább törekednek, hogy szérummentes tápközegeket állítsanak elő, hiszen ezek összetétele pontosan definiált, a fertőzésveszély csökken, a termelt fehérje izolálása egyszerűbb, így az előállítás is költséghatékonyabb. [10, 11] Egy CHO sejtvonat számára kifejlesztett szérum- és fehérjementes tápközeg összetételét mutatja a 2. táblázat.

A tápoldatok optimalizálása a komponensek mennyisége miatt a kísérleti beállítások nagy számát igényli, csak nagy áteresztőképességű kísérleti eszközökkel megvalósítható. Rouiller *et al.* publikációjában mAb termelő CHO sejtvonat tápközegének optimalizálását végezték. A 47 összetevőt tartalmazó elegy 43 komponensét 3-3 szinten állítva 376 mérési pontos kísérleti tervet követve gyűjtöttek adatokat. A kísérleti keverékeket és a kontroll tápoldatokat 96 lyukú lemezekben, automatizált berendezéseket használva vizsgálták, ahol a kimeneti paramétereket a generációs idő, az összegzett élő sejtmennyiség (IVC) és a termelt antitest koncentráció jelentette. Az eredmények sokváltozós adatelemzését követően megállapították a tápközeg kulcskomponenseit, továbbá előállíthatták az IVC-t és termelt fehérje koncentrációt maximalizáló, optimalizált mixtúrát. [12]

Az utóbbi példa is mutatja, hogy a sejtenyészetekhez hasonló összetett biológiai rendszereknél a körülmények meghatározóak a végkimenetel szempontjából, ezek optimalizálása pedig jelentős idő, munka és pénz befektetésével jár. A biotechnológiai gyárak saját kísérletezés helyett gyakran választanak megbízható alapanyaggyártótól származó, a felhasznált sejtvonat igényeihez illeszkedő, kereskedelmi forgalomban kapható tápoldatporokat. Ezekről elvárják az ingadozásmentes, kiváló minőséget, ennek teljesülését pedig a felhasználást megelőző felszabadítási vizsgálatokban ellenőrzik.

2.3. A PAT fontossága a biotechnológiai termelésben

A modern folyamatlemező technológiai eljárások (PAT) az ipari technikák tudományosan megalapozott szabályozásának fontosságát emelik ki és használják fel. A rendszer alkalmazása folyamatosan terjed a gyógyszeripari termelésben, és különösen fontos a biotechnológiai eljárásfejlesztésben és gyártásban a valósídejű monitorozást igénylő technológiák esetében. A PAT az innovatív gyógyszerfejlesztésnek, gyógyszergyártásnak és

minőségbiztosításnak ad keretet úgy, hogy a folyamatban résztvevő anyagok minőségének rendszerezett ellenőrzését végzi a megfelelő termékminőség elérésének céljából. Ez kiterjed a gyártás tervezésére is. [13]

A minőségközpontú fejlesztés, gyártás, ellenőrzés (QbD) a gyógyszeriparban is elterjedt minőségügyi koncepció, mely a termék utólagos ellenőrzési eljárásai helyett a gyártási folyamat tudományos megértését és szabályozását helyezi előtérbe. A biológiai technológiák alkalmazásának esetében a tudományos vizsgálat két fő irányból történik. Előbb statisztikai elemzéseket végezve meg kell határozni a rendszert jellemző bonyolult kapcsolatok, interakciók paramétereit. Ezt követően a biológiai folyamatot szükséges tanulmányozni annak érdekében, hogy a háttérben álló mechanizmusokat feltérképezzük, és alátámasszuk a statisztikai elemzések eredményeit. Az így nyert ismeretek felhasználásával a termelés biztonsága és a végtermék minősége nagyban növelhető. Ebbe a szemléletbe a PAT mint egy lehetséges QbD eszköz illeszkedik bele. [14]

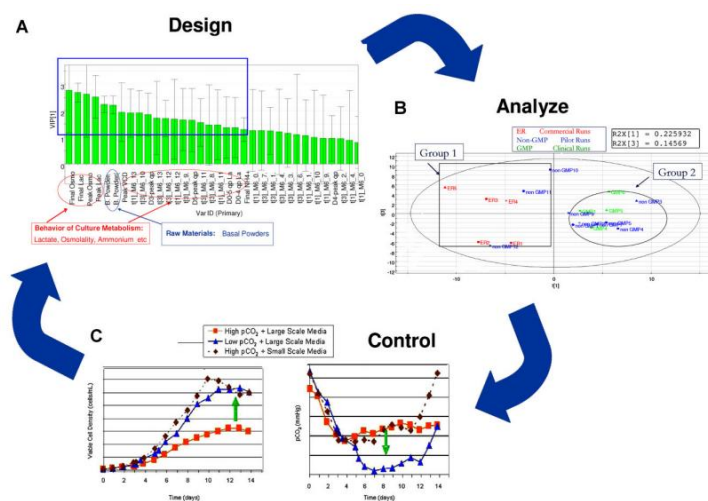
A PAT lényegét 2004-ben az FDA határozta meg először, miszerint a PAT egy eszköz egy „még rugalmasabb” szabályozás kidolgozására. Magában foglalja az egész folyamat megértését, a nyersanyagok ellenőrzését, a folyamat paramétereinek valós idejű kontrollját és szabályozását is. [15] A nagyhatékonyságú minőségbiztosításnak, a változékonyság csökkentésének, a hibák gyors felismerésének és kiküszöbölésének lehetőségével biztosítja a végtermék megfelelő minőségének elérését és a korábbi gyártástechnológiákat jellemző utólagos tesztek számának csökkentését. [16]

A sejt kultúrák minősége nagyban befolyásolja a termelés kimenetelét és a végtermék minőségét, ezért a sejtekkel végzett folyamatok követése kifejezett előnyökkel járhat. Mindemellett komoly kihívást is jelent, hiszen a biológiai rendszerek meglehetősen komplexek, a rendszert sok különböző tényező együttes hatása és összetett kapcsolatuk határozza meg. Ezenfelül a termék fehérjék bonyolultsága és heterogenitása is fokozza a nehézségek mértékét. A fermentációs folyamatot jellemző kulcsparaméterek, az úgynevezett kritikus minőségi jellemzők (CQA) valós idejű monitorozásával és megfelelő szabályozásával a végtermék minősége garantálható, a felesleges kiadások pedig csökkenthetőek. [14]

A gyógyszeripari gyártások során – beleértve a kismolekulás hatóanyagok előállítását is – az alapanyagok ellenőrzése a technológiai folyamat első lépése. A monoklonális antitestek termelésénél ez a tápoldatok preparatív minősítését jelenti. A vizsgálandó komponenseket tartalmazó tápközeget rázatott lombikokban vagy mikro-bioreaktorokban tesztelik a fermentációban is felhasznált sejtenyésztéssel. Ha ennek ellenére nem megfelelő alapanyag kerül a rendszerbe, az jelentős anyagi veszteséget jelenthet. Az alapanyagok

minőségi kérdését PAT szemléletben megközelítve a táptalajok optimalizálásakor a kísérlettervezést (DoE) felhasználva, sokváltozós adatelemző módszerek segítségével megérthetjük az összetevők és a sejtenyészet közötti bonyolult kapcsolatot. Ezen ismereteinket felhasználva a bejövő nyersanyagok elemezhetőek, a változékonyságuk mértéke és ennek lehetséges hatásai pedig előre becsülhető, a technológia robusztusabbá tehető. [13, 17]

A modern folyamatelemző eljárások komplex statisztikai eszközöket alkalmaznak az adatok elemzésére, mely lehetővé teszi, hogy az egyes biotechnológiai egységekhez tartozó különböző faktorokat egyszerre tudjuk elemezni, szabályozni. A sokváltozós adatelemzés (MVDA) eszközök között leggyakrabban felhasznált a főkomponens elemzés (PCA), a legkisebb négyzetek módszere (PLS) és a többszörös lineáris regresszió (MLR), de fontos kiemelni a DoE jelentőségét, amikor egy folyamat fejlesztéséről, az adathalmazok elemzéséről és modellek alkotásáról van szó. Az MVDA ezenfelül lehetőséget jelent a sikeres gyártás, a léptéknövelés, az összehasonlíthatósági kérdések és hibakeresési problémák esetében is. [13, 18, 19]



1. ábra: A PAT főbb lépései egy emlőssejtenyészet esetén: az MVDA modell megtervezése (*Design*), a gyártás során keletkező adatok elemzése (*Analyze*), a szabályozási stratégia tesztelése (*Control*). [13]

2.3.1. A PAT-hoz kapcsolódó analitikai eszközök

A PAT által kontrollált folyamatoknál különböző halmazállapotú és mennyiségű anyag elemzését kell elvégezni, minőség és mennyiségi jellemzőit meghatározva. A modern

folyamatellenző technológiai eljárások közé sok analitikai módszert felsorolhatunk, közülük a leggyakoribb PAT eszközök az alábbiak [13]:

- folyamatszabályozás és a termék minőségi jellemzőinek vizsgálata,
- SPR (felületi plazmon rezonancia),
- HPLC (nagyhatékonyságú folyadék kromatográfia),
- kapilláris elektroforézis,
- dielektromos spektroszkópia,
- *in situ* mikroszkópia,
- áramlási citometria,
- fém-oxid térvezérlésű tranzisztor,
- infravörös spektroszkópia,
- *in situ* 2D fluorimetria,
- Raman-spektroszkópia,
- UV spektroszkópia,
- tömegspektrometria.

A felsorolt analitikai eszközök közül kiemelkedik az infravörös, a Raman- és a fluoreszcens spektroszkópia. [20, 21]

A fluoreszcens gerjesztő-emissziós mátrix spektroszkópia a tápoldatok minőségi és mennyiségi vizsgálatában sikeresen alkalmazható. Gyors, roncsolásmentes, nagy áteresztőképességű technikát jelent, mely kiválthatja a költséges és időigényes kromatográfiai eljárásokat, továbbá ideális *on-line*, *in situ* és *in vivo* méréseknél. További előnyei az érzékenység, alacsony zaj és viszonylag széles lineáris tartományok. A gerjesztési-emissziós mátrix három-paraméteres adataiból jelent: a gerjesztési és az emissziós hullámhossz a fluoreszcens intenzitással együtt hordozza az MVDA módszerekkel kinyerhető információkat, és több paraméter szimultán detektálását biztosítják. [22, 23]

A Raman-spektroszkópia szintén alkalmas a komplex tápközegek komponenseinek gyors meghatározására és minőségi értékelésére. Jó eszköz továbbá a bejövő nyersanyagok vizsgálatára. A térbeli *offset* Raman spektroszkópia (SORS) a csomagolt alapanyagról két spektrumot szolgáltat: a védőborítás spektrumát, ill. a mérendő anyag térben eltoltspektrumát, melyek különbségéből a csomagolt termék jellege meghatározható. [24] A jelenleg elterjedtebb felhasználású infravörös spektroszkópiával szembeni előnye az, hogy vizes közegű minták is jól mérhetőek, mivel a vízcsúcsok nem jelentenek zavaró hatást. [25]

2.4. Az infravörös spektroszkópia

2.4.1. Az infravörös spektroszkópia elméleti háttere

Az infravörös (IR) tartományban az anyagok összetételüktől függően nyelik el a különböző hullámhosszúságú sugárzásokat, ez a tulajdonságuk pedig felhasználható analitikai meghatározásra. Az infravörös spektroszkópiás mérések során az elektromágneses sugárzás $780\text{-}3\cdot 10^5$ nm tartományba eső IR fényt bocsátunk a mintára, és a különböző hullámhosszokon átengedett vagy visszavert fény intenzitását detektáljuk. [26]

A minta és az infravörös fény fotonjai kölcsönhatása során a molekulák rezgési és forgási állapotai gerjesztődnek, miközben a kölcsönhatásban szerepet játszó kötések rezgéseire jellemző frekvenciájú fotonok elnyelődnek. A nem abszorbeálódott komponensek a mintán áthaladnak, vagy egyéb utat járnak be (elhajlás, szórás, spekuláris és diffúz reflexió). [27]

Egy N atomból álló molekula $3N-6$ (lineáris molekuláknál $3N-5$) független rezgéssel rendelkezik, a gerjesztés nélküli, úgynevezett normálrezgés során pedig a molekula összes atomja ugyanazon normálfrekvencián rezeg azonos vagy ellentétes fázisban. Ezek közül nem mind eredményez rezgési sávot az infravörös spektrumon, mivel közülük csak a változó dipólus momentummal rendelkezők IR aktívak. Ezen felül azonos frekvenciájú normálrezgések elfedhetik egymást, és előfordulnak a zajtól elkülöníthetetlen, kis intenzitású rezgések is. Az így kapott adszorpciós sávok számát viszont növelik az alapállapotból második, vagy magasabb rezgési energiaszintre kerülő rezgésekből eredő felhangok, továbbá a normálrezgések kölcsönhatásából származó kombinációs és differenciasávok. [26]

Az IR fény tartománya konvencionálisan három részre osztható [28]:

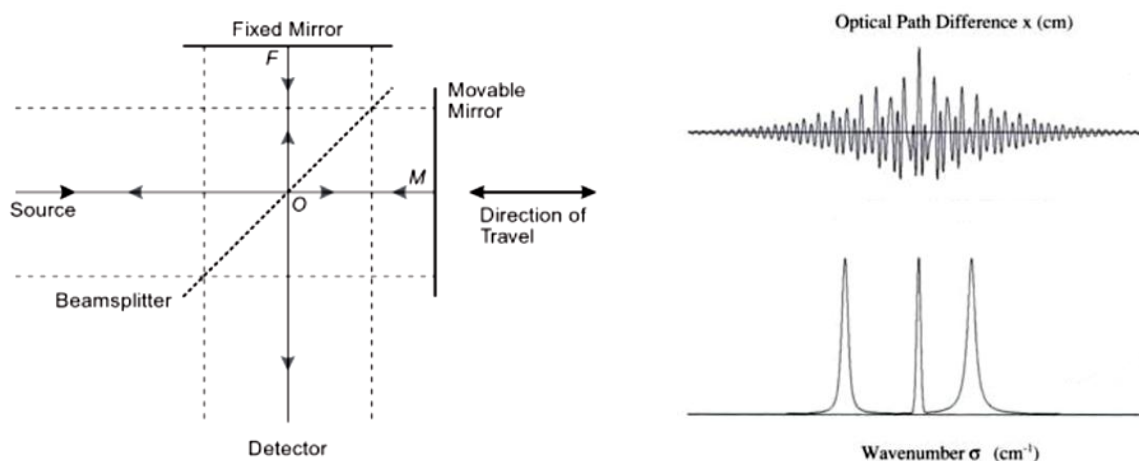
- | | |
|--|--------------------------------------|
| - közeli infravörös (NIR) | 780-3000 nm, |
| - közép vagy analitikai infravörös (MIR vagy IR) | 3000-50000 nm, |
| - távoli infravörös (FIR) | $5\cdot 10^4\text{-}1\cdot 10^6$ nm. |

2.4.2. Az infravörös spektrométer

Az IR tartományban működő készülékek több szempont szerint is csoportosíthatóak. Gyakori kategorizáló tényező a hullámhossz választó elem jellege, mely alapján diszperziós és Fourier-transzformációs (FT) IR spektrométereket különböztethetünk meg.

A diszperziós készülék működése alapvetően megegyezik a látható (VIS) és ibolyántúli (UV) fényt felhasználó spektrofotométerek működési elvével. A fényforrás legtöbbször izzólámpa vagy halogénlámpa, a detektor rövidebb hullámhossz-tartománynál általában szilícium (Si), hosszabb hullámhosszaknál pedig indium-gallium-arzenid (InGaAs) vagy ólom-szulfid (PbS). [26, 27]

Az FT-IR spektrométerek esetében az IR fényt a mozgó és álló tükröket tartalmazó interferométer két sugárra bontja, melyek ismét egyesítve optikai úthosszuk különbségének megfelelő interferenciával jellemezhetők. A mintával történő kölcsönhatást követően a detektor interferogramot rögzít, melyet a jelfeldolgozó egység Fourier-transzformációval alakít át hullámszám függvényében ábrázolt spektrummá. [29]



2. ábra: Az interferométer sematikus ábrája (balra), a detektált interferogram és a belőle keletkező spektrumkép (jobbra). [29, 30]

Az IR spektroszkópok csoportosításának további gyakorlati jelentőségű szempontja a mérési elrendezés típusa. A transzmissziós mérések során az I_0 intenzitású fény áthatol a mintán, miközben a kölcsönhatások következtében veszít energiájából. A kimenő I_T fényintenzitást detektálva transzmittancia (T) értékeket kapunk:

$$T = \frac{I_T}{I_0}$$

melynek negatív logaritmus, az abszorbancia (A) érték a koncentrációval lineáris kapcsolatban álló származtatott mérték:

$$A = -\lg T = a \cdot c \cdot l = \varepsilon \cdot c_m \cdot l$$

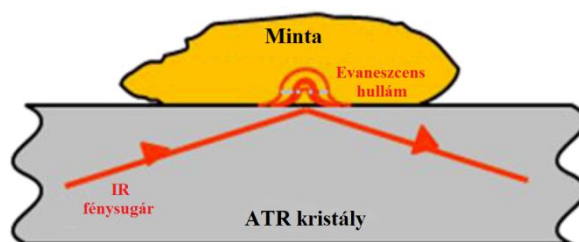
ahol a az abszorpciós koefficiens, c a koncentráció, ε a moláris abszorpciós koefficiens, c_m moláris koncentráció. A monokromatikus fényre érvényes összefüggés a molekulaspektroszkópiában Lambert–Beer-törvényként ismeretes. [26]

Átlátszatlan, zavaros, vagy túlságosan nagy abszorpciós tulajdonságú minták vizsgálata esetén célszerűbb a diffúziós reflektanciás mérési elrendezés alkalmazása. A minta felszínére merőlegesen eső fénysugár minden irányban visszaverődik, ennek informatív hányadát a beeső sugárral 45°-os szöget bezáró irányban elhelyezett detektor rögzíti. Ez esetben is definiálhatjuk az A értéket:

$$A = -\lg R = -\lg \frac{I_R}{I_{St}}$$

ahol R a reflektancia, I_R a mintáról visszavert fény intenzitása, I_{St} egy nem abszorbeáló standard felületről visszavert fény intenzitása.

Az analitikai IR tartomány vizsgálatánál elterjedt mérési elrendezés a gyengített teljes reflexiós (ATR) technika. A minta a speciálisan kidolgozott, magasabb törésmutatójú belső reflexiós elemen, a mérőkristályon helyezkedik el, szoros érintkezésben azzal. Az IR fény a mérőkristály és a minta találkozási pontjára irányítva lép be, ahol teljes reflexiót szenved. A visszaverő felületen egy állóhullám, úgynevezett evanescens zóna keletkezik, mely kölcsönhatva a mintával a kilépő IR fénysugár csillapított intenzitását eredményezi (3. ábra).



3. ábra: Az infravörös fény útja az ATR kristályban.

2.4.3. Az infravörös spektroszkópia alkalmazása a gyógyszeriparban, mint lehetséges PAT eszköz

Az IR spektroszkópia gyors, roncsolásmentes analitikai módszer, mely minőségi és mennyiségi meghatározásra is felhasználható. Bár a hatóanyag koncentrációt legtöbbször analitikai standard módszerekkel (pl. HPLC, GC) végzik, az IR spektroszkópia kiegészítheti,

vagy felválthatja az előbbi időigényes és jelentős laboratóriumi előkészítő tevékenységet igénylő technikákat. Az IR spektroszkópiának továbbá kiemelkedő előnye, hogy a minimális minta-előkészítésnek köszönhetően közvetlen kvantitatív meghatározásokra és folyamatkövetésre egyaránt használható.

Az IR spektroszkópia emlőssejtes tápoldatok ellenőrzésével, komponenseinek minőségi osztályozásáról és a fermentáció folyamatának követésével kapcsolatos lehetőségeiről sok publikáció született az elmúlt évtizedben, melyek többsége kihangsúlyozza a módszer alkalmasságát a PAT eszközként való felhasználásra.

Az analitikai IR tápközegek komponenseinek (pl. laktát, ammónia, glükóz) vizsgálatában pontos eredményeket nyújtott, az elért alacsony minimális detektálható koncentráció (LOD) értékek alapján az emlőssejtes tápközegének on-line monitorozásához alkalmas technika. [31, 32]

A NIR spektroszkópiát elterjedten használják élelmiszeripari minősítések elvégzésére. A nyolcvanas évek óta sok publikáció született élelmiszeripari alapanyagok (pl. gabonák, hústermékek, olajok, bor, tojástermékek) beltartalmi értékének, szénhidrát, fehérje, zsír és antioxidáns tartalmának mennyiségi meghatározására végzett NIR spektroszkópiás vizsgálatokról [33, 34, 35]. A NIR használata a gyógyszeripari vizsgálati eszközök között is elterjedőben van. A módszer analitikai IR-el szembeni nagy előnye, hogy fizikai és kémiai információkat egyaránt közvetít a mintáról, ezért sikeresen alkalmazható granulálási, szárítási, keverési, és liofilezési folyamatok követésére. [36, 37]

A NIR kiemelt szerephez juthat a gyógyszerhamisítások kivizsgálása során is. A mennyiségi és minőségi analízis lehetőségével leleplezhetőek a hatóanyag (API) nélküli, vagy előírtnál kisebb API tartalmú készítmények, továbbá a nem megfelelő aktív komponens tartalmú hamisítványok. Ezenfelül a fizikai-kémiai tulajdonságok (keménység, porozitás, szilárdság, szétesés) meghatározásával felismerhetőek az eltérő technológiával előállított gyógyszerek is. [37, 38]

A NIR a sejtes fermentációk követésében alkalmazva a PAT fontos eszköze lehet. Az ilyen irányú laboratóriumi, felüzemi és üzemi méretben végrehajtott vizsgálatok biztató eredményeket nyújtottak. A NIR a sejtnövekedés, viabilitás, valamint kiemelt szubsztrátok és metabolikus termékek (glükóz, laktát, glutamin, glutamát) szimultán monitorozásában a MIR-nél is jobban teljesített. [32, 39]

A bejövő nyersanyagok, így a tápoldatporok vizsgálatában is elterjedt a NIR spektroszkópia alkalmazása, mivel a spektrumok alapján mintázat felismerési eljárásokkal azonosítás (*identification*) végezhető. Ennek háttérében rendszerint spektroszkópiai adatbázis,

úgynevezett spektrumkönyvtár áll, és az adatok feldolgozása sokváltozós adatelemzési módszerekkel – mint a klaszteranalízis (CA) és a főkomponens-analízis (PCA) – történik. [40, 41]

A spektrumkönyvtár több forrásból származhat. A standardizált könyvtárak nyilvános adatbázisból elérhetőek, vagy kereskedelmi áruként megvásárolhatóak, de minden esetben több forrásból származó spektrumokat tartalmaznak. Cél a széleskörű alkalmazásuk, így a csoportosításkor nincs különbségtétel az eltérő gyártótól származó, azonos kémiai jellegű anyagok között. Az egyedi spektrumkönyvtárak esetén kizárólag az adott alkalmazáshoz szükséges néhány anyag típusra fókuszál a felhasználó, legtöbbször gyártó specifikusan. Ilyen könyvtárak összeállítása a későbbi alkalmazójának a feladata, specifikusságát pedig tovább növeli, hogy a benne található spektrumok általában ugyanazon körülmények között (azonos mintakezelés, készülék, méréstechnika stb.) kerülnek rögzítésre. [42]

A biotechnológiai gyógyszergyártás egyik kulcsfontosságú összetevője a médium alapját szolgáló tápoldatpor. Ahogy a többi alapanyag esetében, ennél is sikeresen alkalmazható a spektrumkönyvtárakon alapuló NIR spektroszkópiás minősítés. Hakemeyer *et al.* 2013-ban megjelent publikációban elemezték a szobahőmérsékleten hosszabb ideig tárolt tápoldatpor minőségének változását. Legfőbb analitikai eszközeik az FT-NIR és a kétdimenziós (2D) fluoreszcens spektroszkóp voltak, a kalibrációk referencia adatsorát pedig a mintákból készített tápoldatokban tenyésztett CHO sejtek ICV értéke és az általuk termelt monoklonális antitest koncentrációja alkották. A referencia paraméterek közül az ICV szignifikáns csökkenését tapasztalták, de ez nem mutatkozott meg a termelt mAb mennyiségében. A kemometria eszközeivel kombinálva mindkét spektroszkópiai módszer alkalmasnak bizonyult az öregített minták és a kontrollok megkülönböztetésére, a PLS regresszió során pedig az FT-NIR bizonyult érzékenyebbnek a tárolás során fellépő változások monitorozásában. Az FT-NIR spektrumok esetében általuk megfelelőnek talált matematikai kezelés: MSC korrekciót követő Savitzky–Golay-simításos (másodfokú polinom, 25 pontos simítóablak) elsőrendű deriválás. [43]

3. Anyagok és módszerek

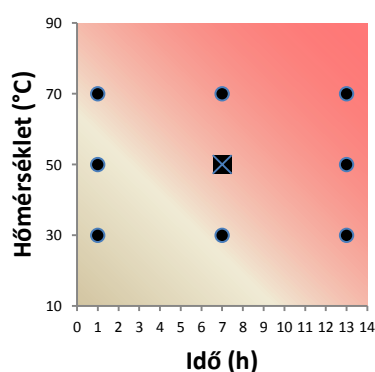
3.1. A vizsgált minták előkészítése

TDK munkám során CHO sejtek tenyésztéséhez és fermentációjához használt szérummentes tápoldat alapjául szolgáló, kereskedelmi forgalomban megtalálható por állagú készítményt vizsgáltam. A szervesetlen sókat, aminosavakat, vitaminokat és egyéb tápanyagokat tartalmazó sokkomponensű, összetett tápoldatpor oldott formában biztosítja a sejtek számára szükséges fiziológiás környezetet. A vizsgált porból készült úgynevezett alaptápodat a fermentáció kezdetén kerül felhasználásra, míg *fed batch* fermentációk során hasonló összetételű, de koncentráltabb tápoldatokat alkalmaznak a rátáplálás folyamatában.

A vizsgálatok kezdetén két tápoldatpor állt rendelkezésemre, melyek közül előkísérletek eredményei alapján választottuk ki a megfelelőbbet a teljes kísérletsorozat végrehajtására. Az előzetes mérések továbbá információt szolgáltatottak a kísérletterv helyes megalkotásához és a FT-IR mérések optimalizálásához.

3.1.1. Kísérletterv

A hő tápoldatporra gyakorolt hatását két faktor, a hőkezelés időtartama és hőmérséklete változtatásával kívántam vizsgálni. Mivel mind az idő, mind a hőmérséklet esetében arra számítottam, hogy a hatások nem lineáris függvénnyel lesznek leírhatóak, a kísérleteket 2 faktoros, 3 szintes teljes terv alapján láttam célszerűnek végrehajtani (4. ábra).



4. ábra: A kísérleti tervben meghatározott mérési pontok a vizsgált két faktor szerinti ábrázolásban.

Az alsó szintek megválasztását az indokolja, hogy ha az előkísérletben feltérképezett 50–70 °C és 5–13 órás négyzetben vizsgálódunk, akkor nem lesz ismeretünk arról, hogy alacsonyabb hőmérsékletű, rövidebb idejű hőhatás milyen szint felett okozhat változást az összetevőkben.

A 50 °C-os 7 órás középpontban 3 ismétlést terveztem elvégezni. Ennek ingadozása magába foglalja a hőkezelésből és a referencia vizsgálatokhoz szükséges oldatkészítésből adódó bizonytalanságot is.

A legkisebb terhelésnek kitett minta 30 °C-on 1 órát áll a szárítószekrényben. Mivel a por felhasználása szobahőmérsékleten történik, ezen a mérési ponton nem várunk változást, tehát a kísérleti tervben ezt tekinthetjük a „kvázi-kezeletlen” mintának. Ennek igazolására 3 ismételt vizsgálatot végeztem kezeletlen tápoldatporral is, melyek eredményei információt adnak az oldatkészítésből eredő ingadozás mértékéről is. Amennyiben a 30 °C-on 1 órát kezelt minta változása szignifikánsnak bizonyul a kezeletlen porokhoz képest, a 4–30 °C tartományban csak kiegészítő mérésekkel tudunk következtetéseket levonni a tápoldatpor állapotváltozásáról.

3.1.2. Minták hőkezelése

A vizsgált tápoldatpor hőkezelését szárítószekrényben végeztem. A nyitott Petri-csészékben vékony rétegben elosztatott mintát érő hőhatásokat homogénnek feltételeztem. A porok nedvességtartalmában a különböző hőmérsékleteken eltérő változásra számíthatunk, mely a lombikos kísérlet elvégzéséhez szükséges oldat elkészítésekor megnehezíti a pontos tömegmérést. Ennek elkerülése érdekében az oldatok alapjául szolgáló mintamennyiséget már a hőkezelés előtt kimértem, a VIS-NIR, FT-NIR és FT-IR spektroszkópiai vizsgálatokhoz szükséges porokat velük párhuzamosan, másik Petri-csészében készítettem elő. Emellett minden hőkezelés előtt és után analitikai mérlegen lemértem a minták tömegét, hogy az eredmények alapján következtethessünk az esetleges nedvességtartalom-változás mértékére.

A tápoldatporok általános összetételének ismeretében a kísérleti terv hőmérsékleti tartományában illékony komponens távozására vagy légköri gáz abszorpciójára nem számítottam.

3.2. Referencia vizsgálatok

3.2.1. Sejtek tenyésztése rázatott lombikokban

Amint az *Irodalmi áttekintés* fejezetben ismertettem, a tápoldat minősége jelentősen befolyásolhatja a sejtszám növekedésének sebességét és a termelt rekombináns fehérje (esetünkben monoklonális antitest) mennyiségét. Mivel ipari szempontból a fermentáció végkimenetele a meghatározó, fontosnak láttam megvizsgálni rázatott lombikos sejtenyésztések segítségével is, milyen hatást gyakorol a hőterhelés a felhasznált alaptápoldatporra. Az így kapott eredmények (sejtszámok, mAb koncentrációk) a spektroszkópiai mérések PLS kalibrációihoz is referencia értékekül szolgálhatnak.

30 ml hasznos térfogatú lombikokban a kísérleti terv szerint előállított mintákból és a 3 kezeletlen kontroll porból tápoldatot készítettem a gyártói előírásoknak megfelelően. Az oldat kiegészítésre került a protokollban előírt egyéb szükséges komponensekkel.

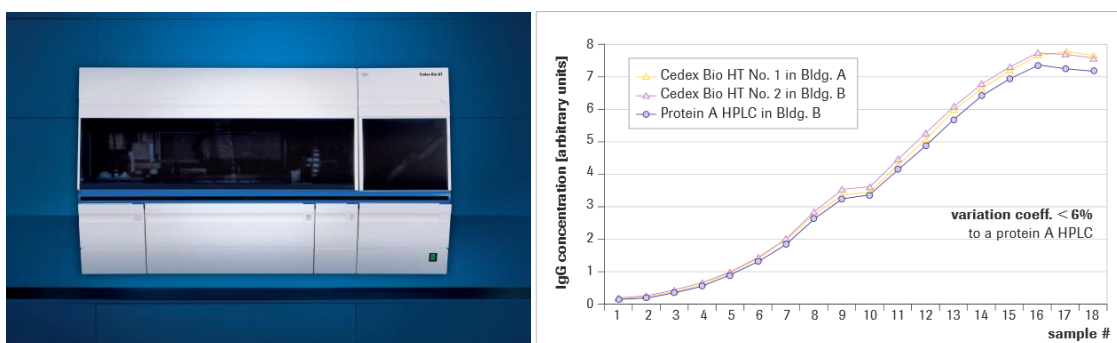
Az elkészített tápoldatba rekombináns CHO sejteket oltottam, majd a szuszpenziós tenyészetben lévő élő sejtszám alakulását 6 napig követtem.

A tenyésztés paraméterei:

Térfogat:	30 ml
Induló sejtkoncentráció:	$3 \cdot 10^5$ sejt/ml
Hőmérséklet:	37 °C
CO ₂ koncentráció:	5%
Rázatas sebessége:	110 min ⁻¹
Sejtkoncentráció mérés:	naponta, mintánként 3 ismétléssel
Sejtszámláló eszköz:	Countess™ Automated Cell Counter (5. ábra) (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)
MAb koncentráció meghatározás:	6. nap végén, mintánként 3 ismétléssel
MAb meghatározási eszköz:	Cedex Bio HT Bioprocess Analyzer (6. ábra) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország)



5. ábra: Countess™ Automated Cell Counter berendezés és a tripánkékel festett emlőssejtek képe. A készülék hivatalos mérési tartománya 10^4 – 10^7 sejt/ml közötti, a legjobb érzékenységet az $1 \cdot 10^5$ – $4 \cdot 10^6$ sejt/ml koncentrációknál garantálja.[44] (katalógusfotó: www.invitrogene.com)



6. ábra: Cedex Bio HT Bioprocess Analyzer képe és a protein A oszlopos HPLC referencia módszerhez viszonyított pontossága. A készülék a 10–1600 mg/l tartományban alkalmas az IgG koncentráció megállapítására.[45] (katalógusfotó: www.custombiotech.roche.com)

3.2.2. A referencia eredmények feldolgozása

A lombikos kísérletsorozat eredményeit Statistica 12 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) szoftverrel végeztem. A tápoldatporok hőkezelésének hatását varianciaanalízis (ANOVA) alkalmazásával vizsgáltam a két faktor (hőmérséklet és idő) 3-3 szintjén kapott eredmények alapján. Az ANOVA használatának feltételei:

- az ε_{ij} „hibák” egymástól függetlenek;
- varianciájuk konstans (homoszkedaszticitás);
- normál eloszlás szerint ingadoznak, várható értékük zérus: $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma_e^2)$.

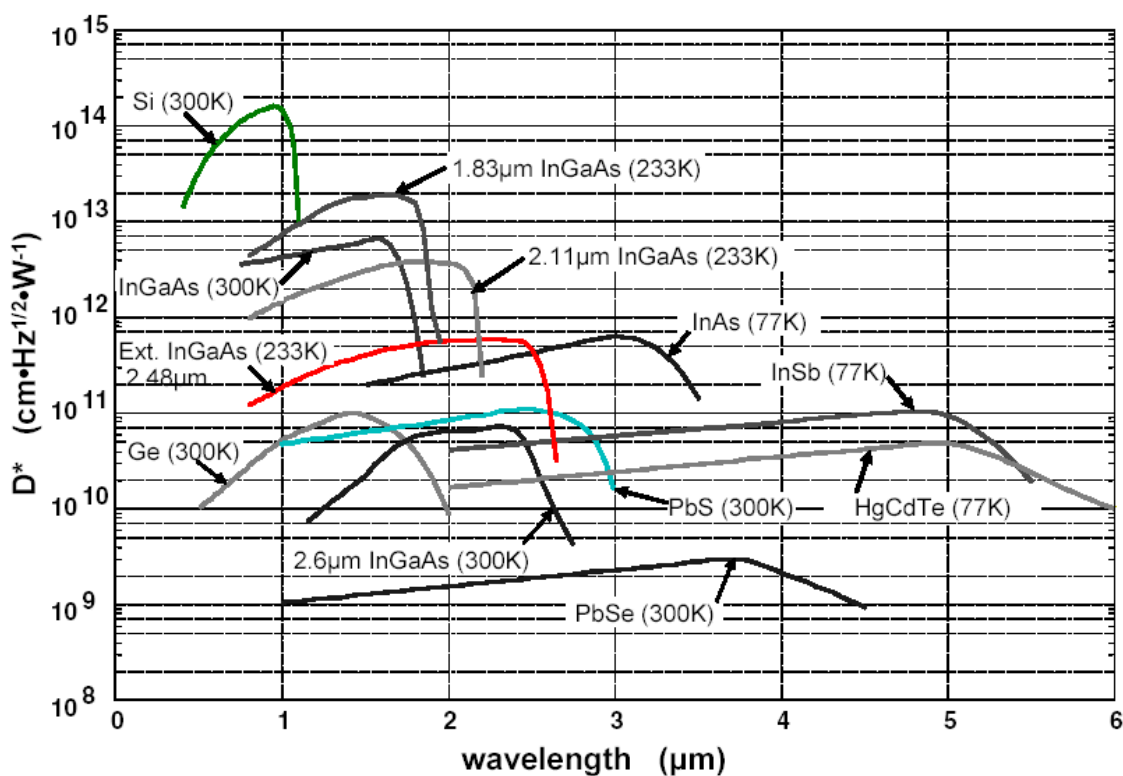
A normalitás és homoszkedaszticitás feltételek teljesülését vizuálisan vizsgáltam Gauss-hálón (*Normal Probability Plot*), továbbá a reziduumok mért és számított értékének ábrázolásával (*Predicted vs. Residual Values*).

A kísérletterv megalkotásakor azt vártuk, hogy a 30 °C-on 1 óráig hőkezelt minta a kezeletlen kontroll mintával azonos eredményeket fogja produkálni. Ennek igazolására/cáfolására kontrasztanalízist végeztem.

3.3. Infravörös spektroszkópiai mérések

A minták infravörös spektrumainak felvételéhez három különböző készüléket használtam, melyek többek között működési módjukban, a mérési hullámhossz tartományukban, detektoruk karakterisztikájában, és a mért spektrumaik adatpontjainak számában egyaránt különböznek.

Az alkalmazott detektorok tulajdonságai meghatározóak az általuk kapott spektrum jel-zaj arányának szempontjából. Az elterjedtebben használt detektorok karakterisztikáját, teljesítményükre jellemző detektivitását a 7. ábra mutatja. A spektrométereinkben megtalálható detektorok szobahőmérsékleten működnek, folyékony nitrogénnel vagy Peltier-elemmel való hűtést nem igényelnek.

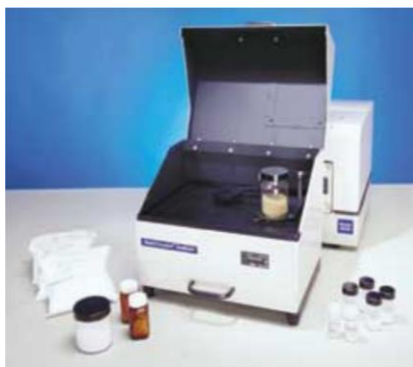


7. ábra: Detektorok karakterisztikájának összehasonlító ábrája (Si: VIS, InGaAs: FT-NIR, PbS: NIR).[46]

3.3.1. Diszperziós, látható és közeli infravörös tartományú mérések (VIS-NIR)

Spektrofotométer:	NIRSystems 6500*
Mintakezelő egység:	Rapid Content Analyzer (RCA)*
Mintatartó:	Loose Powder Sample Holder†

Optikai elrendezés:	diszperziós
Működési mód:	reflexiós
Hullámhosszválasztó elem:	billegő, konkáv holografikus rács
Fényforrás:	volfrám-halogén izzó
Referencia:	kerámia
Mérési hullámhossz tartomány:	400–1098 nm (VIS), 1100–2498 nm (NIR)
Detektor:	Si (VIS), PbS (NIR)
Lépésköz:	2 nm
Spektrum adatpontjainak száma:	350 (VIS), 700 (NIR)
Alminták száma:	3
Spektrumok száma almintánként:	32
Műszert vezérlő szoftver:	Vision 3.20*
	(* Foss NIRSystems, Silver Spring, MD, USA;
	† PerkinElmer, Waltham, MA, USA)

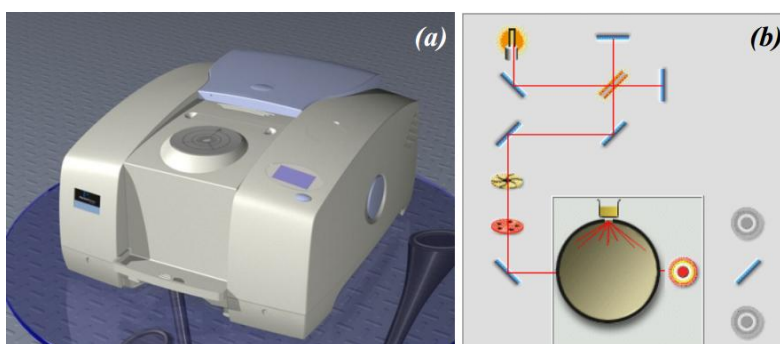


8. ábra: A VIS-NIR tartományú mérésekhez felhasznált NIRSystems 6500 készülék Rapid Content Analyzer (RCA) mintakezelő feltétellel.
(katalógusfotó: www.foss.dk)

3.3.2. Fourier-transzformációs, közeli infravörös tartományú mérések (FT-NIR)

Spektrofotométer:	Spectrum 400*
Mintakezelő egység:	Near-Infrared Reflectance Accessory (NIRA)*
Mintatartó:	Loose Powder Sample Holder*
Optikai elrendezés:	Fourier-transzformációs
Működési mód:	reflexiós
Hullámhosszválasztó elem:	Michelson-interferométer
Fényforrás:	volfrám-halogén izzó

Referencia:	arany
Mérési hullámhossz tartomány:	$10000\text{--}4000\text{ cm}^{-1} = 1000\text{--}2500\text{ nm}$
Detektor:	InGaAs
Lépésköz:	2 cm^{-1}
Spektrum adatpontjainak száma:	3001
Alminták száma:	3
Spektrumok száma almintánként:	32
Műszert vezérlő szoftver:	Spectrum 6.3.2*
	(* PerkinElmer, Waltham, MA, USA)

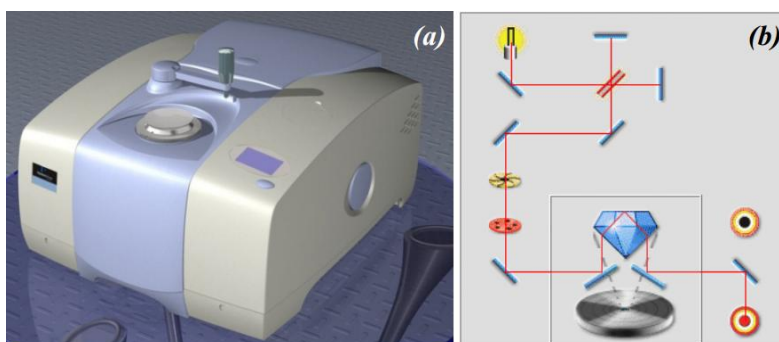


9. ábra: Az FT-NIR mérésekhez használt Spectrum 400 készülék Near-Infrared Reflectance Accessory (NIRA) mintakezelő egységgel (a) és az optikai elrendezés sematikus ábrája (b).
(katalógusfotó: www.perkinelmer.com)

3.3.3. Fourier-transzformációs, közép infravörös tartományú mérések (FT-IR)

Spektrofotométer:	Spectrum 400*
Mintakezelő egység:	Universal ATR Sampling Accessory (UATR)* Single Bounce Flat Top Plate* Composite Diamond/ZnSe Crystal*
Mintatartó:	Cylinder Pressure Attachment*
Optikai elrendezés:	Fourier-transzformációs
Működési mód:	reflexiós
Hullámhosszválasztó elem:	Michelson-interferométer
Fényforrás:	védjegyzett, közép és távoli IR tartományban sugárzó, hosszú életű fényforrás
Referencia:	levegő
Mérési hullámhossz tartomány:	$4000\text{--}650\text{ cm}^{-1} = 2500\text{--}15385\text{ nm}$

Detektor:	DTGS
Lépésköz:	1 cm^{-1}
Spektrum adatpontjainak száma:	3351
Alminták száma:	3
Spektrumok száma almintánként:	4
Műszert vezérlő szoftver:	Spectrum 6.3.2*
	(* PerkinElmer, Waltham, MA, USA)



10. ábra: Az FT-IR mérésekhez használt Spectrum 400 készülék Universal ATR Sampling Accessory (UATR) mintakezelő egységgel (a) és az optikai elrendezés sematikus ábrája (b).
(katalógusfotó: www.perkinelmer.com)

3.3.4. A spektroszkópiai adatfeldolgozáshoz felhasznált szoftverek

A spektrumok kiértékelése Microsoft® Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), The Unscrambler® X 10.3 (CAMO Software, Oslo, Norvégia) és Statistica 12 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) programok felhasználásával történt.

3.4. Alkalmazott matematikai eljárások

3.4.1. Spektrum előkezelések

A spektroszkópiai mérések során kapott spektrumok minőségét különböző hatások befolyásolják. Az általam vizsgált minták összetett keverékek, a komponensekben található kötésektől eredő rezgések átlapolnak, így burkológörbékük ellaposodott, széles csúcsokat eredményeznek a közeli infravörös tartományban. Az összetett, bonyolult spektrum képében továbbá megjelennek a méréstechnikából eredő zajok és a minta fizikai jellegeinek köszönhető alapvonal-eltolódások is.

Két spektrum közötti hasonlóság vizsgálatakor legtöbbször az alábbi nehézségekkel találkozhatunk:

- a minta reprodukálhatóságából adódó eltérések,
- a szín és/vagy szemcseméret változékonyságából eredő alapvonal-eltolódás,
- információ tartalommal nem rendelkező zajrezgések.

A matematikai előkezelések hozzájárulnak a fent említett zavaró spektrum-komponensek redukálásához, de a kisebb felbontású spektrumok esetében alkalmazhatjuk az alapvonalba beleolvadó csúcsok elkülönítésére is. Tehát az előkezelések célja, hogy tompítsuk a zavaró hatásokat, és maximalizáljuk a vizsgálat tárgyát képező paramétert tükröző különbségeket, így elősegítve a kitűzött analízis megvalósulását.

3.4.1.1. Normálások

Porszerű, szemcsés vagy granulált minták esetében a különböző szemcseméretből adódóan az infravörös, illetve látható fénysugár szóródása léphet fel, mely a fény tényleges úthosszát befolyásolva az abszorpciós sávok intenzitásának változását okozhatja. A szóródás és a felületi reflexió okozta abszorbancia csökkenés, illetve alapvonal-eltolódás a spektrum más-más tartományában eltérő mértékű lehet, de az ily módon okozott torzulások normálással kompenzálhatóak. A tápoldatpor vizsgálata során kapott spektrumok normálására a standard normál változó (SNV) és a többszörös szóráskorrekció (MSC) módszerét alkalmaztam.

Az SNV kezelés során az alkalmazott szoftver az egyes adatpontok értékét (s_i) korrigálja a spektrum adatpontjainak átlagával ($\bar{s}$), majd a kapott különbséget az adatpontok szórásával osztja. Az egyes spektrumok kezelése egymástól függetlenül, külön-külön történik.

$$s_i^{SNV} = \frac{s_i - \bar{s}}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (s_i - \bar{s})^2}{n - 1}}}$$

Az MSC módszer az SNV-vel ellentétben a spektrumpopuláció egészét felhasználva végzi a transzformációt úgy, hogy az átskálázás után minden kezelt spektrum a lehető legjobban illeszkedjen a populáció alapján képzett átlag spektrumhoz. Feltételezve, hogy a spektrumok normális eloszlás szerint ingadoznak és az átlag spektrum a legvalószínűbb spektrum a vizsgálat minták esetében, a legkisebb négyzetek módszerét felhasználva lineáris illesztés történik a kezelendő és átlagspektrum pontjaira. A lineáris illesztéshez tartozó

tengelymetszet érték kivonódik a spektrum adatpontjaiból, mely ezután leosztásra kerül az illesztést jellemző meredekséggel. A módszer definíciójából adódóan a spektrumsereg összetétele hatással van a kezelés kimenetére, ezért végrehajtása előtt szükséges a kilógó, úgynevezett *outlier* minták eltávolítása.

A normálások alkalmazása hátrányos is lehet, ha az alapvonal-eltolódások hordozzák a mintákat jellemző fizikai és/vagy kémiai tulajdonságokat leíró változékonyságot, például granulált minták méreteloszlásának, vagy porok csomósodásának vizsgálata esetén.

3.4.1.2. Simítással kombinált deriváltak

A deriválás a finom változások kiemelésére, átlapoló csúcsok szétválasztására alkalmas matematikai kezelés, mely az alapvonal-eltolódást is eliminálja a spektrumból. Mivel matematikailag lineáris művelet, ezért ha a Lambert–Beer-törvény teljesülését feltételezzük az alapspektrumra, akkor deriváltjaira is érvényesnek tekinthetjük, így ezek is felhasználhatóak mennyiségi kalibrációk készítésére.

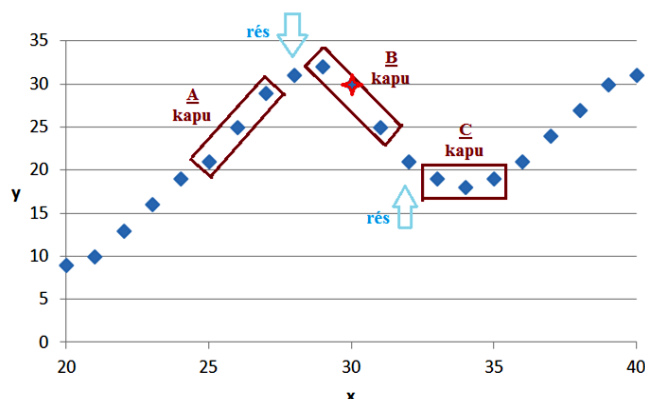
Az első derivált spektrumok – a differenciálszámítás definíciójának értelmében – az alapspektrum inflexiós pontjainál lokális minimumot vagy maximumot érnek el, a lokális szélsőértékeknél pedig zérus értéket vesznek fel. A kapott spektrumot ismételten deriválva másodrendű derivált spektrumot kapunk, amely jól kiemeli az eredeti spektrumon található lokális minimumokat és maximumokat: ami azon csúcs volt, itt völgyként jelenik meg, és viszont. Ily módon az alapspektrum átlapoló csúcsai szétválnak egymástól, a szinte észrevehetetlen csúcsvállak és inflexiós pontok jól láthatóvá és kiértékelésre alkalmassá válnak.

A deriválásból adódó előnyök mellett hátrányt jelenthet, hogy a művelet a zajt is kiemeli, ezért – bár elvi akadálya nincs – ritkán alkalmaznak harmadik-, vagy annál magasabb rendű deriváltakat, továbbá legtöbbször kombinálják simító transzformációval. A simítással kombinált deriválás során két paramétert definiálunk:

- kapu (*segment*): átlagolt adatpontok száma
- rés (*gap*): két kapu között elhelyezkedő pontok száma

A beállított paraméterek mellett az egyes spektrofotométerekhez tartozó szoftverek eltérő algoritmussal végezhetik a derivált számítását, bizonyos gyártók nem is ismertetik az általuk használt eljárást. A simításos deriválás egyik elterjedt formája, a Norris-féle *gap-segment* módszer során 3 kaput jelölünk ki a spektrum elején (A, B, C), ezeket rések választják el egymástól. Kapunként külön átlagot képezünk a pontok abszorbancia értékeiből,

majd a B kapu középső pontjához rendeljük az $A-2B+C$ összefüggés alapján számolt abszorbanciát (11. ábra). A kapuk által alkotott szekvencia pontonként eltolódva halad végig a spektrumon, míg a C kapu el nem éri az utolsó adatpontot.



11. ábra: Simítós deriválás (kapu: 3 adatpont, rész: 1 adatpont)

A simítóablak növelésével a spektrum zaj komponensei eliminálódnak, egy határ felett viszont információtartalommal rendelkező apró csúcsok is eltűnnek, ezért a kapuk és rések méretének optimalizálása szükséges az egyes kiértékelések során.

Az általam használt Unscrambler szoftverben a *gap-segment* deriválás során a kapuk és a rész(ek) értékei is szabadon megválaszthatóak. A diszperziós és a Fourier-transzformációs készülékkel kapott spektrumok eltérő jellege (előbbiben 2 nm-es, míg utóbbiban 2 cm^{-1} -es a lépésköz) és 1000-2500 nm-es tartományra vonatkoztatott adatpontjainak száma (diszperziós:FT=1:4) miatt spektrumaikon az egyforma simítóablak alkalmazása nem azonos hatást gyakorol. A skálázási értékek átszámításával viszont megközelítőleg azonos léptékű simítóablak párok képezhetők: ilyen a diszperziós készülék esetében gyakran alkalmazott 5 pontos simításhoz társítható 19 pontos simítás a Fourier-transzformációs spektrumok esetében. A kiértékelések során ezeket többször alkalmazom, a rész méretét pedig minden számításnál 1 pontosnak definiálom.

Hakemeyer *et al.* tápoldatporok öregedését vizsgáló publikációját alapul véve a kapott spektrumokon MSC normálást követő Savitzky–Golay-féle simítással kiegészített deriválást is alkalmaztam.[43]

A Savitzky–Golay-simítás során a simítóablak méretének megfelelő számú pontra polinom illesztés történik a legkisebb négyzetek módszerével, és az ablak középső pontja a polinom alapján számított értékek átlagát veszi fel. A *gap-segment* deriváláshoz hasonlóan

végigvonul az ablak a spektrum teljes hosszán, simított derivált spektrumot eredményezve. Az elsőrendű deriválás során a spektrum j -edik pontja a

$$\frac{ds_j}{d\lambda} = \frac{1}{N_{pi} \cdot \Delta\lambda} \sum_{i=-(m-1)/2}^{i=(m-1)/2} C_i s_{j+i}$$

képlettel számítható, ahol $\Delta\lambda$ a hullámhossz különbség, i a simítóablak pontjainak száma, N_{pi} az illesztett p -ed rendű polinomhoz és i pontból álló simítóablakhoz tartozó konstans, C_{pi} pedig a p -ed rendű polinomhoz tartozó i -edik konstans. A másod- és magasabbrendű deriváltak az előzőhöz analóg módon, de más koefficiens értékekkel számíthatók.[47]

3.4.2. A spektrumok minőségi értékelése

A spektrumokban rejlő változékonyság alapján az egyes mintacsoportok elkülönítése megvalósítható. E célból az Unscrambler és a Statistica programban egyaránt megtalálható klaszteranalízist (CA) és főkomponens-analízist (PCA) végeztem.

3.4.2.1. Klaszteranalízis (CA)

A klaszteranalízis egy csoportosítási eljárás, mely hasonlóság alapján állapít meg rokonsági kapcsolatot különböző objektumok között. Mivel a csoportok kialakítása előzetes ismeretek és elvárások nélkül történik, „nem felügyelt alakfelismerést” (*unsupervised pattern recognition*) végzünk.

A klaszterezési módszerek között megkülönböztetünk hierarchikus és nem hierarchikus eljárásokat. A hierarchikus csoportosítás Arisztotelész logikáját követi, miszerint a vizsgált rendszertani egység valamely föléje rendelt csoporthoz (*genus proximus*) tartozik, melytől egy sajátos jegy (*differentia specifica*) különbözteti meg. Az objektumok fa-struktúrába rendezhetők, melyben az egyes objektumok rendelkeznek a fölöttük álló objektumok tulajdonságaival, tőlük különböző jellegeiket pedig az alattuk álló objektumoknak „örökítik”. A kapott dendrogram vízszintes tengelyén az egyes objektumok szerepelnek, melyek közötti kapcsolatot a koordináta-rendszerben rajzolt vízszintes vonalak jelzik. Az objektumokhoz tartozó függőleges vonalak hossza pedig az alkalmazott összefüggés szerint számított hasonlóság mértékét mutatja.

Megfelelő tulajdonságvektorok definiálásával az objektumok hasonlóságának jellemzésére a hozzájuk tartozó tulajdonságvektorokat használhatjuk. Hasonló objektumokhoz tartozó tulajdonságvektorok egymáshoz közeli pontokat eredményeznek, tehát távolság alapján csoportosítás végezhető. A távolság számszerűsítésére elterjedten alkalmazzák az euklideszi távolságot, illetve a tulajdonságok szórásával normáló változatát, a dimenziómentes Pearson-távolságot:

$$t_{ab} = \sqrt{(\vec{x}_a - \vec{x}_b)^T \underline{S}^{-1} (\vec{x}_a - \vec{x}_b)} = \sqrt{\sum_i \frac{(x_{ai} - x_{bi})^2}{s_i^2}}$$

ahol t_{ab} az a és b objektumok távolsága, $\vec{x}_a$ és $\vec{x}_b$ az objektumok metrikus tulajdonsága (esetünkben vektor jellegű spektrum), i a tulajdonság dimenziója (itt a spektrum adatpontjainak száma), az $\underline{S}^{-1}$ pedig a varianciamátrix inverze ($i \times i$ méretű diagonális mátrix). A Pearson-távolság négyzetét alkalmazva az objektumok távolsága tovább nagyítható.

A csoportok egymástól való távolságának számszerűsítéséhez ki kell választani azon pontjaikat, melyek közé a távolságokat számítjuk. Ez többféleképpen megtehető:

- egyszerű lánc (single linkage)
a csoportok legközelebbi elemeinek távolsága;
- teljes lánc (complete linkage)
a csoportok legtávolabbi elemeinek távolsága;
- átlag távolság (average linkage)
a csoportok elemei közötti távolságok átlaga;
- súlypont távolság (centroid linkage)
a csoportok súlypontjainak távolsága;
- McQuitty-távolság (McQuitty linkage)
két csoportból egyesített csoport távolsága valamely harmadik objektumtól, a két egyesített csoport attól való távolságának átlaga;
- medián távolság (median linkage)
a csoport mediánok távolsága;
- Ward-távolság (Ward linkage)
az a számított távolság, melyben az egyesített csoport csoporton belüli eltérésnégyzete minimális.

A hőkezelt tápoldatporok spektrumainak klaszteranalízisét Statistica programmal végeztem. A távolságok számításához az euklideszi távolság és az 1–Pearson R módszereket alkalmaztam, melyeket az egyszerű lánc és a Ward-féle csoporttávolság számítási módszerekkel kombináltam.

Egyszerű lánc:
$$t_{ei} = 0,5 (t_{ai} + t_{bi}) - 0,5 |t_{ai} - t_{bi}|$$

Ward-távolság:
$$t_{ei} = -\frac{n_a+n_i}{n_a+n_b+n_i} t_{ai} + \frac{n_b+n_i}{n_a+n_b+n_i} t_{bi} - \frac{n_i}{n_a+n_b+n_i} t_{ab}$$

ahol e az egyesített csoport jele, a és b az egyesített csoportok, t_{ei} az egyesített objektum távolsága valamely i objektumtól (hasonlóan t_{ai} , t_{bi} , t_{ab} távolságok), n_a , n_b és n_i a csoportok objektumainak száma.

Az egyszerű lánc használata nagy csoportokat eredményez, melyek között laza kapcsolat van. A klaszterek elnyúltak, kis belső kohézió jellemzi őket. A Ward-módszer alkalmazásakor összetartozó, tömör klaszterek alakulnak, melyek kis csoporton belüli szórással jellemezhetőek.[48]

3.4.2.2. Főkomponens-analízis (PCA)

A PCA egy adatstruktúra elemző módszer, mely során a minták spektrális adatait tartalmazó mátrixból transzformáció útján új, korrelálatlan változókat generálunk. Ezek az eredeti változók lineáris kombinációjaként létrejövő változók az úgynevezett főkomponensek (PC), melyek úgy rendeződnek sorba, hogy elől állnak azok, amelyek az eredeti változók együttes varianciájának legnagyobb hányadáért felelősek.

Az első PC az összes lehetséges lineáris kombinációk közül a legnagyobb mértékben képes leírni a mintasokaság változékonyságát, a második PC az előzőre merőlegesen prezentálja a maradék variancia lehető legnagyobb részét, míg a harmadik PC az előző kettőre egyaránt merőlegesen jellemzi a fennmaradó variancia egy hányadát. Ily módon N számú PC képezhető egy N dimenziós térben, de jellemző, hogy a változékonyság döntő részét az első néhány főkomponens képes leírni, így egy határ felett már nincs értelme újabb változók bevonásának.

A PCA a klaszteranalízishez hasonlóan az adatok csoportosítására és az *outlier* minták szűrésére alkalmazhatjuk, a megjelenítés szempontjából viszont az utóbbin túlmutat. A PCA

során súlyfüggvények (*loadingok*) számítása történik, melyekkel a spektrumokat besorozva értékszámokat (*score-okat*) kapunk. Ezek alkalmazásával az eredeti változók alacsonyabb, két- vagy három-dimenziós koordináta rendszerben kivetíthetők, így vizuálisan jól kiértékelhetővé válnak – ezek az úgynevezett *score plotok* –, a távolságok pedig a pontok egymáshoz viszonyított helyzetéből megítélhetőek. Ezenfelül a főkomponensek által definiált súlyfüggvények lefutása segítségével következtetéseket vonhatunk le a spektrális különbségek háttérben rejlő tényezőkről.

3.4.3. A spektrumok mennyiségi értékelése (PLS)

A spektrumok és referencia tulajdonságok leírására és mennyiségi kalibrációk készítésére leggyakrabban felhasznált technika a részleges legkisebb négyzetek (PLS) módszere. A PLS módszer egy olyan regressziós eljárás, mely iteratív úton egyidejűleg modellezi a spektrális- és referencia adatokat: az adatkészletből kivonja a spektrum és referencia adatok egy részét, maradékokat képez, majd a folyamatot ismétli. A PCA-hoz hasonlóan a faktorok vagy látens változók számának növelésével egyre nagyobb – de csökkenő előrelépéseket mutató – mértékben képes leírni az adathalmazt jellemző változékonyságot.

A végső kalibrációhoz szükséges optimális faktorszám meghatározása a PLS művelet szerves része. A modell túl kevés faktor esetén az információhiány miatt nagy predikciós hibával dolgozik, míg túlzottan sok faktor számításba vételével túlillesztetté válik, így csökken a kalibráció stabilitása, robusztussága. Az optimum meghatározására a PLS kalibráció során keresztvalidálással, vagy a kalibráló mintaseregtől független validáló mintacsoport felhasználásával történik.

A mennyiségi kiértékelés során az Unscrambler szoftverben megtalálható keresztvalidálást alkalmaztam. Ebben a program a kalibráló mintasereget alcsoportokra osztja, melyek közül egyet a kalibráció során visszatart, majd független mintának tekintve validáló csoportként felhasznál. A művelet a többi alcsoportra is megismétlődik, majd a kapott eredmények összegződnek. Az algoritmus a legjobb kalibráló egyenlet kiválasztását a keresztvalidációs hiba minimalizálásával éri el. Az általam használt teljes keresztvalidálás során a csoport mérete 1, így a 42 spektrum (14 minta $\times$ 3 ismételt mérés) között minden futtatásban 41 kalibráló és 1 validáló spektrum található, tehát a végső modell 42 kalibrációból kapott részeredményből alakul ki.

A PLS módszerrel készült kalibrációs egyenletek teljesítményjellemzésére az alábbi mennyiségeket használom:

- R^2 : Pearson-féle korrelációs koefficiens négyzete

Két változó közötti lineáris korreláció jellemzésére alkalmas dimenziómentes szám, mely -1 és $+1$ értékek között változhat, ahol $+1$ a tökéletes pozitív korreláció, -1 a tökéletes negatív korreláció, 0 érték esetén pedig nincs korreláció.

Az összefüggés:

$$R = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

ahol y_i a számított koncentráció aktuális értéke, $\bar{y}$ a számított koncentráció átlagos értéke, Y_i és $\bar{Y}$ a névleges koncentráció aktuális és átlagos értékei, n pedig a mérések száma.

- $RMSE$: átlagos hiba négyzetösszeg

A hibanégyzet átlagának négyzetgyöke, értelemszerűen kisebb értékei kedvezőek.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - Y_i)^2}{n}}$$

- RPD : relatív tapasztalati szórás

A kalibráció vagy validáció hibájának és a referencia eredmények szórásának hányadosa, mely az utóbbi paraméter ismerete nélkül is becsülhető az R -et felhasználva:

$$RPD = \frac{1}{\sqrt{1 - R^2}}$$

Minél magasabb az értéke, annál jobb a kalibráció. Az RPD értéke bonyolult biológiai rendszerek esetén már $2,5$ – 3 felett megfelelőnek tekinthető.

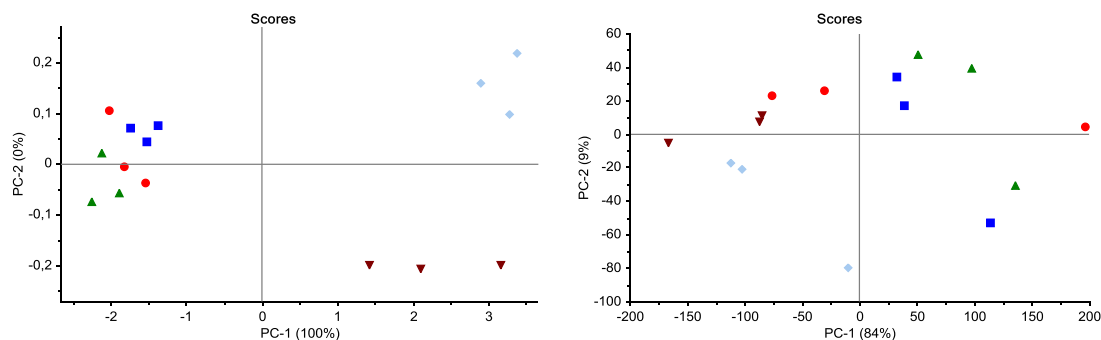
4. Eredmények és értékelések

4.1. Az előkísérletek eredményei

A mérőssorozat megtervezése és elvégzése előtt előkísérlet segítségével kívántuk eldönteni, a hőmérséklet és idő mely tartományában érdemes a vizsgálatot elvégezni.

Az előkísérletet az 1# tápoldatporon kezdtem. (Az ipari titkok védelme érdekében nem kerül megnevezésre.) A port szárítószekrényben hőkezelttem (100 , 70 és 50 °C-on) különböző időtartamokon (5 és 13 óra). A 100 °C-on kezelt minták megégtek, további vizsgálatra alkalmatlanná váltak. A 70 °C-on tartott minták barnásan elszíneződtek, szaguk megváltozott, de továbbra is por állagúak maradtak, megőrizték oldhatóságukat, így alkalmasak mind az FT-IR, FT-NIR és a preparatív referencia vizsgálatokra. Az 50 °C-os minták csak szemmel alig látható elszíneződést szenvedtek.

Az 1# hőkezelt mintákat és a hozzájuk tartozó kezeletlen kontrollt Fourier-transzformációs Spectrum 400 készülékkel vizsgáltam 10000–4000 cm^{-1} (NIR) és 4000–650 cm^{-1} (IR) hullámszám tartományban. A kapott spektrumokkal PCA-t végeztem, hogy megvizsgáljam, a kezeletlen spektrumok alapján mennyire elválaszthatóak az egyes hőkezelt csoportok és a kontroll minta (12 ábra).



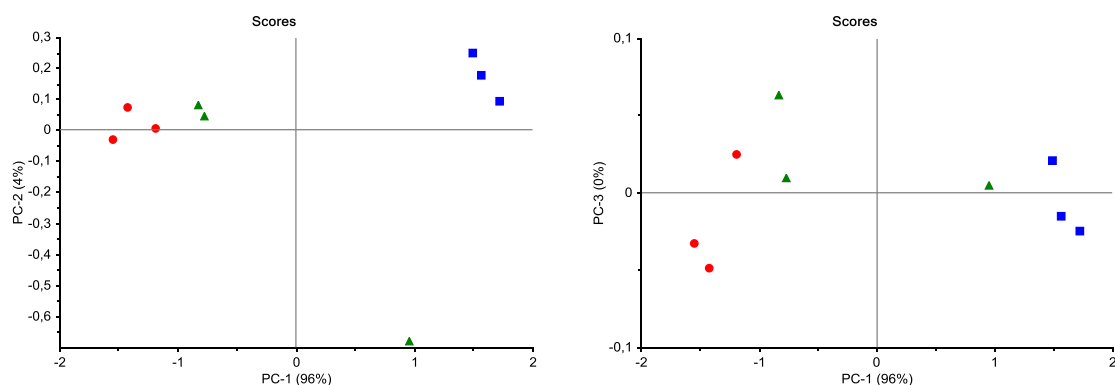
12. ábra: az 1# tápoldatpor hőkezelt mintáinak FT-NIR (balra) és FT-IR (jobbra) spektrumai alapján készített PCA eredményei (▲: kezeletlen minta; ●: 50 °C, 5 h; ■: 50 °C, 13 h; ▼: 70 °C, 5 h; ◆: 70 °C, 13 h)

A PCA elemzés az FT-NIR spektrumok alapján mutatott kedvező képet a változások nyomon követését illetően: a 70 °C-on kezelt minták egyértelműen elkülönültek, az 50 °C-on kezelt és a kontroll minták pedig egy csoportba, de kategóriánként nem nagyon keveredve helyezkedtek el az 1. és 2. főkomponens által képzett koordináta-rendszerben. Érdemes megjegyezni, hogy az ábrán a PC-1 mellett 100%, míg a PC-2 mellett 0% értéket látunk, ami

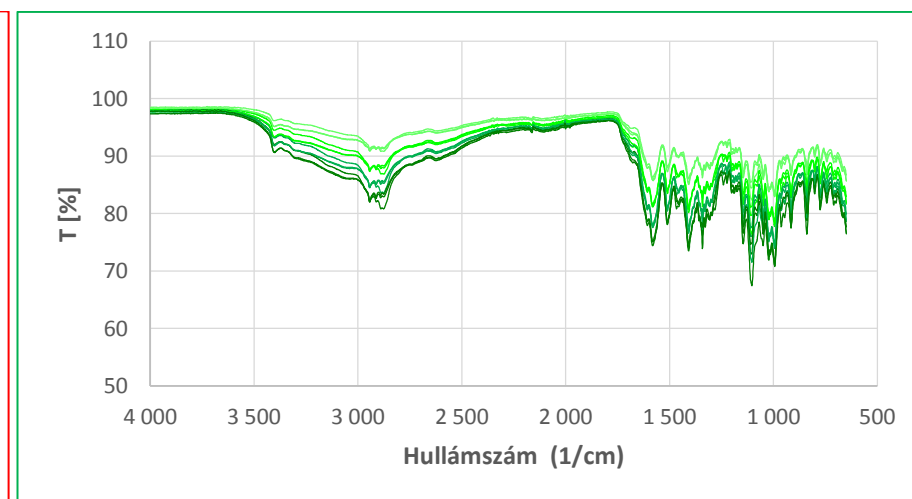
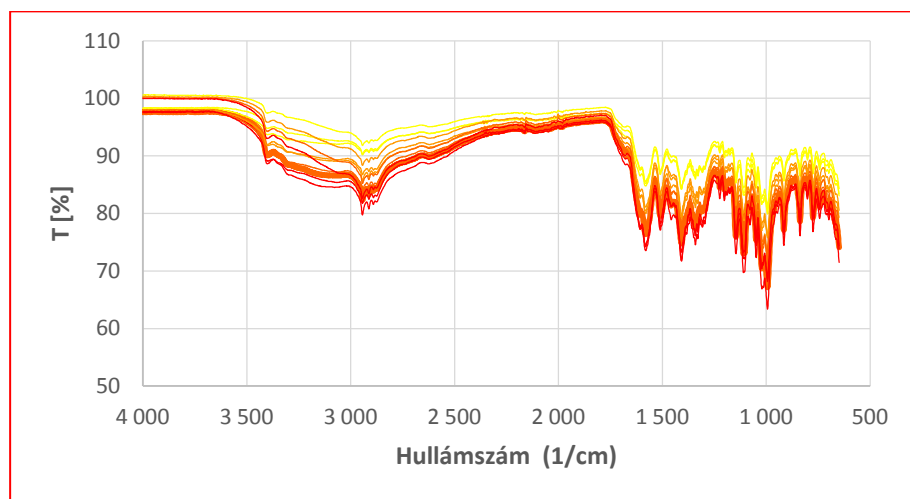
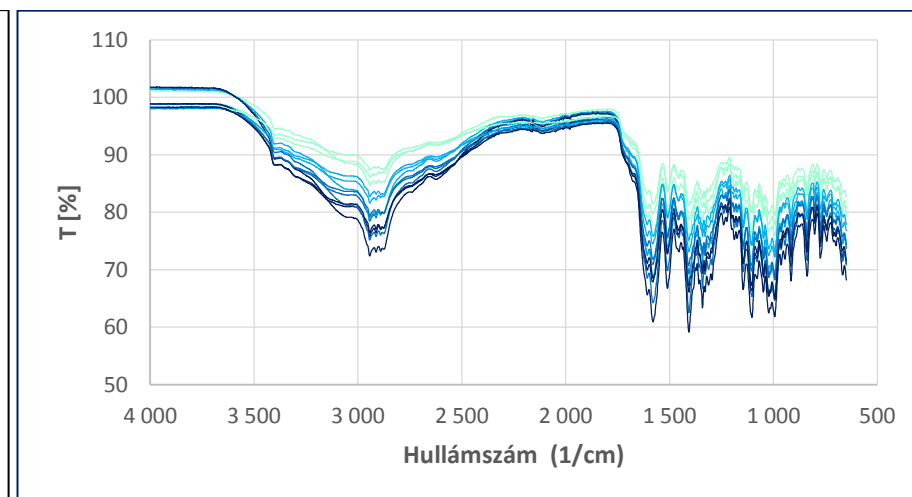
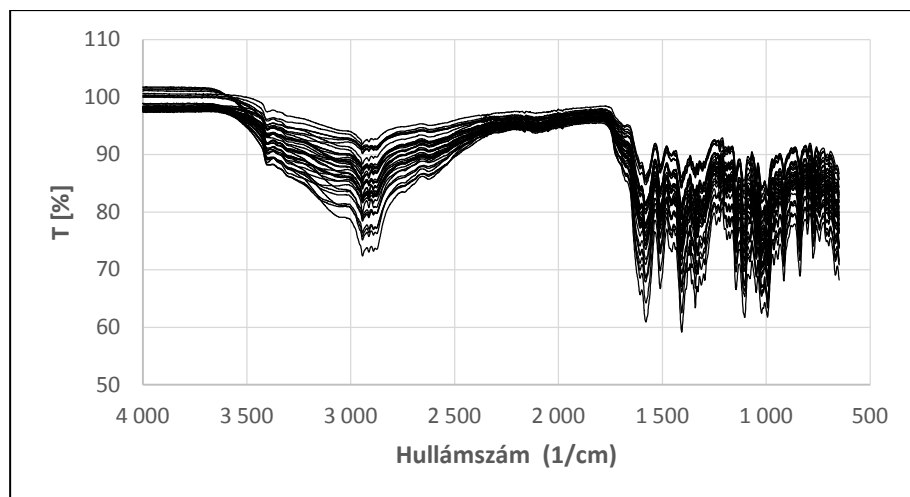
statisztikailag nem értelmezhető. A vizsgálat alapján az 1. főkomponens leírja a mintapopulációt jellemző változékonyság közel 100%-át, a 2. komponens pedig a maradék, elhanyagolhatóan kicsi részét. A program csak az értékek kerekítése miatt adta a kiírt szélsőséges eredményeket.

Az FT-IR PCA képén nem tapasztalhatunk elválást, a mintacsoportok véletlenszerűnek tűnő szóródást mutatnak. Az általunk alkalmazott ATR technika érzékeny a minta inhomogenitására, mivel a közép infravörös tartományú sugárzás csak a minta igen kicsi, pár μm -es rétegével kerül kölcsönhatásba. Ha az evanescens térbe a tápoldatpor egyik komponensének nem eldolgozott szemcséje kerül, az a spektrumra komoly hatással lehet. Inhomogén minta esetében más mintakezelési technika (pl. spektrumfelvételt megelőző aprítás, keverés) vagy más mérési elrendezés alkalmazása (pl. kálium-bromid pasztillázás után transzmissziós spektrum felvétele) lehet célravezető. Természetesen ezen esetekben is számolni kell egyéb, nem kívánatos hatásokkal: keverés során pl. szétosztályozódás, KBr pasztillázás esetén a nagy nyomóerő miatt pl. átkristályosodás történhet.

Az 1# tápoldatporból 3 sarzsából is rendelkezésünkre bocsátottak kezeletlen mintákat. Az ezekről felvett FT-NIR és FT-IR spektrumok alapján készült PCA-k eredményét láthatjuk a 13. ábrán. A különböző sarzsok már kezeletlen spektrum esetében is viszonylagos széttartást mutatnak, az analízisekben láthatunk kiugró (*outlier*) mintákat a zöld színnel jelölt csoportban, az FT-NIR elemzésnél pedig a kék jelzésű sarzs egyértelműen elkülönül a másik kettőtől. Ennél a mintánál azt tapasztaltuk, hogy színében és állagában is eltért a többitől, barnább árnyalatú, és csomós volt. A tétel (azaz Lot.) számok alapján arra következtettünk, hogy valószínűleg ez a legrégebbi a három sarzs közül, és a hosszú idejű tárolás okozhatott változásokat spektroszkópiai jellemzőin.

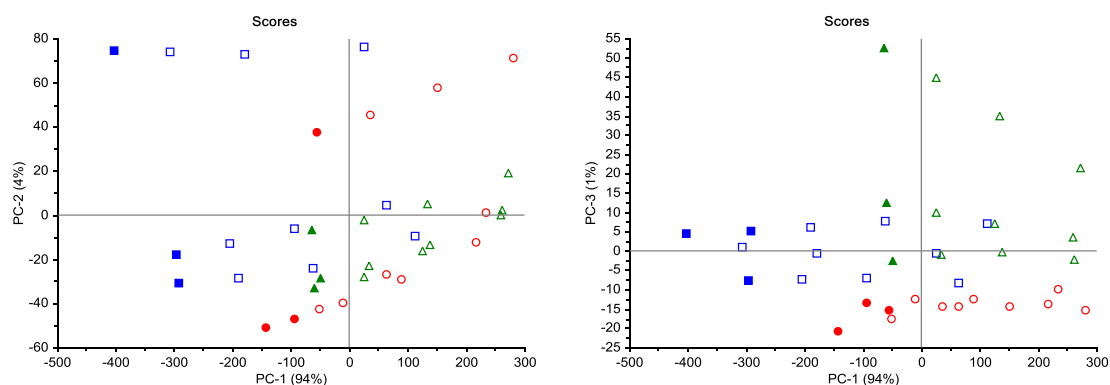


13. ábra: Az 1# tápoldatpor különböző (A, B, C) sarzsaiból származó minták FT-NIR spektrumai alapján készített PCA score plot-ok (balra: 1. és 2. főkomponens; jobbra: 1. és 3. főkomponens)



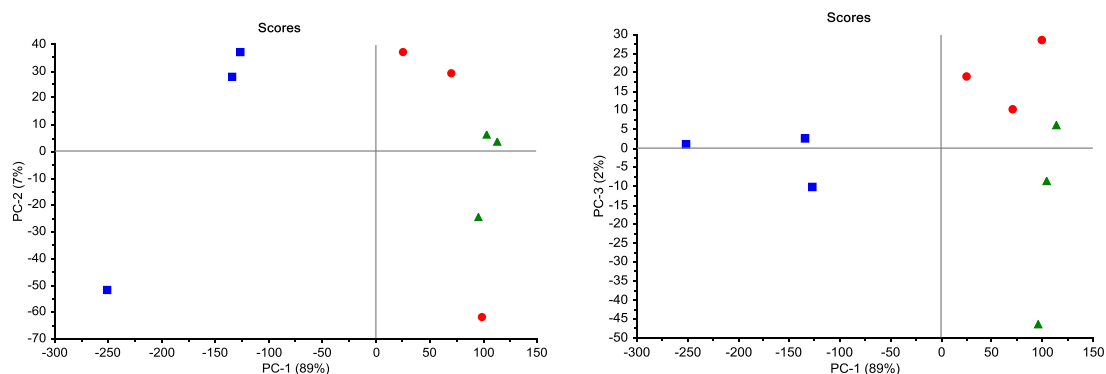
14. ábra: A nyomóerő optimalizálásának érdekében mért FT-IR spektrumok. (bal fent: az összes minta spektruma; jobb fent: A sarzs spektrumai; bal lent: B sarzs spektrumai; jobb lent: C sarzs spektrumai; a színárnyalat sötétítése a nyomóerő szintjének növekedését jelzi: 25 N, 50 N, 75 N, 100 N)

A minta az ATR kristályra történő préselés során állagváltozást szenvedhet, így az alkalmazott nyomóerő spektrumokra gyakorolt hatását is érdemes megvizsgálni. A 14. ábraán bemutatott FT-IR spektrumok négy különböző nyomásértéken (25, 50, 75 és 100 N) 3-3 ismétléssel lettek le mérve. Ezek PCA kimeneteivel kapott *score plot*-okat mutatja a 15. ábra.



15. ábra: Az 1# tápoldatpor különböző (A, B, C) sarzsaiából származó minták FT-IR spektrumai alapján készített PCA *score plot*-ok (balra: 1. és 2. főkomponens; jobbra: 1. és 3. főkomponens). A teli szimbólumok jelzik a 100 N nyomóerő alkalmazása mellett felvett spektrumok eredményeit.

A spektrumok a legnagyobb, 100 N-os rászorítás mellett mutatták a legjobb csúcsintenzitás értékeket, s mivel a spektrum karakterisztikájában (csúcsok számában, arányában) nem következett be állagváltozásra utaló változás a nyomóerő függvényében, ezért a továbbiakban ennek alkalmazását láttuk célravezetőnek. Ezzel a nyomóerővel felvett spektrumok alapján készített PCA elemzést mutatja a 16. ábra. A kék jelzésű sarzs itt is jelentős elkülönülést mutat a másik két sarzsból származó mintáktól.



16. ábra: A 3 különböző (A, B, C) sarzsból származó minták 100 N nyomóerő alkalmazásával felvett FT-IR spektrumainak PCA *score plot*-jai

Bár az előkísérleteket az 1# tápoldaton végeztem, időközben felmerült, hogy a fő kísérletsorozathoz a nagyobb mennyiségben rendelkezésre álló és a Richter Gedeon Nyrt. számára üzletileg is relevánsabb tápoldatport használjam. Az előzetes vizsgálatok során a 2# tápoldatport csak a tervezett legnagyobb, 70 °C-os 13 órás kezelésnek tettem ki. Ez a minta stabilabbnak bizonyult az 1#-nél, színváltozása a nagymértékű hőterhelés ellenére is alig volt észlelhető, oldódási képessége kifogástalan maradt így alkalmasnak bizonyult a kísérletsorozatban való felhasználásra (a továbbiakban elhagyom a megkülönböztető jelzését).

Ezen felül érdemesnek láttuk alkalmazni a diszperziós VIS-NIR készüléket is a felhasznált spektroszkópai módszerek között, mivel a szín változása jó indikátora lehet a por minták állagromlásának, ezt pedig a látható tartományon nyert spektrumokkal vizsgálhatjuk.

4.2. Referencia eredmények kiértékelése

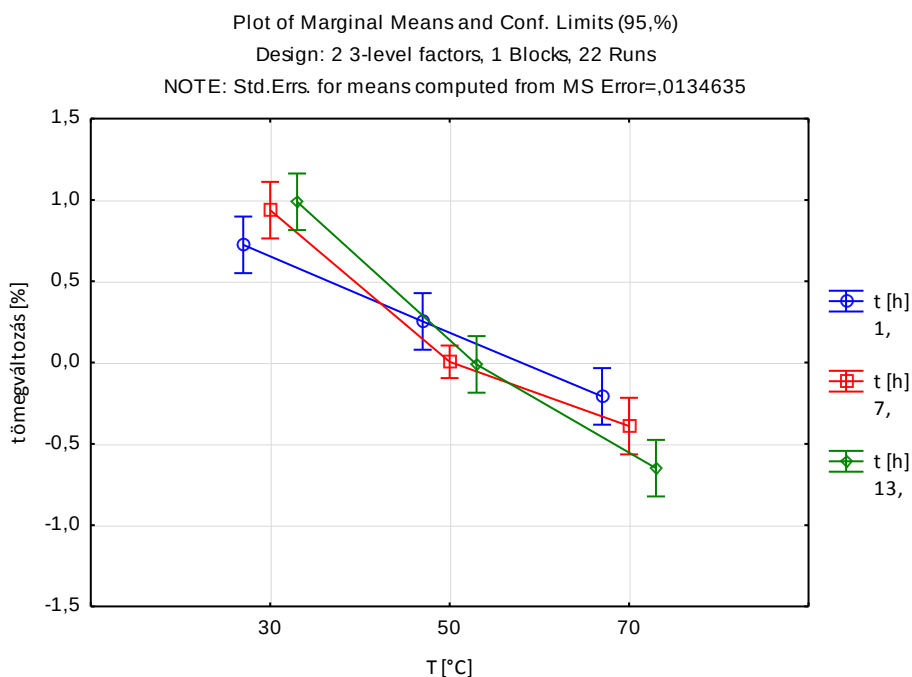
4.2.1. A hőkezelés során tapasztalható tömegváltozás értékelése

Ahogy az *Anyagok és módszerek* fejezetben (3.1 *A vizsgálati minták előkészítése*) is ismertettem, a tápoldatpor mintákat nyitott Petri-csészében, szárítószekrényben hőkezelttem, ezért a kezelések előtt és után szükségesnek láttam tömegmérést végezni az esetleges tömegváltozás számszerűsítése érdekében. A minták kezelés előtti és utáni tömegének különbségét a kezelés előtti tömeggel elosztva kapott százalékos tömegváltozás értékekkel számoltam. Mivel az IR mérésre készülő porokat és a tápoldat készítésre szánt mintákat külön edényben (de egy időben) raktam a szárítószekrénybe, így minden kísérleti ponthoz két tömegváltozási adatot kaptam.

A két faktor szerinti csoportokban tapasztalt százalékos tömegváltozási átlagokat mutatja az 17. ábra. A kép jól tükrözi, hogy az eltérő hőmérsékleti szinteken más változás történt: a 30 °C-on kezelt minták tömege növekedett, a 70 °C-on csökkent, míg az 50 °C-on tartott minták (az 1 órás kezelés kivételével) a tömeg gyakorlatilag nem változott, a 0% körül ingadozó értékeket adták.

Az értékekre ANOVA vizsgálatot végeztem (*Melléklet I. tábla*). Az eredmények azt mutatják a hőmérséklet lineáris és négyzetes tagja egyaránt szignifikáns hatású, az idő csak lineáris hatásában szignifikáns az előbbieknél magasabb ($p=0,036$) elsőfajú hiba mellett, továbbá a két faktor lineáris kölcsönhatása is jelentős. A négyzetes tagokat tartalmazó kölcsönhatások az elsőfajú hiba 5%-os megengedett valószínűsége mellett nem szignifikánsak. Az illesztett lineáris kölcsönhatásokat tartalmazó modellhez tartozó

koefficiensek alapján megállapíthatjuk, hogy a felsorolt szignifikáns hatások mindegyike negatív irányú, tehát a hőmérséklet és a hőkezelés idejének növelésével a tömegváltozás csökken.



17. ábra: A hőkezelt minták százalékos tömegváltozásának átlaga és szórása két faktor szerinti bontásban

Az ANOVA vizsgálat feltételeinek meglétét grafikusán vizsgáltam (Melléklet I. tábla). A *Normal Probability Plot*-on a pontok viszonylag jól illeszkednek az egyeneshez, a reziduumok számított és valós értékeit ábrázolva pedig nem látunk szisztematikus elrendeződést vagy valamely irányban megmutatkozó növekedést. Ezek alapján elfogadom a normalitás és homoszkedaszticitás feltételeinek teljesülését.

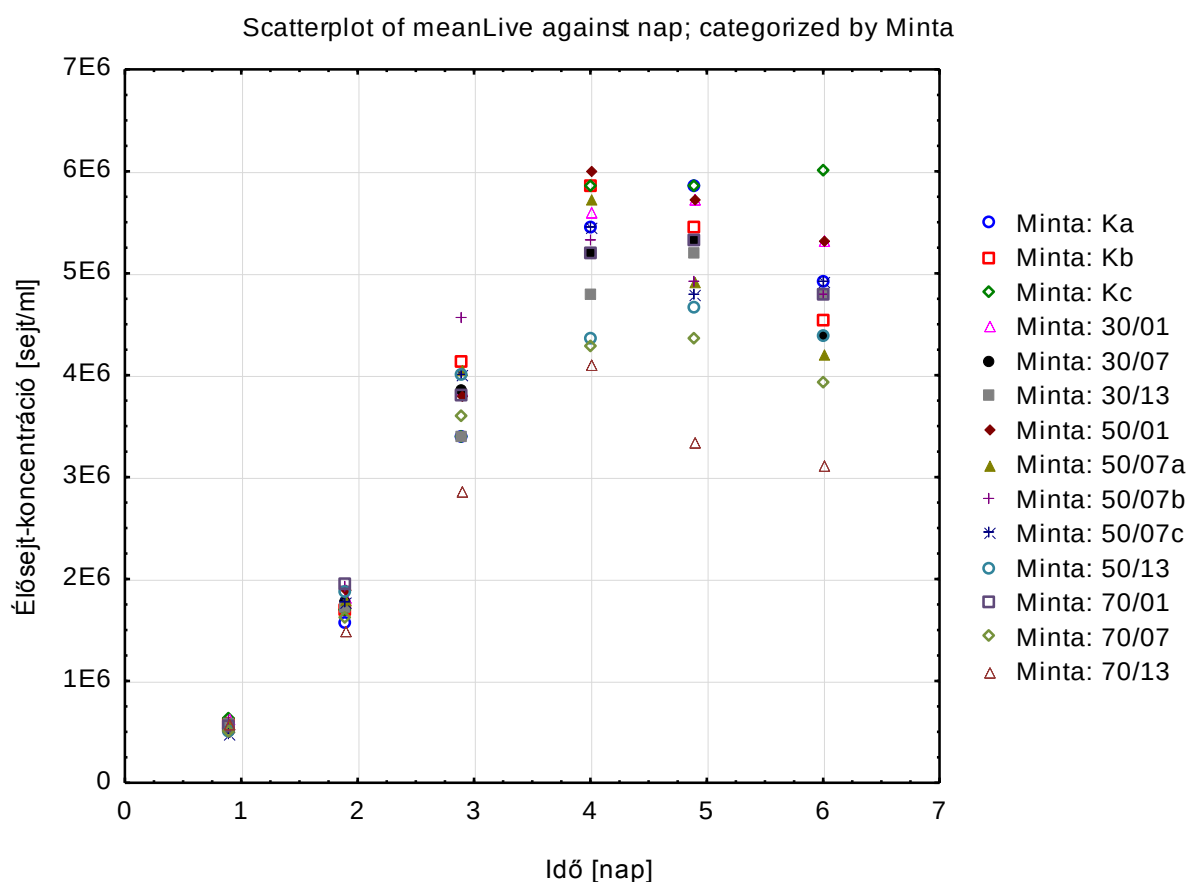
Az emlős sejtes fermentációknál felhasznált tápoldatporok általános összetételét ismerve a kísérleti terv hőmérsékleti tartományában nem számítottam illékony komponens vagy bomlástermék távozására, illetve légköri gáz abszorpciójára. A tömegváltozás valószínűsíthetően a nedvességtartalom változásából ered: a 30 °C-on kezelt porok higroszkópos szemcséi vizet adszorbeáltak a levegőből, míg a 70 °C-ra melegítettek a hő hatására kiszáradtak. Ha ez a feltételezés helytálló, akkor az infravörös spektrumok a vízcsúcsok rezgési tartományaiban tükrözni fogják a nedvességtartalomból adódó eltéréseket.

Mivel az infravörös spektrum ilyen összetett rendszerben nem ad információt a porok szervesetlen komponenseinek (pl. karbonátok, szulfátok stb.) változásáról, a kezeletlen mintán differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) mérést tervezünk elvégezni a tápoldatpor

hőbomlási folyamatainak nagyobb hőmérsékleti tartományra kiterjedő, pontosabb megismerése érdekében.

4.2.2. Az élősejt-koncentráció változásának értékelése

A tápoldatok minőségének jellemzésére a benne tenyésztett sejtek koncentrációja és a koncentráció lefutási görbéje gyakran alkalmazott mutató. A 11 hőkezelt mintám és 3 kezeletlen kontroll felhasználásával készített rázatott lombikos szuszpenziós sejttenyészetekben mért élősejt-koncentrációk átlagát mutatja a 18. ábra. A lombikok inokulálását követően 1 és 2 nap múlva a kép alapján nem tűnik jelentősnek az egyes minták közötti eltérés, a 3. naptól kezdődően viszont egyre nagyobb különbségeket láthatunk, a 70 °C-on 13 óráig kezelt minta pedig jól elkülönül a többitől.

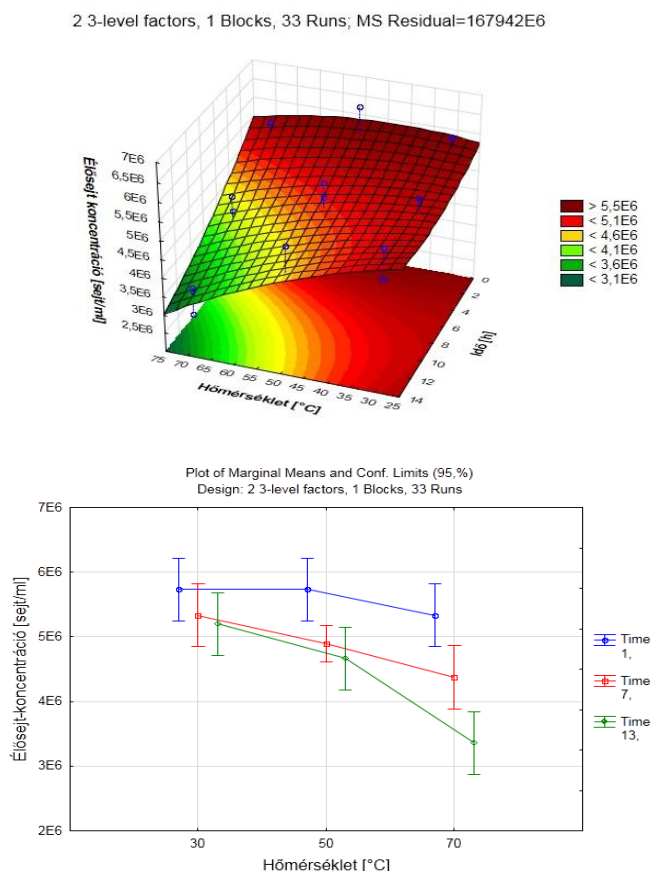


18. ábra: A mintákból készített tápoldatokban az inokulálást követő 6 napban mért élősejt-koncentrációk átlag értékei.

A részletesebb statisztikai vizsgálatot a hőkezelt minták lombikjaiban 5. napon mért élősejt-koncentrációk alapján végeztem, mivel itt a növekedési görbe a stacioner fázisánál tart. Ezek szolgáltak a későbbiekben bemutatott IR spektrumokon alapuló mennyiségi kalibráció referencia értékeként is. Az ANOVA vizsgálat eredményei alapján a hőmérséklet és az idő lineáris tagja, illetve ezek kölcsönhatása szignifikáns ($\alpha=0,05$), koefficienseik alapján hatás negatív irányú (*Melléklet II. tábla*).

Az ANOVA vizsgálat eredményeinek elfogadása előtt grafikusan ellenőriztem az alkalmazási feltételeinek teljesülését (*Melléklet II. tábla*). A reziduumok ábrája alapján igazoltnak látom a varianciák azonosságát, a *Normal Probability Plot*-on pedig – bár sajátos elrendeződést mutatnak – a pontok a jelzett egyenes körül ingadoznak, így a normalitás meglétét is elismerem.

A kapott modellre felületillesztett ábrát készítettem, mely a csoportonkénti átlagok ábrájával együtt jól szemlélteti a hőmérséklet és az időtartam hatását a tápoldatporok sejtenyésztési lehetőségére (19. ábra). Nagyobb hőterhelés hatására csökken a porból készített tápoldatban elérhető sejtkoncentráció, mely egy gyógyszerhatóanyag előállítása vagy egyéb fermentációs folyamat során jelentős veszteségeket okozhat.



19. ábra: a hőkezelt mintákból készített tápoldatokban 5. napon mért élősejt-koncentrációk alapján készített felületillesztett ábra (*fent*) és a csoportonkénti átlagok ábrája (*lent*).

A kísérletterv megalkotásakor (lásd: 3.1.1 *Kísérletterv*) úgy terveztem, hogy a 30 °C-on 1 órát melegített mintát "kvázi-nullpontnak" tekintem, amennyiben tulajdonságai statisztikailag igazoltan nem különböznek a kezeletlen kontroll mintáktól. Bár a tömegváltozás mérésekor (lásd: 4.2.1 *A hőkezelés során tapasztalható tömegváltozás értékelése*) ez az előzetes elvárásom megcáfolódott, a minta egyéb paramétereit is szerettem volna megvizsgálni ebből a szempontból.

A kontrollok és a 30 °C-on 1 órán át kezelt minta összehasonlításához az összes többi mintából számított szórás értékeket is felhasználó – tehát nagy szabadsági fokkal rendelkező – kontraszt analízist alkalmaztam. A vizsgálat nullhipotézise:

$$H_0: \mu_{30/01} = \mu_K$$

ahol $\mu_{30/01}$ a 30 °C-on 1 órán át kezelt mintával készített rázatott lombikos tenyészlet élősejt-koncentrációjának várható értéke, μ_K pedig a kontroll mintákhoz tartozó várható érték. Mivel a két csoportban eltérő számú mérési eredményünk van (a hőkezelnél 3, míg a kontrollnál 9), az ortogonalitás feltétele nem teljesül. Ezért a 3 kontroll minta eredményeit külön kezelve (μ_{Ka} , μ_{Kb} , μ_{Kc}) módosítottam a nullhipotézist:

$$H_0: \mu_{30/01} = \mu_{Ka} = \mu_{Kb} = \mu_{Kc}$$

amelynek a következő logikailag független hipotézisek felelnek meg:

$$H_0^1: \mu_{30/01} = \mu_{Ka}$$

$$H_0^2: \mu_{Kb} = \mu_{Kc}$$

$$H_0^3: \mu_{30/01} + \mu_{Ka} = \mu_{Kb} + \mu_{Kc}$$

Ahogy a 3. táblázat is mutatja, ezzel a megoldással teljesül a kontrasztgyűjtők ortogonalitása:

$$\sum_i \frac{c_{ik}c_{il}}{p_i} = 0 \quad (k \neq l)$$

ahol p_i az i -edik csoportban mért ismétlések száma, és c_{il} illetve c_{il} a k -edik valamint l -edik összehasonlításhoz tartozó i -edik kontrasztok. Mivel $p_i = \text{konstans}$, az előbbi ezzel a feltétellel egyenértékű:

$$\sum_i c_{ik} c_{il} = 0 \quad (k \neq l)$$

3. táblázat: A kontrasztanalízis során vizsgált 3 összehasonlítás kontrasztgyűjtőit

i	μ_i	c_{i1}	c_{i2}	c_{i3}	$c_{i1}c_{i2}$	$c_{i1}c_{i3}$	$c_{i2}c_{i3}$
1	$\mu_{30/01}$	1	0	1	0	1	0
2	μ_{Ka}	-1	0	1	0	-1	0
3	μ_{Kb}	0	1	-1	0	0	-1
4	μ_{Kc}	0	-1	-1	0	0	1
	Σ	0	0	0	0	0	0

Az 3. táblázaton bemutatott kontrasztgyűjtőkkel elvégeztem az analízist (*Melléklet III. tábla*). A program által végzett próbák eredménye mindhárom kontraszt vizsgálatra $p > 0,05$ értéket eredményezett, a nullhipotéziseiket és a belőlük következő H_0 összetett hipotézist elfogadom. A statisztikai elemzés feltételeinek vizsgálatára készített reziduum ábrák megfelelő képet mutatnak, ezek alapján elfogadom a varianciák egyenlőségének és a normalitás feltételének teljesülését

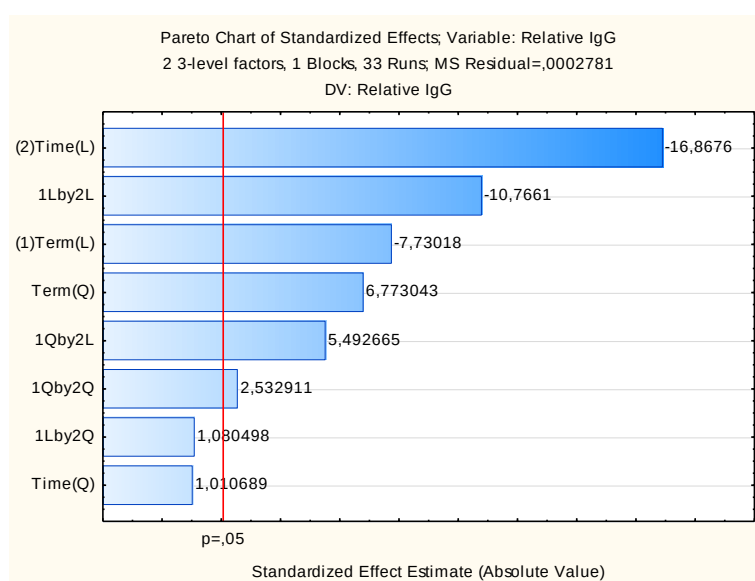
A statisztikai értékek alapján az eredmények nem mondanak ellent annak, hogy a 30 °C-on 1 órát melegített mintából készített tápoldatban a kontroll mintákkal azonos élősejt-koncentráció érhető el az 5. napra. A hőkezelt minták 5. napi sejtkoncentrációjának vizsgálata alapján pedig megállapíthatjuk, hogy mind a hőmérséklet, mind annak időtartama és lineáris kölcsönhatásuk is jelentős negatív hatást gyakorol.

4.2.3. A termelt rekombináns fehérje koncentrációjának értékelése

A rázatott lombikos vizsgálat során általam felhasznált CHO sejtvonalat mAb termelésére használják. Mivel az előző pontban bemutatott statisztikai elemzések alapján a hőhatás megmutatkozott az 5. napi élő sejtek koncentrációjában, kézenfekvőnek láttam megvizsgálni, ezek az eltérések milyen mértékűek a sejtek által termelt rekombináns fehérje koncentrációjában. Ennek érdekében a lombikokból 6. napon vett minták 3 ismétléssel lemerít

mAb (IgG) koncentráció relatív* értékeit ANOVA elemzésnek vettem alá (Melléklet IV. tábla).

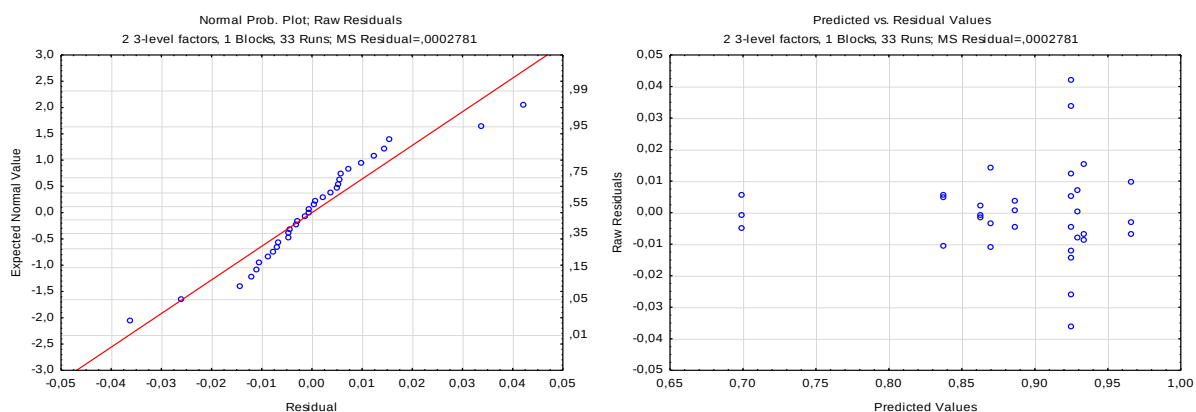
A négyzetes kölcsönhatásokat is vizsgáló ANOVA a hőmérséklet lineáris és négyzetes tagját, az idő lineáris tagját és ezek kölcsönhatásait is szignifikánsnak találta ($\alpha=0,05$). A két faktor négyzetes tagjainak szignifikáns kölcsönhatását meglepőnek találom, hiszen az idő négyzetes tagjának és a hőmérséklet lineáris tagjával való kölcsönhatásának esetében $p>0,05$. A lineáris hatások és kölcsönhatások negatív, míg a négyzetes tagokat tartalmazó hatások pozitív koefficienssel rendelkeznek. Az átláthatóság kedvéért ezeket Pareto-diagramon ábrázolom (20. ábra).



20. ábra: A hőkezelt mintákból készített lombikokban 6. napon mért mAb koncentrációk alapján számított hatások Pareto-diagramja.

A reziduumok ábrája viszont azt sugallja, hogy nem teljesül a normalitás és a konstans variancia feltétele, a pontok elhelyezkedése a várt egyenestől eltérő rendszerezettséget mutat (21. ábra).

* A relatív értékek alkalmazása az ipari titkok védelme miatt indokolt.



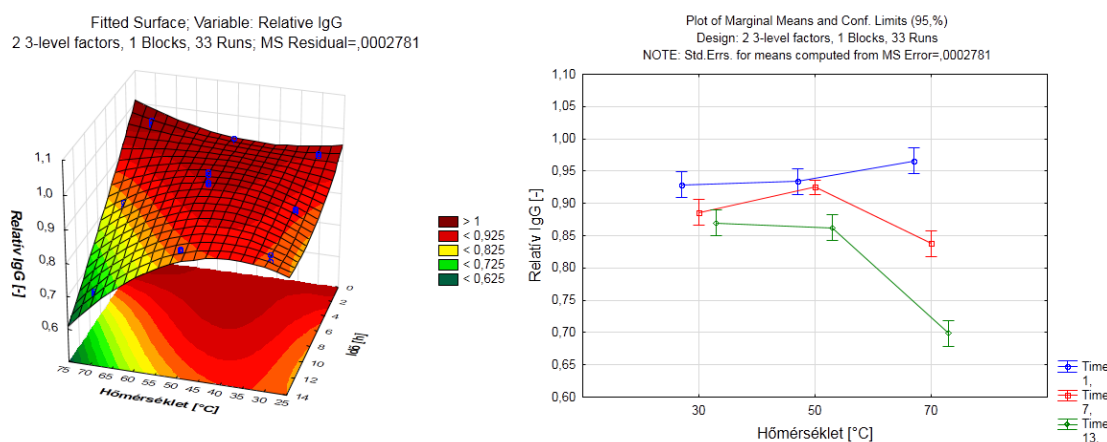
21. ábra: A reziduumok vizsgálatai az 6. napi mAb koncentrációk alapján végzett ANOVA vizsgálat feltételeinek ellenőrzésére.

Iménti sejtésemet a homoszkedaszticitás ellenőrzésére végzett Bartlett- és Levene-próba is megerősíti (*Melléklet IV. tábla*). Mindkettő esetében $p < 0,05$, tehát elutasítjuk a nullhipotézist, miszerint a varianciák megegyeznek. Az elvégzett ANOVA eredményeit fenntartással kell kezelnünk.

A varianciák stabilizálására Box–Cox-transzformációt végezhetünk, mely szerint, ha a variancia arányos az y változó valamely hatványával ($\sigma_y \propto y^\alpha$), az α kitevőt megállapítva ellőállíthatjuk a függő változó olyan $y' = y^{1-\alpha}$ transzformáltját, amely szórásnégyzete nem függ a változó értékétől [49]. A Statistica programban található Box–Cox-transzformáció alkalmazás által javasolt transzformált értékekkel is elvégzem a normalitás és homoszkedaszticitás vizsgálatát, ami nem mutatott javulást az előzőekhez képest. Ezek alapján nem láttam érdemesnek a transzformált értékekkel is végrehajtani az ANOVA elemzést.

Térjünk vissza ismét az eredeti értékeken végzett Bartlett- és Levene-próba, valamint az ANOVA eredményeihez (*Melléklet IV. tábla*). A varianciák konstansságát vizsgáló próbák esetén p : 0,015–0,025 közötti, amely nincs távol a 0,05 konvencionális értéktől. Ezek közül is a Levene-próba $p=0,025$ értéke mond többet, hiszen ez kevésbé érzékeny a normalitástól való eltérésre, mint a Bartlett-próba. Ha azt is figyelembe vesszük, hogy a megállapított főhatások és lineáris kölcsönhatás mindegyikénél $p < 10^{-6}$, továbbá az idő lineáris és a hőmérséklet négyzetes tagjának kölcsönhatása is meglehetősen kicsi érték ($p=1,2 \cdot 10^{-5}$), ilyen mértékű szignifikanciát elfogadhatunk. A két négyzetes tag kölcsönhatása jóval közelebb áll a 0,05 értékhez ($p=0,018$), ennek esetében nem beszélhetünk egyértelműen igazolt hatásról. Továbbá, mivel több hipotézist is vizsgálunk, az elsőfajú hiba valószínűsége inflálódik. Ha a teljes elemzésre kiterjedően tartani kívánjuk az $\alpha=0,05$ értéket, akkor az egyenkénti

összehasonlításoknál kisebb α megválasztása szükséges, így a kérdéses kölcsönhatást nem ítélem szignifikánsnak. A hatások meglétének könnyebb vizualizációját segíti a 22. ábra.



22. ábra: A hőkezelt mintákból készített lombikokban 6. napon mért relatív mAb koncentrációk alapján készített felületillesztett ábra (*balra*) és a csoportonkénti átlagok ábrája (*jobbra*).

A heteroszkedaszticitás fennállása a kontroll és a 30 °C-on 1 óráig kezelt minta összehasonlítását is megnehezíti. Ennek ellenére úgy döntöttem, az előző pontban leírt sejtkoncentráció értékekkel végzett kontraszt analízissel azonos módon elvégzem a vizsgálatot (a kontraszttegyütthatók értékét lásd a 3.2 fejezet 3. táblázatában). Az eredmények részletesebben a *Mellékletben* találhatóak (IV. tábla).

Az elemzés alapján a mAb koncentrációban eltérést láthatunk a kontrollok és a legkisebb hőterhelést kapott minta között. Az F -próba esetében és a $\mu_{30/01}$ és μ_{Ka} értékeket vizsgáló t -próba esetében $p < 0,00002$. A második kontraszt nem szignifikáns, hiszen két kontroll minta került összehasonlításra. A pontosabb megismerés kedvéért Fisher-LSD *post-hoc* vizsgálatot is végeztem (a táblázatot a kiterjedése miatt nem közlöm). A kontroll minták egymás közötti p értékei magasak ($p > 0,5$), míg a 30 °C-on 1 óráig melegített mintákkal alkotott páros vizsgálatok során $p < 0,00005$. Bár az eredmények fenntartással kezelendők az alapfeltételek teljesülésének hiányában, a kontrollok és a legkisebb hőterhelésnek kitett minta közötti eltérés meglétét elfogadom.

A fentiek alapján igazoltnak látom, hogy mind a hőmérséklet, mind a hőkezelés időtartama jelentős hatást gyakorol a porok felhasználása során elérhető mAb koncentrációra, tehát ronthatja a fermentáció kitermelését.

4.3. Spektrális adatok kiértékelése

Az előállított 11 hőkezelt minta és 3 kezeletlen kontroll tápoldatport a 3.3. *Infravörös spektroszkópiai mérések* alfejezetben ismertetett három különböző spektrométerrel vizsgáltam mérésenként 3-3 ismétléssel. A keletkezett eredmények 3 nagy hullámhossz tartományt (VIS, NIR, IR) magukba foglalnak, a NIR tartományban pedig két különböző mérési technikával (diszperziós és Fourier-transzformációs) és detektorral (PbS és InGaAs) rendelkező spektrométert alkalmazva végeztem méréseket. Az így keletkezett nagy mennyiségű adat lehetőséget ad a hőkezelt tápoldatpor spektroszkópiai tulajdonságainak részletes feltérképezésére.

A spektrumok elemzése során a VIS tartomány ismertetésével kezdve haladok a kisebb energiájú NIR és FT-NIR, majd FT-IR tartomány felé, bemutatva a kezeletlen, a normált és a derivált spektrumokon tapasztalt jellegzetességeket. Ezt követően kiértékelésre kerülnek a minőségi meghatározásnál alkalmazott klaszteranalízis (CA) és főkomponensanalízis (PCA), továbbá a mennyiségi kalibráció (PLS) eredményei.

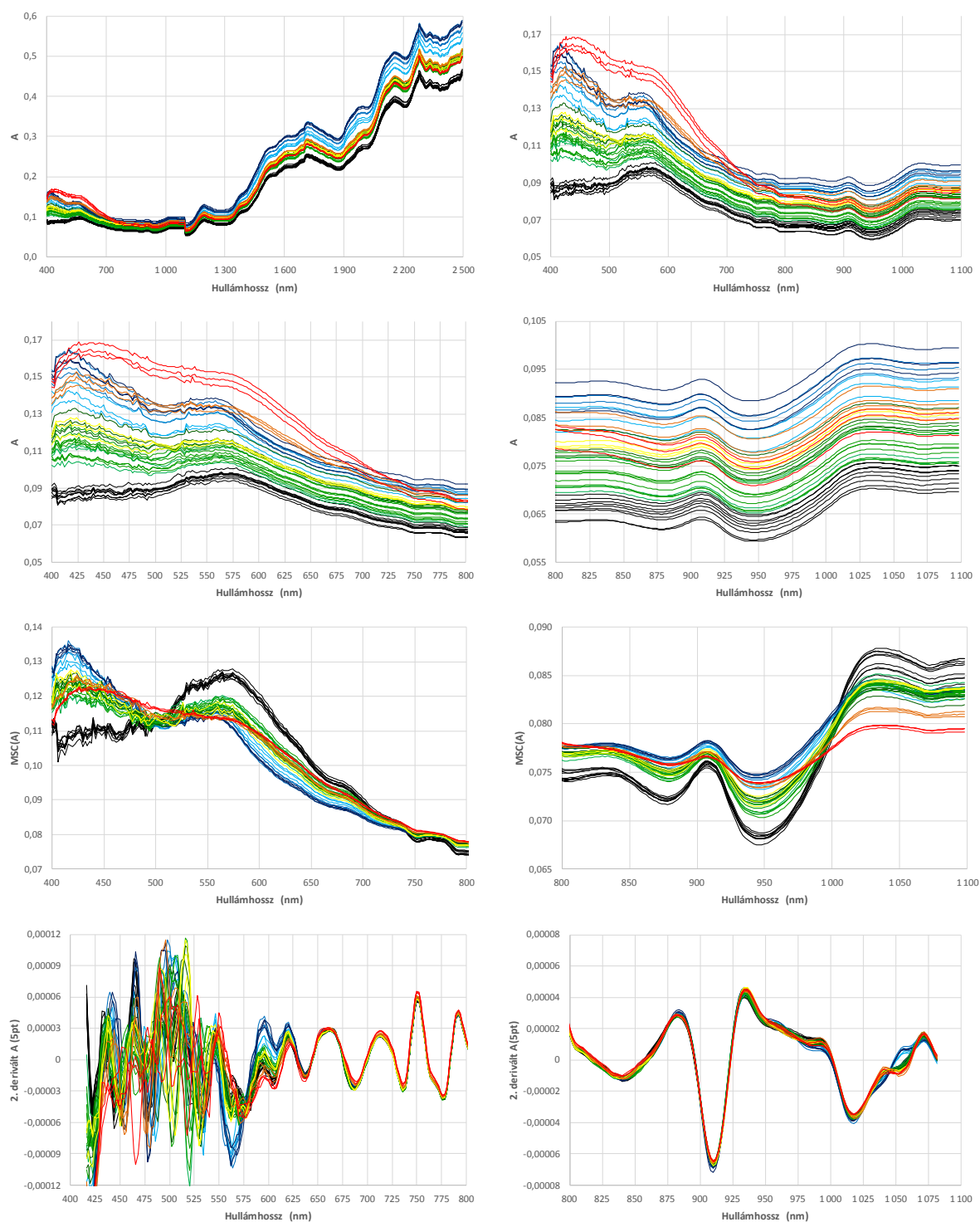
4.3.1. A diszperziós VIS-NIR készülék Si detektorának régiójában kapott spektrumok kiértékelése (400–1100 nm)

Az általam használt diszperziós VIS-NIR készülék a látható és közeli infravörös tartományban egyidejűleg mér. 400–1098 nm között Si, míg 1100–2500 nm-en PbS detektor működik (karakterisztikájuk ábráját lásd a 3.3 fejezet 7. ábráján).

A látható fény régiójából a 400–800 nm hullámhossz tartományban kapunk információkat. Ebben főleg a fizikai jellegekből – színből és szemcseméretből – eredő változékonyság kerül előtérbe. A mintáim esetében ezek a tulajdonságok kiemelt szereppel rendelkeznek, hiszen a hőkezelés során bizonyos csoportoknál enyhe színváltozást és csomósodást tapasztaltam. A 800–1100 nm közötti szakaszt már a NIR tartományhoz soroljuk (olykor már a 700 nm-t NIR tartománynak nevezik), amelyben a harmadik felhangok jelei dominálnak, köztük a metil-, metilén-, hidroxil- és aminocsoportok is megszólalhatnak. Ezenfelül a színből és szemcseméretből eredő különbség alapvonal-eltolódás formájában jelentkezik.

A mintákra kapott teljes VIS-NIR spektrum, a Si detektorhoz tartozó 400–1100 nm-es régió, alattuk a 400–800 nm és 800–1100 nm szakaszok és matematikai transzformáltjaik

(MSC és simított 2. derivált) a 23. ábraán láthatóak. Az MSC kezelés sikeresen eliminálta az alapvonal-eltolódást, így mindkét régióban kiemelődnek az eltérő amplitúdójú hullámok.



23. ábra: A diszperziós VIS-NIR készülékkel felvett teljes spektrum (400–2500 nm), a Si detektorral mért tartomány (400–1098 nm), VIS régió (400–800 nm), NIR régió (800–1098 nm) és utóbbi kettő MSC, illetve második derivált transzformáltjai.

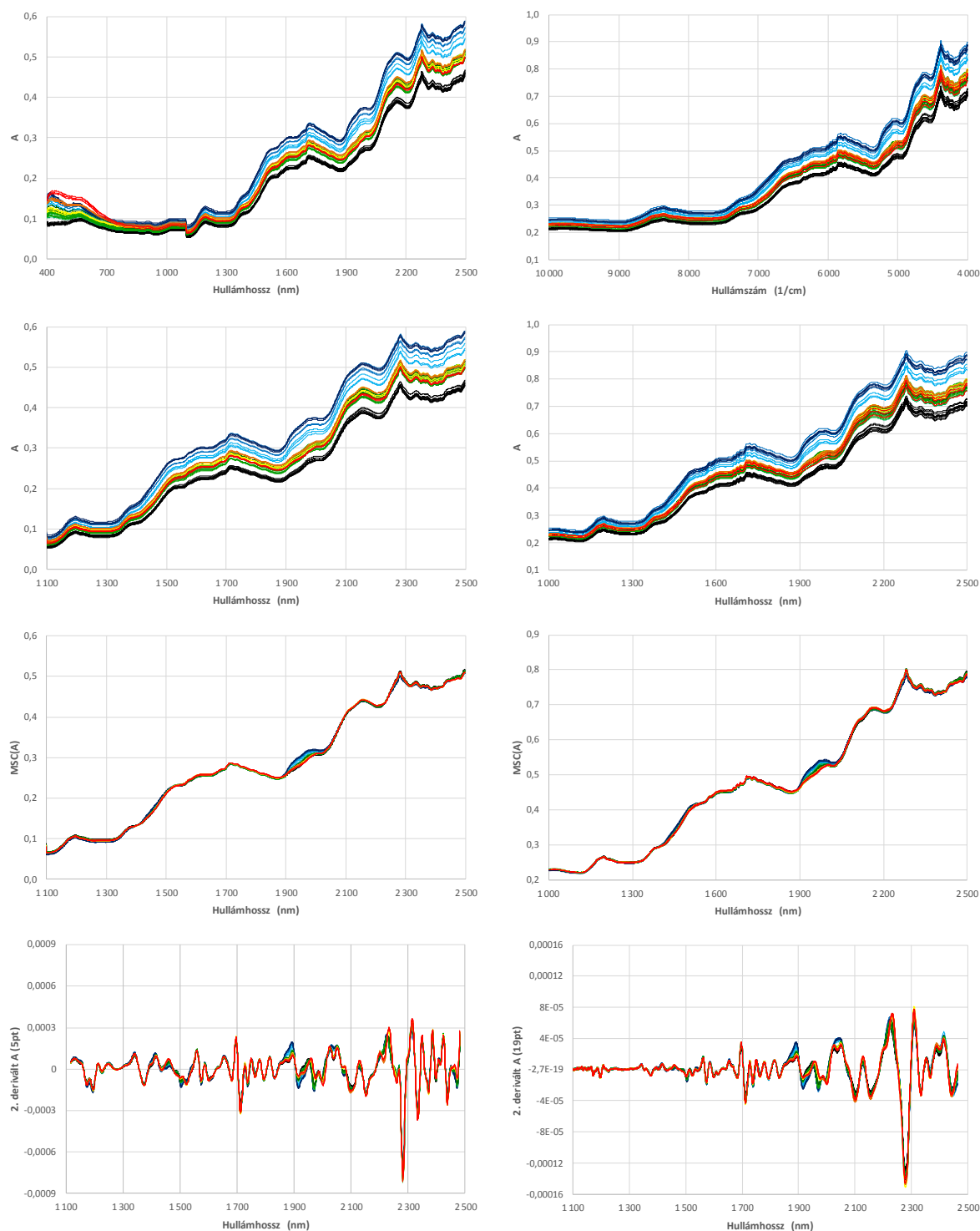
A VIS spektrumok 400–550 nm-ig terjedő része a detektor karakterisztikájából adódóan nagyon zajos, melyet a 2. derivált még jobban kiemel. Az alapspektrumon a szemcseméret különbségből eredő alapvonal-eltolódást láthatunk. Az MSC spektrumon pedig erősen megmutatkozik, hogy a kezeletlen kontrolltól származó spektrumok elkülönülnek a többtől. A hőkezelt minták színváltozást szenvedtek, ~410 nm-nél nőtt az elnyelésük (ibolyaszín tartománya), míg ~520 nm-nél csökkent (ciánkék és zöld szín közötti hullámhossz érték). Ez az eredetileg csontfehér pornál szemmel alig észrevehető, rózsaszín irányú elváltozásként mutatkozott meg.

A 800–1100 nm közötti NIR tartományban látványos az alapvonal-eltolódás. A kezeletlen por sima, homogén állagú volt, míg hőkezelés után különböző mértékű csomósodást tapasztaltam, a legmorzsalékosabb állagot pedig a 30 °C-on kezelt porok érték el. Ezek a spektrumok mutatják a legnagyobb eltolódást a kontroll mintákhoz képest. Az MSC normált spektrumok képén a VIS-hez hasonlóan itt is látjuk a kontroll minták elkülönülését, a hőkezelt minták csúcs-amplitúdói csökkentek, a 70 °C-on 13 órát hevített minta spektruma jelentősen ellaposodott.

4.3.2. A diszperziós VIS-NIR és az FT-NIR spektrométerrel kapott NIR spektrumok elemzése (1100–2500 nm)

Lehetőségem volt a NIR tartományban két különböző spektrométerrel is méréseket végezni. A diszperziós és Fourier-transzformációs készülék spektrumait egymással párhuzamosan ismertetem.

A két spektrométernek eltérő az optikai elrendezése (diszperziós és Fourier-transzformációs) és a detektora (PbS és InGaAs), melynek köszönhetően eltérő tartományokban számíthatunk zajos spektrumra. Továbbá a diszperziós készülék hullámhossz szerint, nm-es skálázással, míg a Fourier-transzformációs hullámszám szerint, cm^{-1} dimenzióban haladva szolgáltat adatokat. A két mérték közötti nemlineáris kapcsolat és az adatpontok eltérő sűrűségének (diszperziós:FT=1:4) köszönhetően a két készüléktől származó spektrumok nem egyenértékűek, a matematikai kezelésekre eltérő módon reagálnak. A simítással kombinált deriválás szempontjából a diszperziós készüléknél gyakran alkalmazott 5 pontos kapu a Fourier-transzformációs spektrum 19 pontos kapuméretének feleltethető meg, így a kiértékelés során ezeket mutatom be.

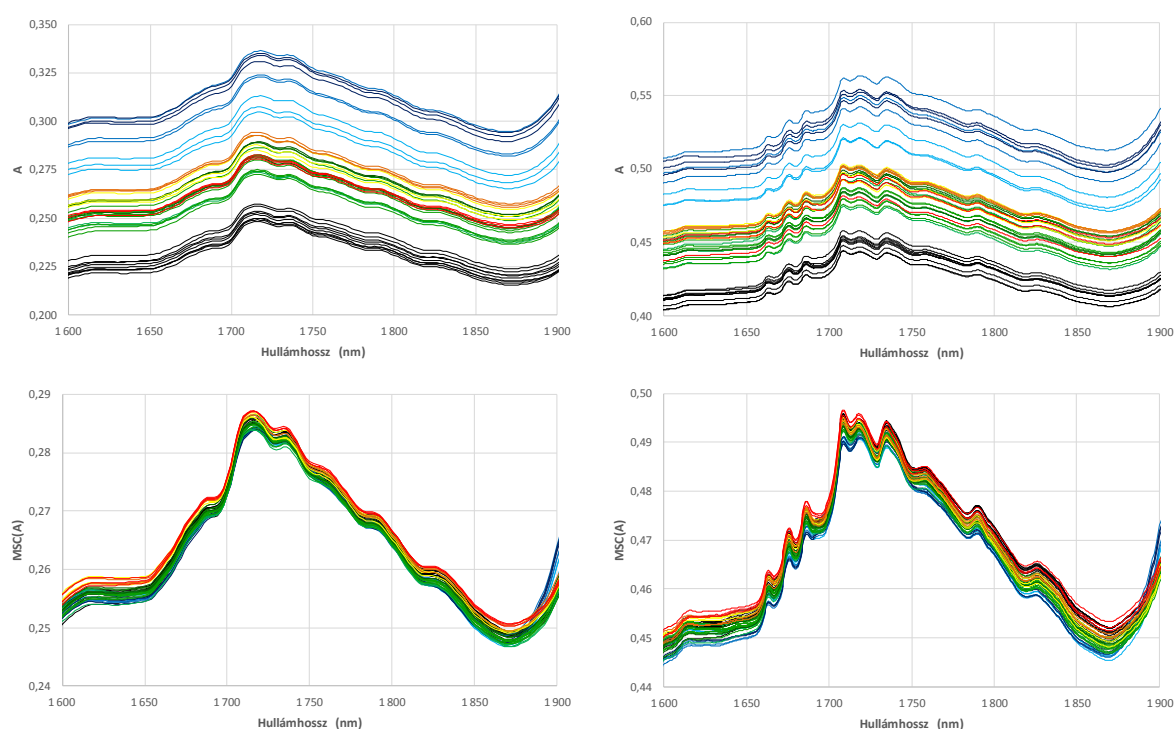


24. ábra: A diszperziós NIR (*balra végig*) és FT-NIR (*jobbra végig*) spektrumok és transzformáltjaik. Felülről lefelé haladva: a készülékek által felvett teljes spektrum, a *nm* skálázású NIR spektrumok, MSC kezelt spektrumok, végül a második derivált spektrumok.

A két spektrométertől származó kezeletlen spektrumokat, a *nm* szerint skálázott NIR régióikat (1100–2500 nm, illetve 1000–2500 nm) és ezek MSC és 2. derivált transzformáltjait mutatja a 24. ábra. Az alapvonal-eltolódás mindkét spektroszkópnál jelentős, az egyes mintacsoportok nagyjából megegyező sorrendben távolodnak a kontroll minta spektrumától.

A NIR tartományban ez a torzulás legtöbbször a szemcseméret hatásának tudható be. Ahogy a VIS spektrumok esetében is láthattuk, a morzsalékos állagú, 30 °C-on 13 órát hőkezelt minta eltolódása a legnagyobb.

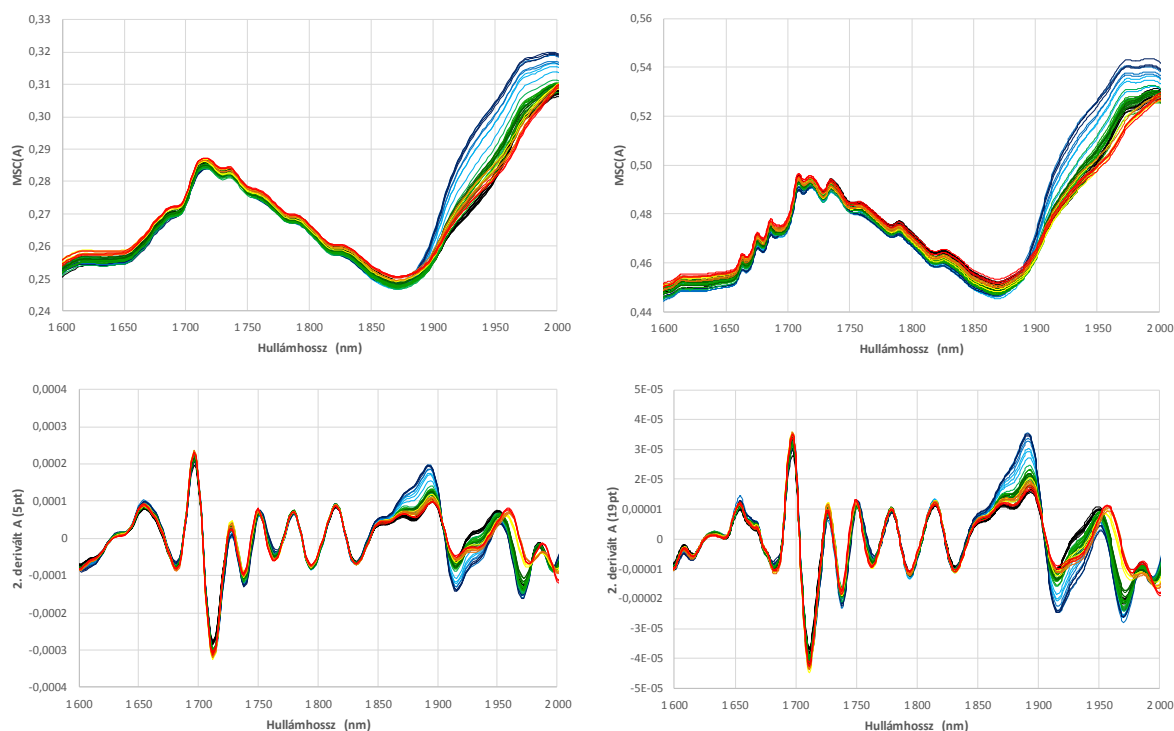
Az FT-NIR spektrum abszcissza tengelyének reciprok viszonyú $\text{cm}^{-1} \rightarrow \text{nm}$ átalakítása a spektrum átrendeződését eredményezi: a kisebb hullámhossz tartományokon összenyomódik a spektrum, míg a nagyobb hullámhosszakon széthúzódik. A diszperziós készülékéhez hasonló spektrumokat kapunk, melyen leginkább csak a csúcsok élessége különbözik. Ez jól megfigyelhető az 1600–1900 nm közötti szakasz cizelláltságában (25. ábra). Ez az első felhangok jellemző régiója, ahol C–H kötések is megszólalnak.



25. ábra: A diszperziós NIR (balra) és FT-NIR (jobbra) spektrumok 1600–1900 nm közötti szakasza, illetve MSC transzformáltjuk (alul).

A fent említett szakasz különbözősége a 2. derivált spektrumokon már nem olyan kifejezett, az 1600–1700 nm-es szakaszt leszámítva hasonló a derivált lefutása (26. ábra). Ez jól mutatja, hogy bár a NIR alapspektrum elkentebb, összeolvadó csúcsokat tartalmaz az 1700–1850 nm-es tartományban, a megfelelő simítóablakkal kombinált deriválás képes felbontani azt. A 26. ábraán továbbá szembe tűnő a 30 °C-on kezelt mintacsoport 1900–2000 nm közötti megnövekedett abszorbanciája, ami a derivált spektrumokon még hangsúlyosabban mutatkozik. Ezen a szakaszon található a víz egyik jellemző elnyelési sávja (az O–H kötések vegyérték- és deformációs rezgéseinek kombinációja által). A kék színnel

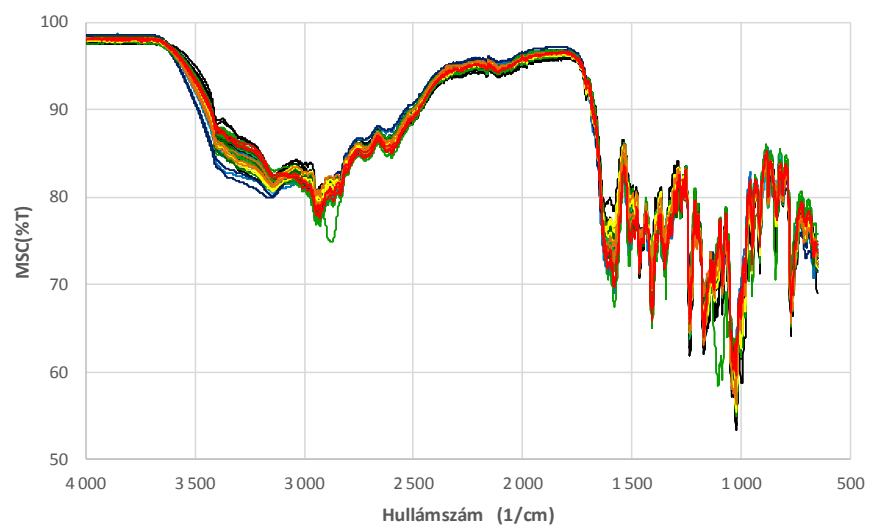
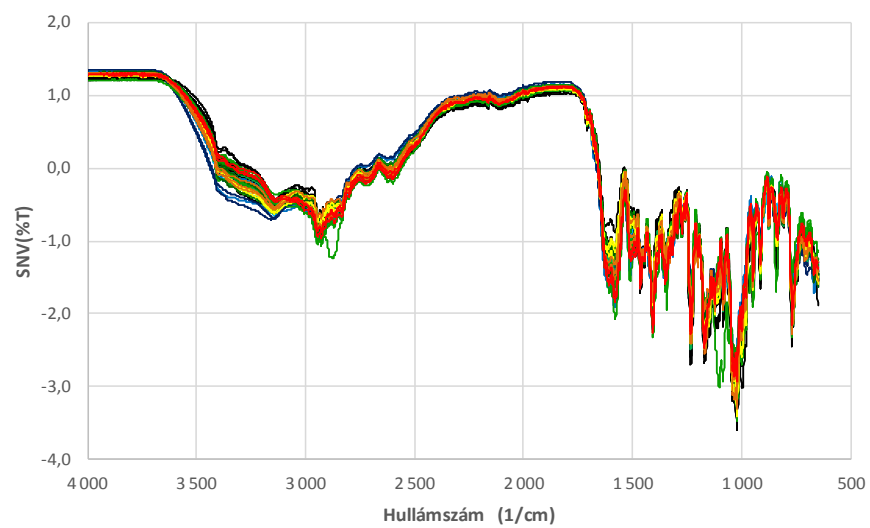
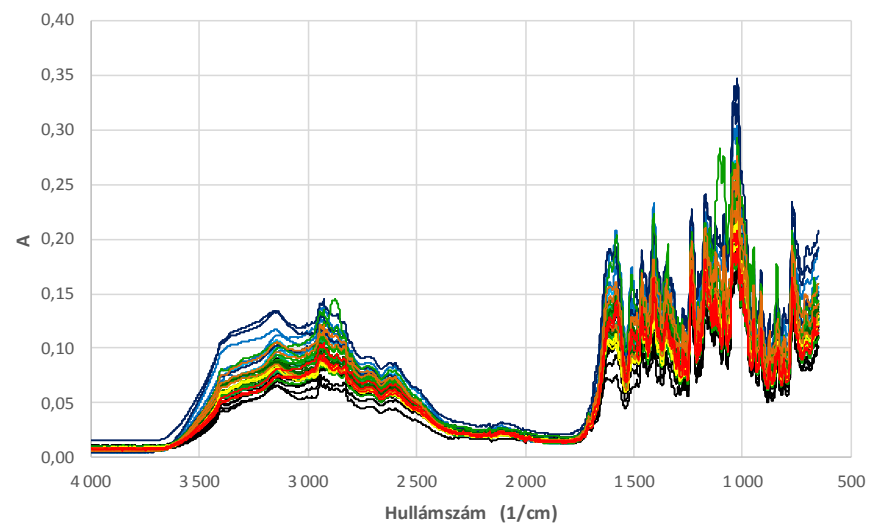
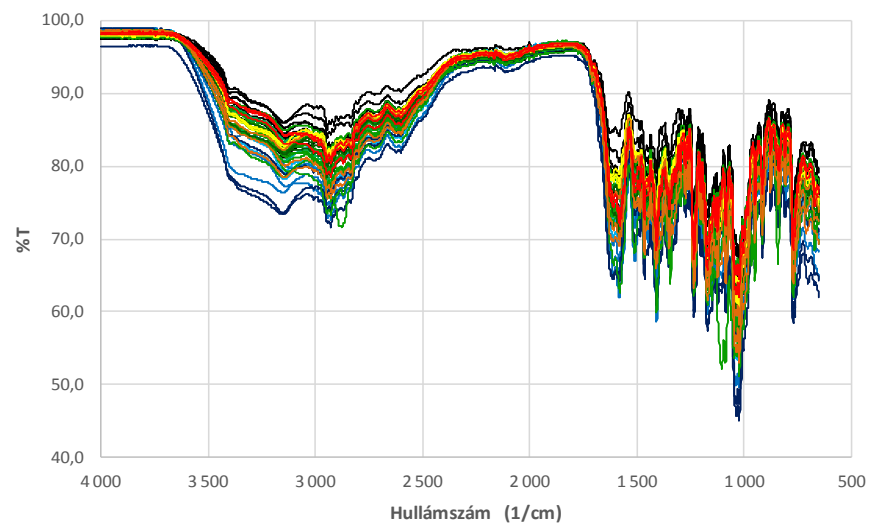
jelzett 30 °C-os kezelést kapott minták a normált és a derivált spektrumon is jól láthatóan elválnak a többi mintától, ami megnövekedett víztartalomra utal. Ezzel igazolódni látszik az a feltevés, miszerint ezeknek a mintáknak a hőkezelés utáni tömegnövekedése a nedvességtartalmuk változásának köszönhető (lásd: 4.2.1. *A hőkezelés során tapasztalható tömegváltozás értékelése*).



26. ábra: A diszperziós NIR (balra) és FT-NIR (jobbra) spektrumok 1600–2000 nm közötti szakasza, illetve második deriváltjuk (alul).

4.3.3. Az FT-IR spektrumok elemzése ($4000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$)

Az analitikai infravörös régióban a NIR-nél jól megmutatkozó fizikai tulajdonságok jóval kisebb mértékben befolyásolják a spektroszkópiai képet. Ebben az IR régióban inkább a kémiai jellegek dominálnak, a kötések rezgései éles csúcsokat eredményezve ujjlenyomatszerűen beazonosítható spektrumokat adnak. Ezen tulajdonságai miatt az FT-IR spektrumon csak zajszűrő és normáló kezeléseket szokás elvégezni, a deriválás jelentősége egy-egy dedikált felhasználásra korlátozódik. (Ilyen például az $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ közti, amid I rezgés okozta csúcs deriválással történő elemzése fehérjék másodlagos szerkezetének vizsgálata során [50].)



27. ábra: FT-NIR spektrumok %T és A értékekben megadva, illetve SNV és MSC kezelést követően.

A mintákról kapott FT-IR spektrumokat, valamint SNV és MSC transzformált változatukat mutatja a 27. ábra. A kezeltlen spektrumok az X–H vegyértékrezgések régiójában ($4000\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$), a kettőskötések régiójában ($2000\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$) és az ujjlenyomat régióban is ($1500\text{--}500\text{ cm}^{-1}$) sok csúcsot adnak. A $2500\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ spektrumszakaszon a hármas kötések rezgései jellemzőek, de itt a spektrum detektálását megnehezíti, hogy az UATR feltétben alkalmazott gyémánt-ZnS kompozit kristály ebben a tartományban kevésbé áteresztő. Ez jelen esetben a jel-zaj arány romlásában mutatkozik meg.

A zöld színnel jelölt 50 °C -on 7 órát kezelt minta egyik spektruma jelentős eltérést mutat a többitől. Ennek oka az lehet, hogy az ATR mintakezelési technika érzékeny a vizsgált anyag inhomogenitására, mivel az infravörös fény csak a minta igen kicsiny, pár μm -es részével kerül kölcsönhatásba. Ha az evanescens zónában a mérőkristályra helyezett tápoldatpor egy rosszul eldolgozott komponens szemcséje található, akkor ennek az összetevőnek a spektrális jellegei előtérbe kerülnek, így más komponensek jelét elfedve torzítják a spektrumot.

4.3.4. A tápoldatpor minták spektrumainak minőségi elemzése

A többváltozós adatelemző módszerek adatredukció útján segítenek olyan változók definiálásában, melyek a csoportok közötti változékonyságot a lehető legnagyobb hányadban leírni képesek. A megfelelő változók felhasználásával lehetségessé válik a különböző mintacsoportok elkülönítése, illetve az *outlier* minták detektálása.

A tápoldatporok esetében ez egy gyors, roncsolásmentes és költséghatékony módszert eredményezhet a felhasználás előtt álló alapanyag minősítésére. A gyógyszeripari sejtes fermentációknál többnyire sejtenyésztes felszabadító vizsgálatokat alkalmaznak, mely hosszadalmas, és jelentős anyagfelhasználással jár. Megfelelő spektroszkópai technikákon alapuló ellenőrzéssel már a tápoldatpor átvételekor meggyőződhetnénk a termék minőségéről, az egyértelműen nem megfelelő vagy károsodott alapanyag pedig a preparatív minősítés költségei nélkül visszautasítható lenne.

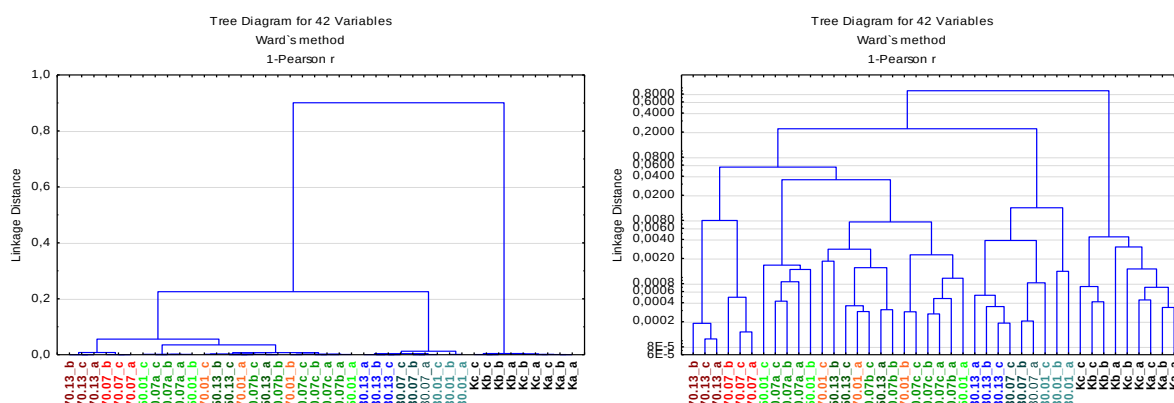
Az általam használt mindhárom készülék (VIS-NIR, FT-NIR és FT-IR) kezeltlen spektrumain klaszteranalízist (CA) és főkomponens-analízis (PCA) végeztem. Ezen felül diszperziós és az FT-NIR készülék spektrumainak simított második derivált transzformáltjait is vizsgáltam, ahol a simítókaput előbbi esetében 5 pontosnak, míg utóbbinál 19 pontosnak választottam, a rés méretét pedig mindkettőnél 1 pontos értéken tartottam.

4.3.4.1. A klaszterelemzés eredményei

A klaszterelemzés során hierarchikus módszerrel, előzetes elvárások nélküli csoportosítást végzünk, melynek eredménye egy fa-struktúrájú dendrogramon kerül megjelenítésre. Az alkalmazott objektumok közötti és csoporttávolság számító módszerek definiálását lásd: 3.4.2.1 *Klaszteranalízis (CA)*. A szerkesztett képeket a *Mellékletben* teszem közzé (V-XII. tábla), a legjobb eredményeket pedig az alábbiakban részletesebben is bemutatom.

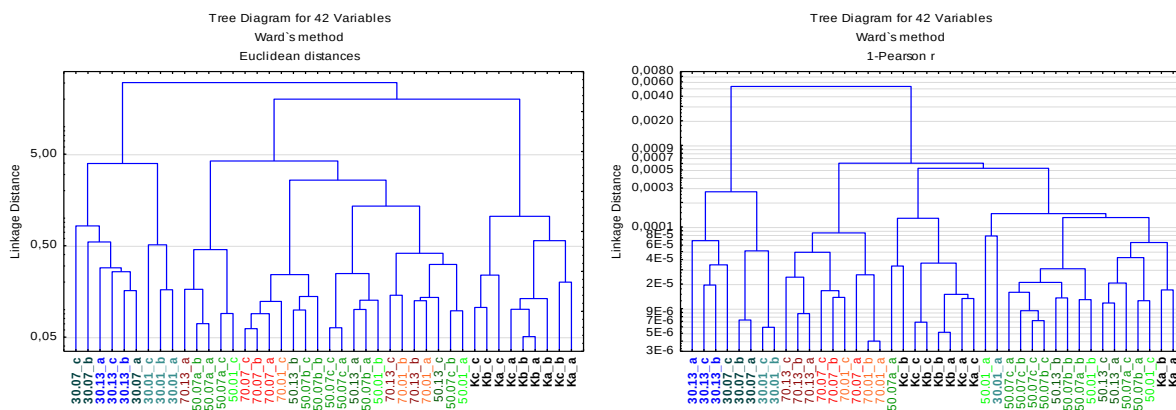
A CA eredményei már a kezeletlen spektrumok esetében is megfelelőnek mondhatóak. A VIS spektrumok alapján készített dendrogramok mindegyikén egyértelmű elkülönülést mutatnak a kontrollok a hőkezelt mintáktól, továbbá a 70 °C-nak több órán át kitett minták is külön fürtökbe rendeződnek. Az 1–Pearson R távolságokkal számoló kombinációk esetében a kontroll csoport ágazik le leghamarabb, míg az euklideszi távolságot alkalmazóknál az első elágazásban a maximális hőhatásnak kitett mintákat tartalmazó ág válik le (*Melléklet* V. tábla).

A 28. ábra a Ward- és 1–Pearson R módszerek kombinációjával létrejött dendrogramot mutatja. A magas elválási *linkage distance* értékek azt mutatják, hogy a kontrollok nagyon jól megkülönböztethetőek a többi mintától. Másodikként a 30 °C-on kezelt csoport ágazik le, ezt követik a hosszabb ideig 70 °C-nak kitett minták. Az 50 °C-on és a rövid ideig 70 °C-on tartott minták keverednek. A két faktort vizsgáló kísérleti terv miatt nehéz megítélni, ezek közül melyik milyen mértékű hőterhelésnek minősülhet, így nem lepődhetünk meg, ha bizonyos minták nem megfelelően elkülöníthetőek.



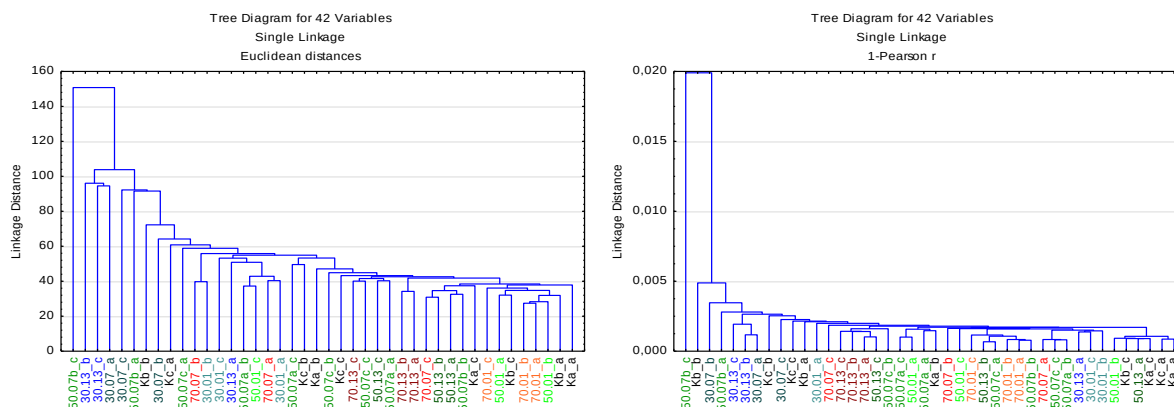
28. ábra: A VIS-NIR kezeletlen spektrumok Ward- és 1–Pearson R módszerek kombinációjával létrejött CA dendrogramja.

A FT-NIR spektrumokat felhasználó CA szintén a morzsalékosabb 30 °C-os mintákat tudta a leghatékonyabban elkülöníteni (*Melléklet* VII. tábla). Az euklideszi távolságot alkalmazó módszerek a kontrollok, míg az 1–Pearson *R*-t használóak a 70 °C-os minták elválasztására bizonyultak felhasználhatónak. Ez is mutatja, a spektrumokban rejlő információtartalom a megfelelő matematikai módszerekkel kinyerhető, a feladat pedig meghatározza, melyikük alkalmazása lesz optimális (30. ábra).



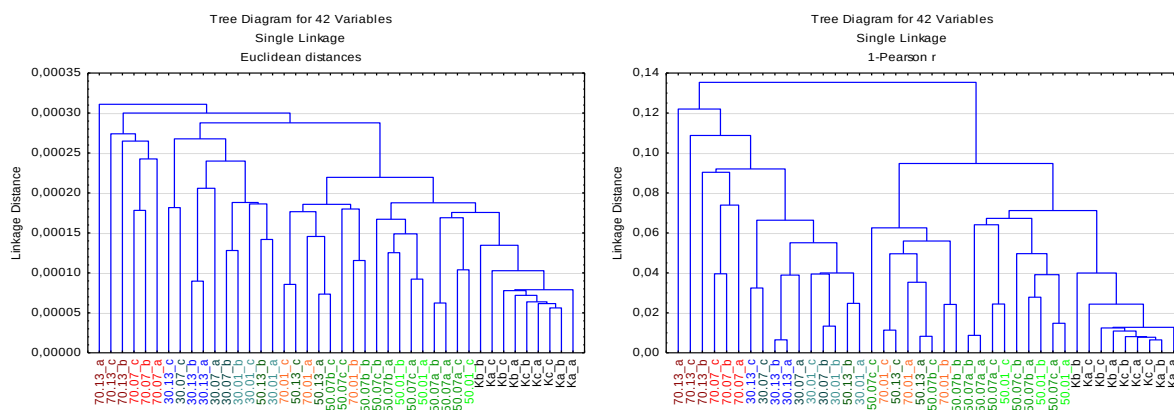
58

Az FT-IR spektrumokban nem lelhető fel azon fizikai tulajdonságok leképeződése, amely a VIS és NIR spektrumok esetében hatékonyra tette a csoportok felismerését. A CA ábrák is azt tükrözik, hogy az kezeletlen FT-IR spektrumok kevésbé alkalmasak a mintáim elkülönítésére (*Melléklet VIII. tábla*). Érdekes viszont megfigyelni, hogy az FT-IR spektrumok elemzésénél felismert *outlier* spektrum (50/07b_c) milyen jól kiválasztható a Single Linkage csoporttávolságon alapuló dendrogramokon (31. ábra). Ez példaként mutatja, hogy a CA hatékony eszköz lehet a spektrumpopuláció kilógó mintáinak elkülönítésében.



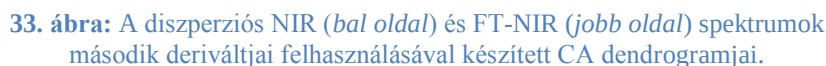
31. ábra: Az FT-IR spektrumok Single Linkage módszerrel készített CA dendrogramjai euklideszi távolságok (*balra*) és 1–Pearson *R* távolságok (*jobbra*) alapján.

A VIS spektrumok 5 pontos simítóablak felhasználása mellett képzett második derivált spektrumai az alapspektrumokhoz hasonlóan alkalmasnak bizonyultak a kontroll elkülönítésére, viszont a többi csoport esetében kevésbé egyértelmű eredményeket produkáltak (*Melléklet IX. tábla*). A deriválás során a spektrum alapvonal-eltolódása megszűnik, így az abból származó információ elvész. A por csomósodása alapján eddigiekben jól megkülönböztethető 30 °C-os csoport emiatt későbbi leágazást mutat, ahogy a kontroll minták is (32. ábra).

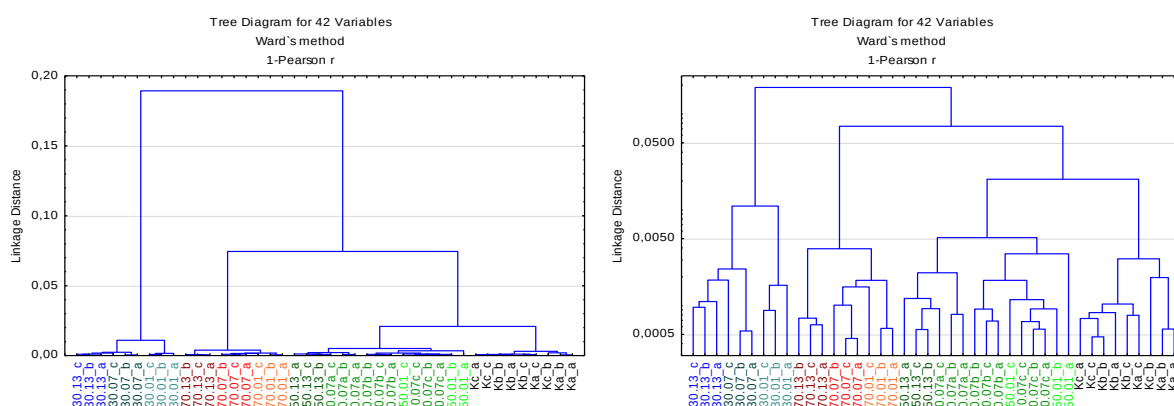


32. ábra: A VIS spektrumok második derivált spektrumai alapján készített CA dendrogramok.

A két készülék esetében a sokat emlegetett optikai elrendezésből és detektorkarakterisztikákból eredő jellegek miatt a CA során is más-más matematikai módszer lehet hatásosabb. A vizsgálataim során a derivált diszperziós NIR eredmények robusztusabbnak bizonyultak abból a szempontból, hogy ennél mind a négy matematikai kezelés kombináció tökéletes elkülönítést nyújtott a hőmérséklet szerinti csoportok között, és a hőkezelés ideje szerint is megfelelő eredményt hozott. Az FT-NIR esetében előfordulnak eltérések, de az euklideszi távolsággal kombinált Ward-módszer itt is kiemelkedően jól mutatkozik. A két készüléknél legjobbnak ítélt matematikai módszerek egymás melletti összehasonlítására ad lehetőséget a 33. ábra.



Az FT-NIR spektrumok CA elemzését Hakemeyer *et al.* tápoldat öregedési vizsgálatainál[Hiba! A könyvjelző nem létezik.] alkalmazott MSC-t követő Savitzky–Golay-simításos derivált transzformáltakkal is elvégeztem (Melléklet XII. tábla). Az eredmények a *gap-segment* esetében leírtakhoz hasonlóak, itt is a Ward-módszer adott megfelelőbb csoportosításokat, de előzővel ellentétben az 1–Pearson R távolsággal kombinálva bizonyult a legjobbnak (34. ábra). A bemutatott példában először a 30 °C-os, ezt követően az 70 °C-os minták ágaznak le, a kontrollok pedig az 50 °C-os csoporttal mutatják a legközelebbi rokonságot.

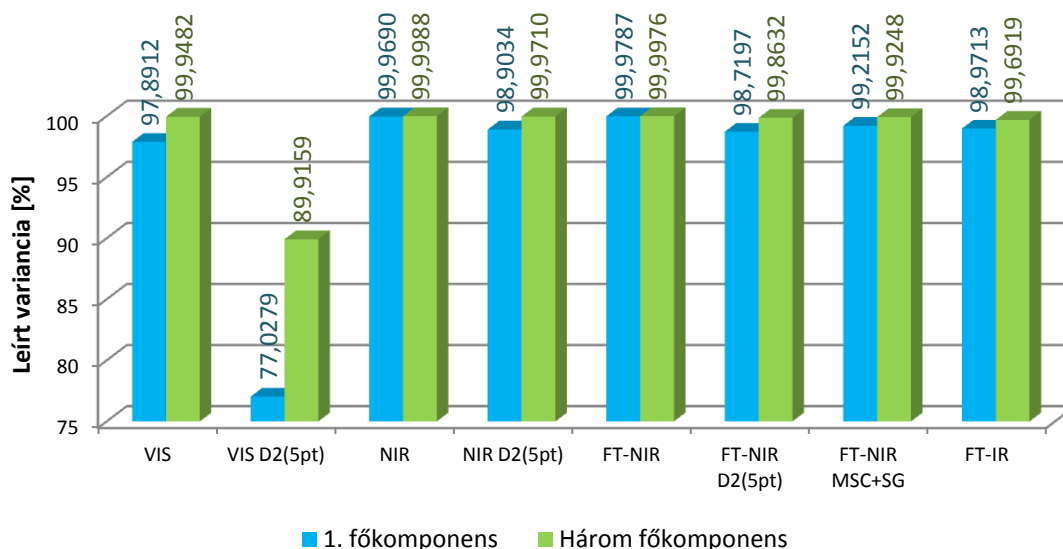


34. ábra: Az FT-NIR spektrumok MSC-t kezelt Savitzky–Golay-derivált transzformáltjai alapján készített CA dendrogram.

4.3.4.2. A főkomponens-analízis eredményei

A klaszteranalízishez hasonlóan a főkomponens-analízis esetében is a kezeletlen és derivált spektrumokra végeztem vizsgálatot. Az eredményt megjelenítő *score plot*-ok és súlyfüggvények a Mellékletben láthatóak (XIII-XXVIII. tábla), az érdekesebb ábrák az alábbiakban is bemutatásra kerülnek.

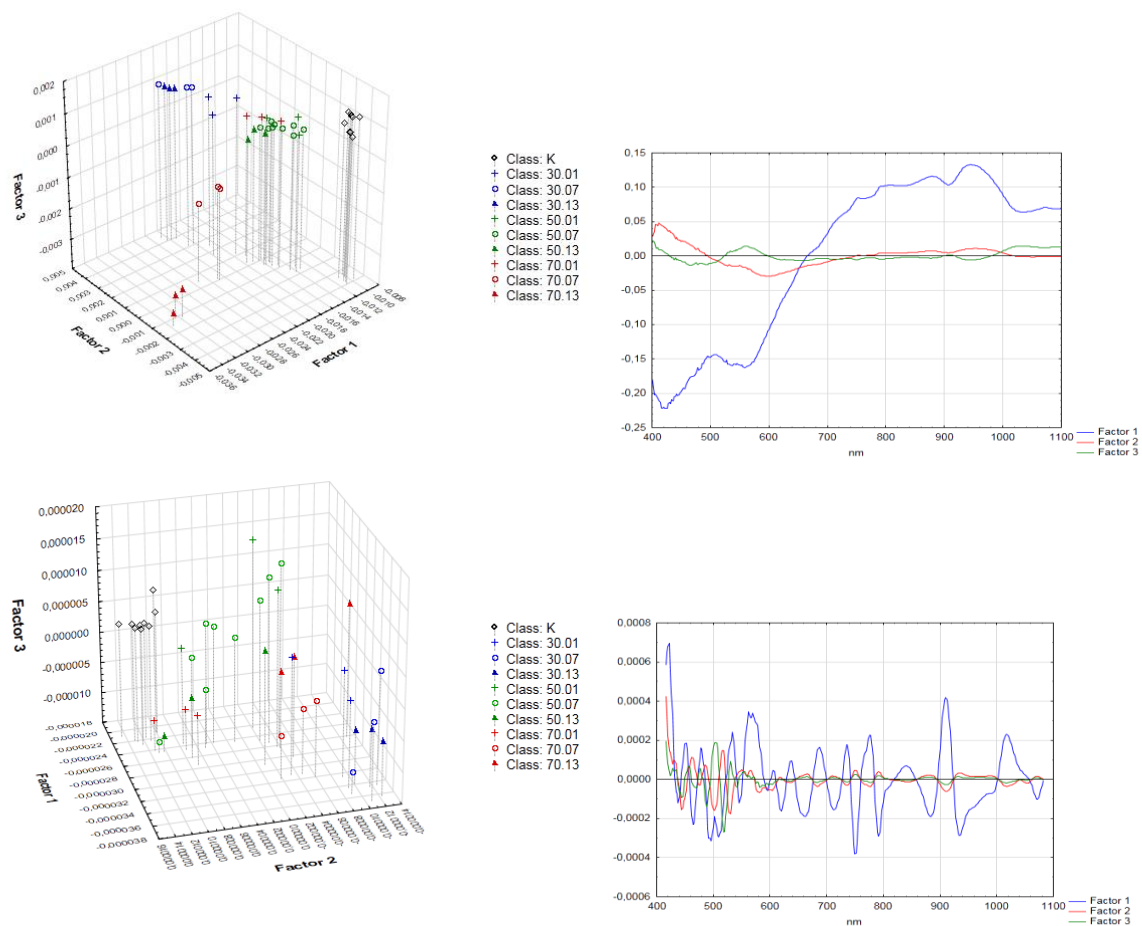
A PCA során felismert főkomponensek a legtöbb esetben képesek a variancia jelentős hányadát leírni. Ahogy a 35. ábra is mutatja, egyetlen eset kivételével az 1. főkomponensek kifejezik az ingadozás több mint 97%-át, az első három főkomponens pedig akár 99,99%-ot prezentál.



35. ábra: A PCA során kapott főkomponensek (1. főkomponens és összegzett első három főkomponens) részesedése a spektrumok leírt varianciájából.

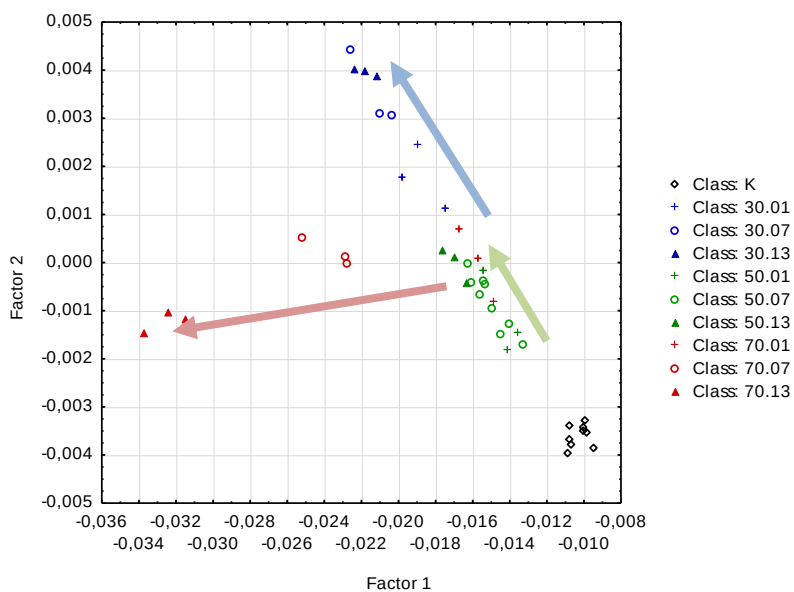
A diszperziós készülék VIS spektrumai a CA-val analóg módon, kezeletlen spektrumok felhasználásakor nyújtottak megfelelő eredményt, a deriválás pedig eliminálta a jelentős fizikai tartalommal rendelkező alapvonal-eltolódást. Ennek megfelelően a 3D *score plot* is rendezetlenebb képet mutat a deriváltak alkalmazásakor: amíg az alapspektrumok alapján készített ábrán a hőmérséklet szerinti csoportok rendeződést mutatnak, a deriváltaknál a kontroll minták kivételével jelentős keveredést láthatunk (36. ábra).

Az alapspektrumokhoz tartozó 1. főkomponens súlyfüggvénye az eredeti spektrum vízszintes tükörképére hasonlít: ez arra utal, hogy a változékonyság legnagyobb részét az alapvonal-eltolódás okozza. A második főkomponens két kiemelkedő csúccsal rendelkezik, melyek megfeleltethetőek a 4.3.1 alfejezetben bemutatott ibolya (~410 nm) és kékeszöld (~520 nm) színtartománynál jelentkező abszorbancia változásoknak. A deriváltak súlyfüggvényei sok, rendezetlenül elhelyezkedő csúccsal rendelkeznek, melyek többségében inkább a zaj eredet dominál (36. ábra).



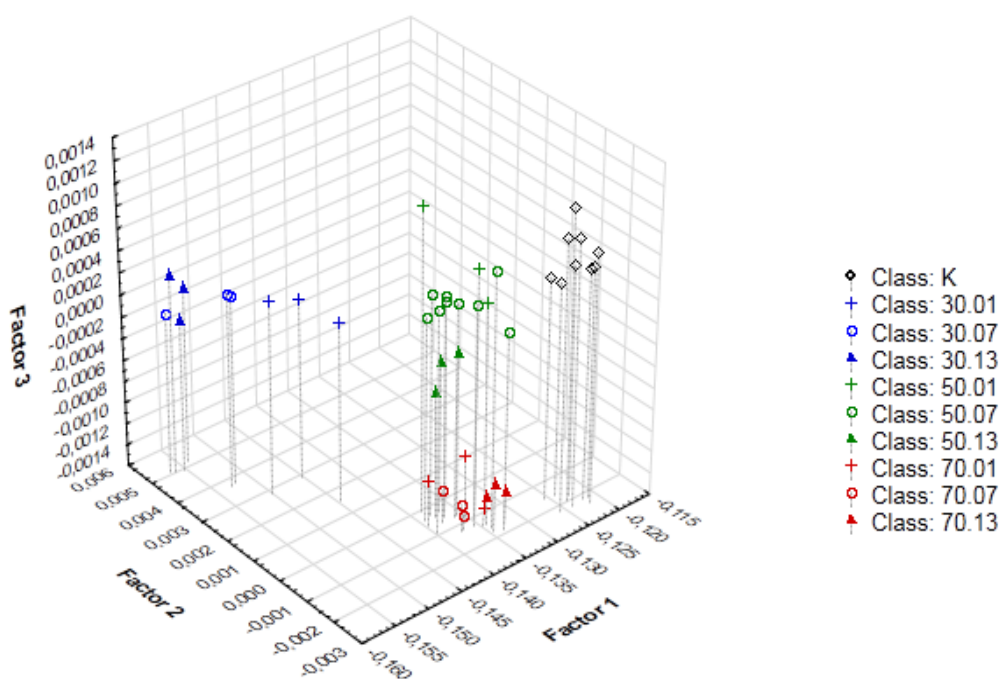
36. ábra: A VIS alapspektrumokra (fent) és második deriváltjaira (lent) készített PCA 3D score plot ábrája és a hozzá tartozó súlyfüggvények.

A VIS spektrumok 1. és 2. főkomponensei alapján készített score plot ábráján érdemes azt is megfigyelni, hogy a hőkezelés időtartama szerint a pontok jellegzetes irányú távolodást mutatnak a kontrollcsoporttól (37. ábra).



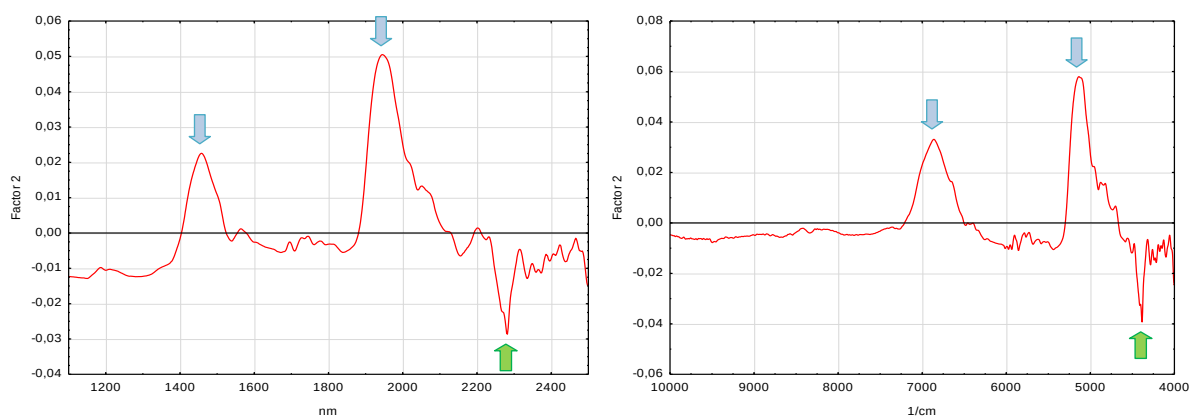
37. ábra: A VIS spektrumok 1. és 2. főkomponense alapján készített score plot ábra.

A NIR és FT-NIR alapspektrumra készített elemzések hasonló eredményeket nyújtottak, a hőmérséklet szerinti csoportok szépen elválnak a három főkomponens által meghatározott térben. A kontrolltól a 30 °C-os minták kerülnek a legtávolabb, a 70 °C-os minták pedig a 3. főkomponens értékét mutató, függőleges z-tengely irányában különülnek el az 50 °C-os csoporttól. A 38. ábra NIR spektrum alapján készített 3D score plotot mutatja.

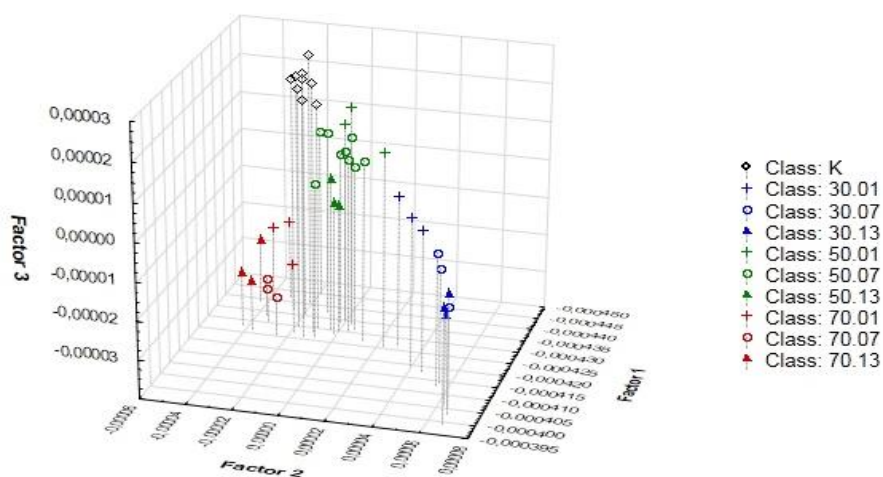
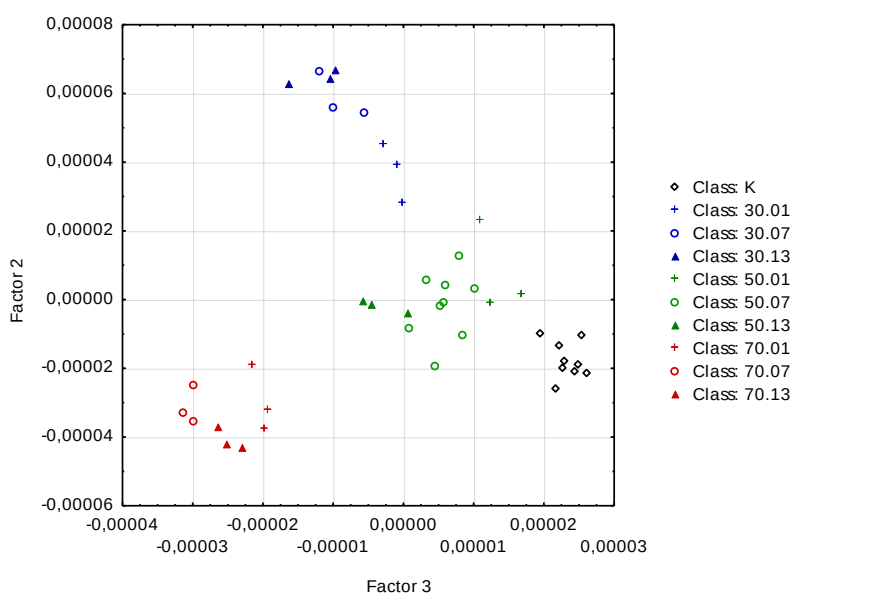


38. ábra: A diszperziós NIR spektrum alapján készített 3D score plot ábra.

Az 1. főkomponens súlyfüggvényei a fordított spektrum képét mutatják, a 2. főkomponens két nagy abszolút értékű, széles csúcsa a víz molekula elnyelési tartományait jelzi (~ 1450 nm és ~ 1900 nm), ami arra utal, hogy a spektrális változékonyságot az alapvonal-eltolódáson felül leginkább a nedvességtartalom változása okozza (39. ábra). A 2. főkomponenshez tartozó súlyfüggvényeken még egy jelentős csúcsot láthatunk 2280 nm-nél (FT-NIR esetében $\sim 4380\text{-cm}^{-1}$). Ez a pozíció megegyezik a spektrumok csúcspontjával (lásd a 4.3.2 alfejezet 25. ábraját), ahol szakirodalmi adatok szerint a metil-csoport C–H kötéseinek vegyérték- és deformációs rezgései gerjesztődnek.[51]



39. ábra: A NIR (balra) és FT-NIR (jobbra) spektrumokhoz tartozó 2. főkomponens súlyfüggvényei (kék nyíl: víz csúcsok; zöld nyíl: metil csúcs).



40. ábra: Az MSC-t követően Savitzky–Golay-derivált FT-NIR spektrumokkal végzett PCA 2D és 3D score plot ábrája.

A PCA során a derivált NIR és FT-NIR spektrumok is kiválóan bizonyultak a különböző hőmérsékletű kezelést kapott csoportok elválasztásában. Az előbbiekhöz hasonlóan a kontrollhoz a faktorok alkotta 3D térben az 50 °C-os csoport található a legközelebb, és Y alakban leágazva egymástól távol helyezkednek el a 30 °C és 70 °C-os minták (40. ábra). A súlyfüggvényeken dominálnak az előbbieken is említett vízcsúcsok, ami a tömegváltozást illető eredményekkel (lásd: 4.2.1 A hőkezelés során tapasztalható tömegváltozás értékelése) összhangban állnak: az 50 °C-os minták tömege nem változott jelentősen, míg a 70 °C-osak feltehetőleg kiszáradás, a 30 °C-as pedig a nedvességtartalom növekedése miatt ellentétes irányban változtak.

Az FT-IR spektrumok a CA-hoz hasonlóan a PCA során sem bizonyultak hatékonyak a minőségi meghatározás terén. A tápoldatpor összetett keverék, melyben egy-egy komponens mennyiségének csökkenése nehezen detektálható, és a csak kémiai változásokat tükröző, csúcsgazdag FT-IR spektrumban a zaj komponensek mellett elvesznek ezek az apró differenciák. Az FT-IR alapján készített *score plot*okat és súlyfüggvényeket lásd a *Mellékletben* (XXVII-XXVIII. tábla).

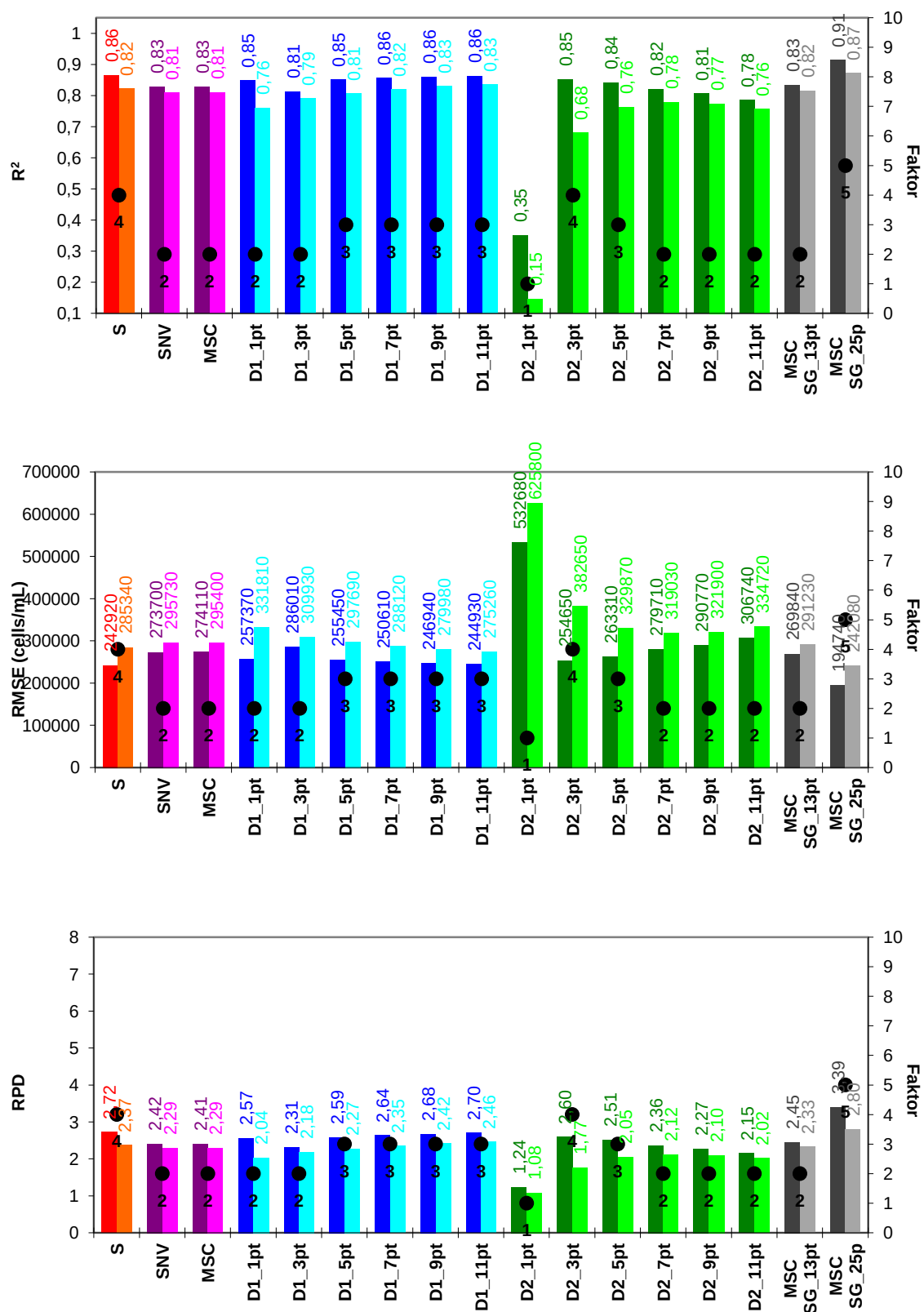
4.3.5. A PLS kalibrációk értékelése

A lombikos kísérletsorozatból származó 5. napi sejtszámok és 6. napi mAb koncentráció értékek ismeretében lehetőségünk nyílt mennyiségi kalibrációt végezni. Az egyes készülékekkel nyert spektrumokat és az imént említett referencia értékeket felhasználva Unscrambler szoftverrel PLS kalibrációkat készítettem teljes keresztvalidálás mellett, melyek kimeneti paramétereit külön-külön ábrázoltam. Az R^2 , $RMSE$, RPD és a felhasznált faktorok számát a matematikai kezelések függvényében feltüntetve összehasonlíthatjuk az egyes kezelések hatékonyságát, és felismerhetjük a mennyiségi meghatározásra leginkább alkalmas kalibrációkat.

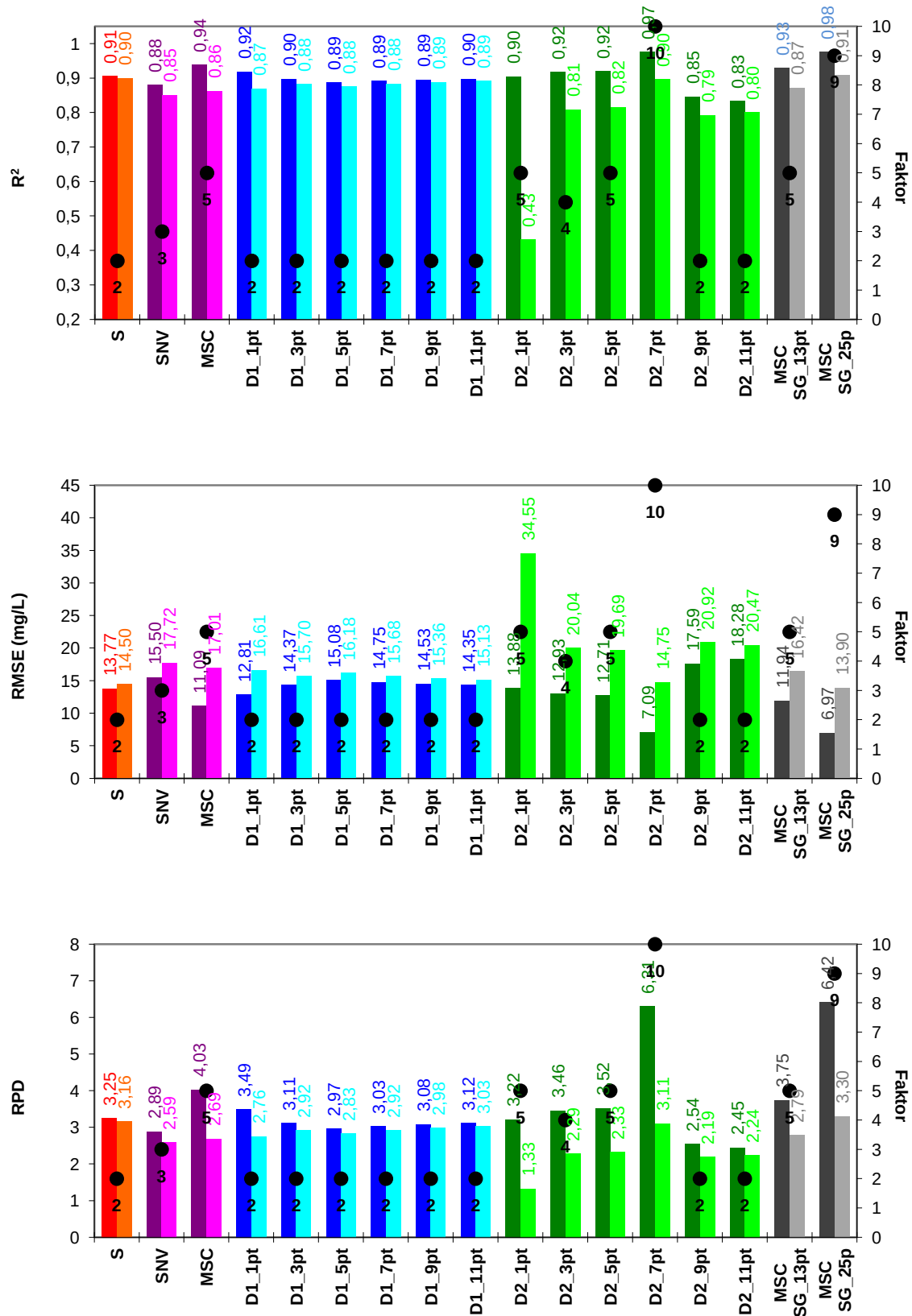
Az ábrákon piros színnel jelöltem a kezeletlen (S) lilával a normált (SNV, MSC) kékkel és zölddel az első-, illetve második derivált (D1, D2), míg szürke színnel az összetettebb, irodalmi alapokon nyugvó MSC kezelést követő Savitzky–Golay-féle simításos derivált (MSC SG; első rendű derivált) spektrumokkal elvégzett kalibrációk teljesítménymutatóit. A bal oldali oszloprészek a kalibrációra vonatkozó, a jobb oldali részek pedig a keresztvalidálást jellemző értékeket mutatják, a deriváltak jelzését követő *pt* értékek pedig a felhasznált simítóablak méretéről adnak felvilágosítást.

A kezeletlen spektrumok közül a diszperziós készülék VIS régiójában (400–1098 nm) Si detektorral kapott spektrumok mutatták a legjobb teljesítményjelzőket a PLS kalibrációban. A termelt antitest koncentrációra vonatkozóan az egymáshoz közeli R^2_{cal} és R^2_{val} értékek 0,9 felett vannak, az $RMSE$ értékek viszonylag alacsonyak, és az $RPD_{val} > 3$, ami egy ilyen bonyolult rendszerben kifejezetten jó értéknek számít, továbbá mindezeket két faktor figyelembevételével kaptuk (41. ábra–42. ábra).

A VIS spektrummal nyert kalibrációk esetében érdemes továbbá megjegyeznünk, hogy a kalibrációk eredménye kevésbé bizonyult érzékenynek a matematikai előkezelésekre, továbbá a második derivált kis simító ablakkal, főként a D2_1pt kezelés rontott a kalibráció eredményjelzőiben. Ez annak köszönhető, hogy a magasabb rendű deriváltak (ebben az esetben már a másodrendű is) a zajból eredő kis csúcsokat is felerősítik, amit kisméretű simító kapu nem tud ellensúlyozni.



41. ábra: PLS kalibrációk R^2 , RMSE és RPD értékei a diszperziós VIS-NIR készülék VIS tartományú spektrumait (400–1098 nm) felhasználva a mintákból készített tápoldatokban 5. napon elért sejtkoncentrációra.



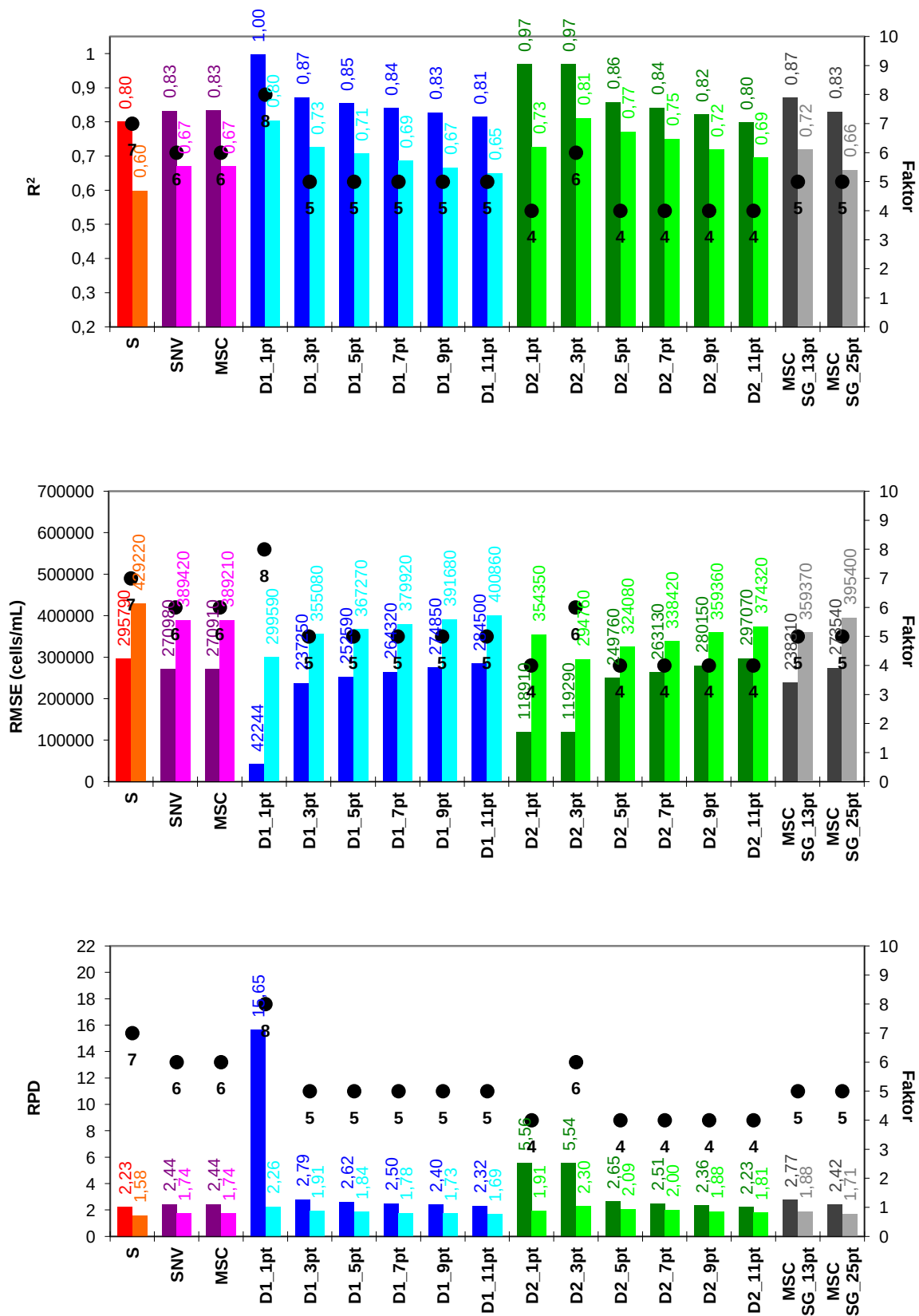
42. ábra: PLS kalibrációk R^2 , $RMSE$ és RPD értékei a diszperziós VIS-NIR készülék VIS tartományú spektrumait (400–1098 nm) felhasználva a mintákból készített tápoldatokban 6. napon elért mAb koncentrációra.

A diszperziós VIS-NIR készülék NIR tartományú spektrumaira készített PLS kalibrációk az előbbtől nem sokkal elmaradó R^2 , $RMSE$ és RPD értékeket értek el, de mindezt magasabb számú, 4–7 faktort felhasználó összefüggésekben. A mAb koncentráció esetében 8–9 faktossal számoló, túlillesztettnek tekinthető modelleket is találhatunk. Az FT-NIR eredményekhez hasonlóan a normálások és a Savitzky–Golay-deriválás nem hozott jelentős javulást a teljesítményjelzőkben, csak a faktorszám csökkenésében mutatkozik meg hatásuk. Itt is a kisebb simítóablakkal számoló deriválások bizonyultak legjobbnak, de a faktorszám ez esetekben sem csökkent 4 alá (43. ábra–44. ábra).

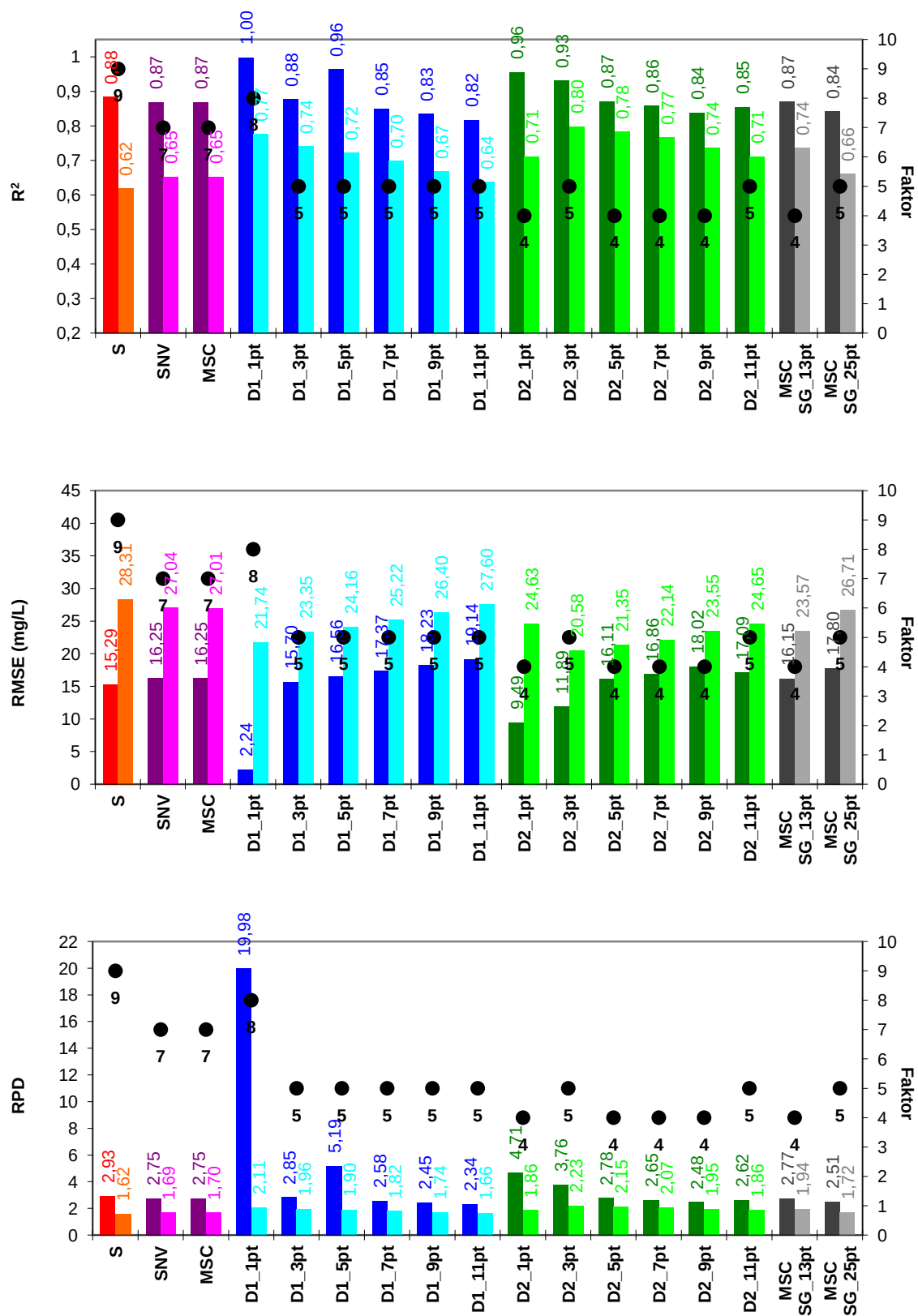
Az FT-NIR készülékkel kapott spektrumokból végzett elemzés a sejtszám esetében a kalibráció mind a sejtszám, mind az ellenanyagszint esetében 0,55–0,99 R^2_{cal} értékeket eredményezett. A keresztvalidálás során számított R^2_{val} értékek sajnos meglehetősen alacsony, 0,40–0,71 tartományban ingadozik (45. ábra–46. ábra).

A normálások nem okoztak jelentős változást a kezeletlen spektrumhoz képest a sejtszámot alapul vevő kalibrációnál, az ellenanyag-titer esetében pedig bár magasabb R^2_{cal} és R^2_{val} látható, figyelembe véve a felhasznált 10 faktort arra következtetésre juthatunk, hogy ez egy túlillesztett kalibráció eredménye. Az elsőrendű és másodrendű deriváltak a kisebb simítóablaknál bizonyultak kedvezőnek, a kapu növelésével a kezeletlen spektrumból eredő értékeket megközelítő, vagy alulmúló paramétereket láthatunk. Ennek oka, hogy bizonyos pontszám feletti átlagolás információ-tartalommal rendelkező apró csúcsokat eliminálhat a spektrumból. Az MSC-t követő Savitzky–Golay-deriválás csak a titerre történő kalibráció esetében mutat javulást a kezeletlen spektrumhoz képest, de R^2_{val} , RPD_{val} és felhasznált faktorok száma alapján alulmúlja a VIS spektrumoknál kapott értékeket.

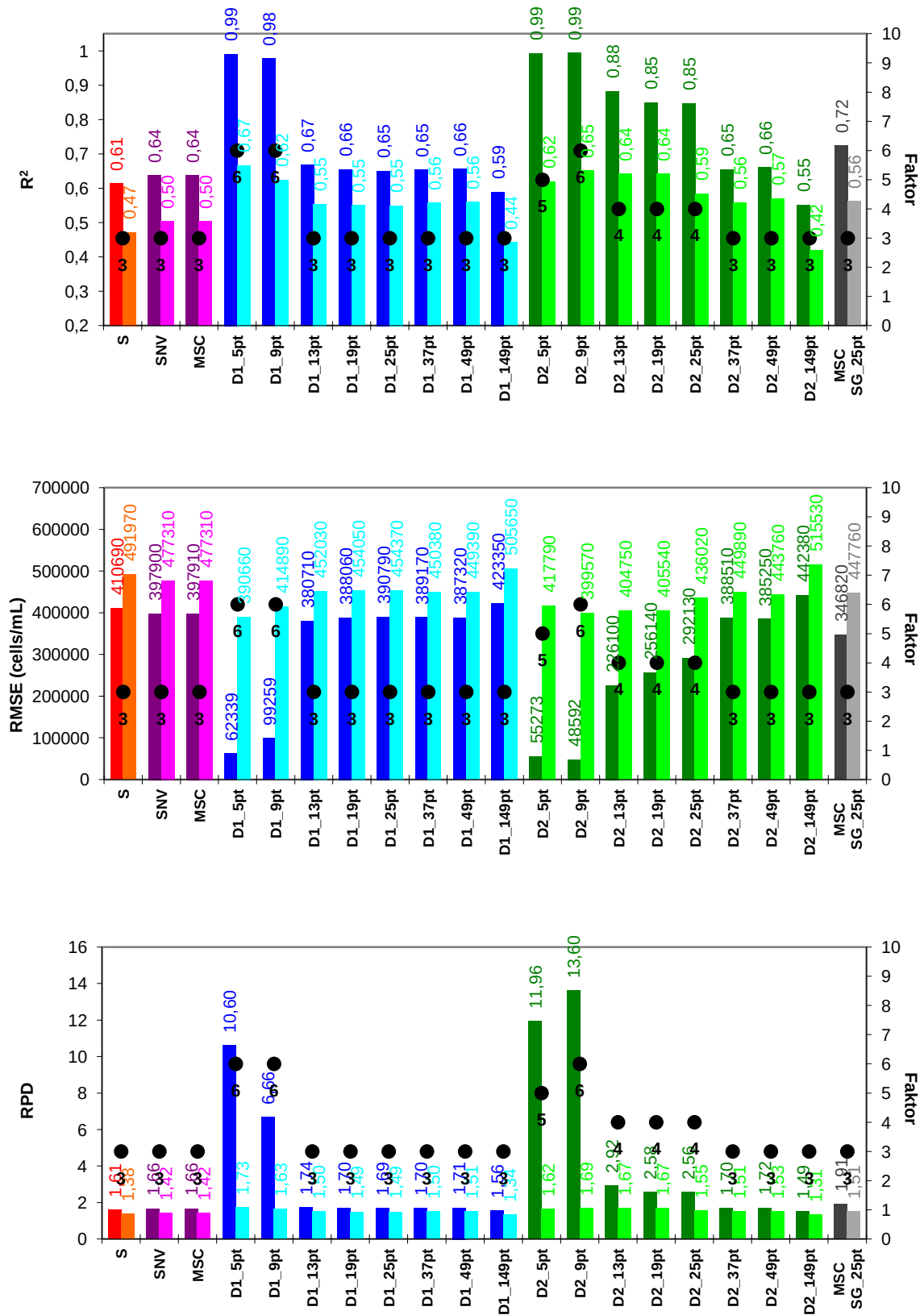
Az FT-NIR spektrumok az előzőleg vizsgált diszperziós készülékkel készített NIR tartományú spektrumoknál kevésbé kedvező teljesítményjelzőket produkáltak. A két készülék eredményeinek különbözőségét az optikai elrendezésből és a detektorok karakterisztikájából adódó jel-zaj arányok adják.



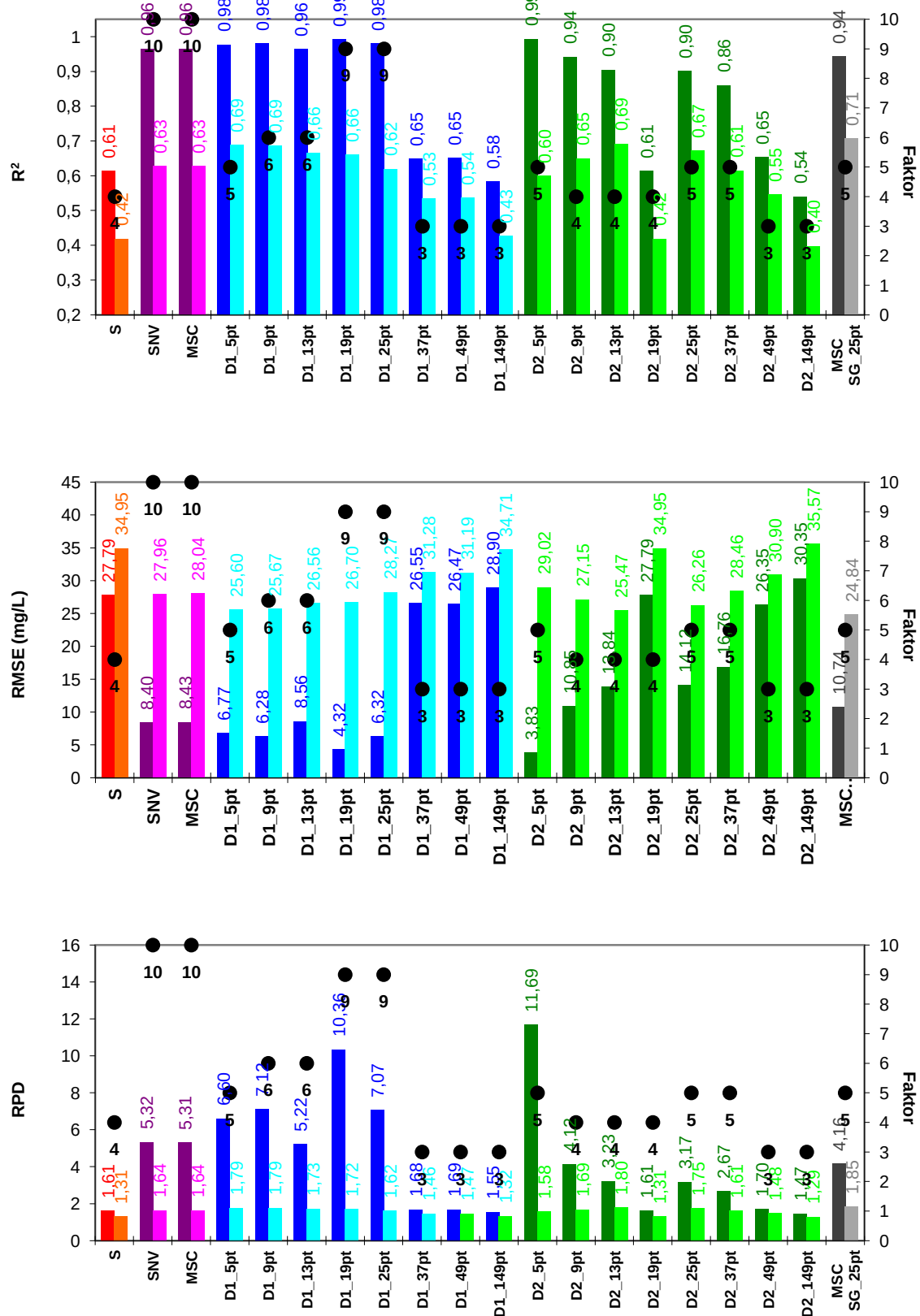
43. ábra: PLS kalibrációk R^2 , RMSE és RPD értékei a diszperziós VIS-NIR készülék NIR tartományú spektrumait (1100–2500 nm) felhasználva a mintákból készített tápoldatokban 5. napon elért sejtkoncentrációra.



44. ábra: PLS kalibrációk R^2 , RMSE és RPD értékei a diszperziós VIS-NIR készülék NIR tartományú spektrumait (1100–2500 nm) felhasználva a mintákból készített tápoldatokban 6. napon elért mAb koncentrációra.

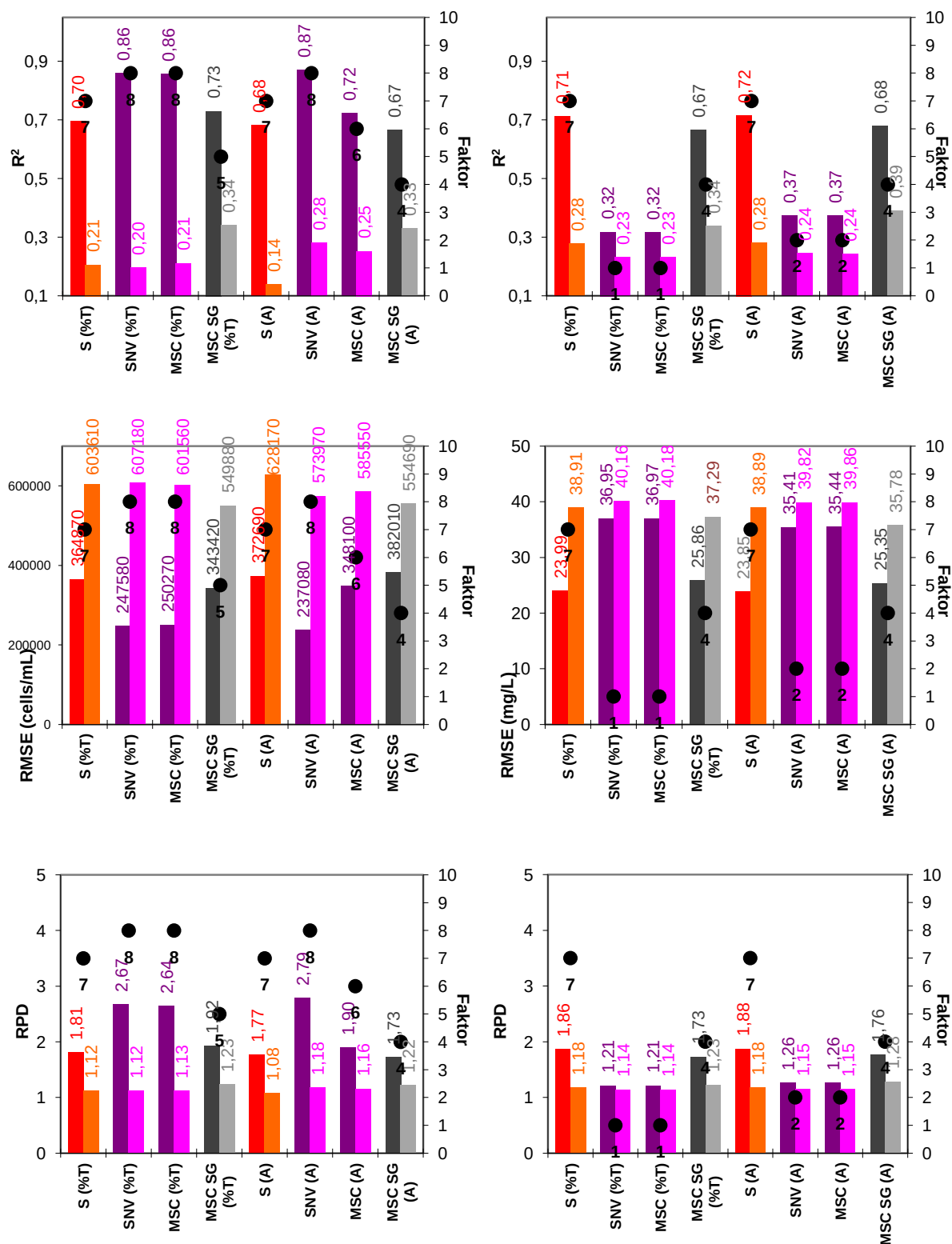


45. ábra: PLS kalibrációk R^2 , RMSE és RPD értékei az FT-NIR spektrumokat (10000–4000 cm^{-1} = 1000–2500 nm) felhasználva a mintákból készített tápoldatokban 5. napon elért sejtkoncentrációra.



46. ábra: PLS kalibrációk R^2 , $RMSE$ és RPD értékei az FT-NIR spektrumokat ($10000-4000\text{ cm}^{-1} = 1000-2500\text{ nm}$) felhasználva a mintákból készített tápoldatokban 6. napon elért mAb koncentrációra.

A kezeletlen FT-IR spektrumokkal – mind a mért T , mind a számított A intenzitásokkal – készített PLS kalibráció kedvezőtlen R^2 , $RMSE$ és RPD értékeket produkált (47. ábra). Az analitikai IR tartományban mért spektrumok esetében leginkább a minta kémiai komponenseiből eredő jelegek dominálnak, míg a NIR-ben fizikai és kémiai jellemzők is megnyilvánulnak. Az általunk vizsgált sokkomponensű, bonyolult összetételű tápoldatporoknál a változások kimutatásában a fizikai jellemzők (szemcseméret-eloszlás, elszíneződés, homogenitás stb.) is jelentős szerepet játszanak, így az ezeket is reprezentálni képes VIS és NIR spektrumok jobb elkülönítést biztosíthatnak.



47. ábra: PLS kalibrációk R^2 , RMSE és RPD értékei az FT-IR spektrumokat ($4000\text{--}650\text{ cm}^{-1} = 2500\text{--}15385\text{ nm}$) felhasználva a mintákból készített tápoldatokban 5. napon elért sejtkoncentrációkra (bal oldal) és a 6. napon elért mAb koncentrációkra (jobb oldal).

5. Összefoglalás

A rekombináns fehérje típusú gyógyszerhatóanyagok jelentős része csak emlős sejtvonalakat felhasználó fermentáció során állítható elő, melyek érzékenyek a környezeti változásokra, így az alapanyagok minőségének esetleges ingadozására is. A szükséges alapanyagok – köztük az alap tápoldatporok is – felhasználásuk előtt minőségi ellenőrzésen mennek keresztül, mely tovább emeli az előállítás fajlagos költségeit. Az infravörös spektroszkópiás módszerek a PAT alapelvekkel összhangban gyors, költséghatékony és megbízható eszközt jelenthetnek a fermentációs technológiába bekerülő anyagok felszabadítási folyamataiban. Optimalizált spektroszkópiai ellenőrzési technikákkal már a tápoldatpor átvételekor meggyőződhetnénk a termék minőségéről, az egyértelműen nem megfelelő vagy károsodott alapanyag pedig a preparatív minősítés költségei nélkül visszautasítható lenne.

TDK munkám keretein belül kínai hörcsög petesejtekkel (CHO) végzett fermentációknál felhasznált, kereskedelmi forgalomban is megtalálható szérummentes tápoldatport vizsgáltam, hogyan reagál különböző időtartamú és hőmérsékletű hőhatásokra.

Előkísérletek eredményeiből kiindulva szimmetrikus kétfaktoros teljes terv szerinti kísérletsorozatot hajtottam végre, a hőmérsékletet és a hőkezelés időtartalmát három szintjen változtatva. Az előállított mintákat a látható (VIS) és közeli infravörös (NIR) tartományú diszperziós, valamint közeli és közép (analitikai) infravörös tartományú Fourier-transzformációs (FT-NIR/FT-IR) spektrofotométerekkel vizsgáltam. Emellett a mintákból előállított tápoldatok CHO sejtekre gyakorolt hatását rázatott lombikos, szuszpenziós sejtenyészetek felhasználásával tanulmányoztam.

A hőkezelés és időtartamának hatását a tápoldatpor felhasználhatóságra preparatív, lombikos minősítési eljárással vizsgáltam. A mért élősejt- és mAb koncentrációk statisztikai értékelése során kapott eredmények azt mutatják, hogy a hőhatásnak kitett tápoldatpor jelentős eltéréseket okozhat a tenyésztés kimenetelében. Ez a kitermelés csökkenéséhez, de akár a gyártás leállításához is vezethet. Mivel mind a két faktor hatása szignifikánsnak bizonyult, a hőmérséklet és a hőhatás ideje egyaránt kritikus paraméter mind a tápoldatokban elérhető élősejt-koncentráció, mind a sejtek által termelt rekombináns fehérje koncentrációját illetően. Utóbbi esetében már a legkisebb hőhatásnak kitett, 30 °C-on 1 óráig melegített tápoldatpor minta is szignifikáns csökkenést mutatott a kezeletlen kontroll mintákban elért mAb koncentrációjához képest.

A hőkezelt és kontroll minták spektroszkópiai vizsgálata során megállapítottam, hogy a VIS és NIR tartományú spektrumok alapján a kezelési hőmérséklet szerinti csoportok megkülönböztethetőek, a kontroll minták a megfelelő matematikai módszerek felhasználásával, nagy biztonsággal elkülöníthetőek. Az általam végzett elemzések során az alábbi módszerek bizonyultak a legmegbízhatóbbnak:

- a diszperziós NIR (1100–2500 nm) spektrumok 5 pontos simítással kombinált második deriváltjaira végzett klaszteranalízis Single Linkage és euklideszi távolság számítási módszerek kombinálásával,
- az FT-NIR (10000-4000 cm^{-1}) spektrumok MSC-t kezelt Savitzky–Golay-derivált transzformáltjai alapján végzett klaszteranalízis a Ward- és 1-Pearson R módszerek felhasználásával,
- a NIR kezeletlen spektrumokra végzett főkomponens-analízis,
- az FT-NIR spektrumok MSC-t kezelt Savitzky–Golay-derivált transzformáltjai alapján végzett főkomponens analízis.

A lombikokban mért élősejt és rekombináns fehérje koncentrációra irányuló mennyiségi kalibráció nem szolgált egyértelmű eredményekkel, de figyelembe véve az alapanyag és a referenciaeredmények közötti idő- és folyamatbeli távolságot, továbbá a vizsgált biológiai rendszer összetettségét, a kapott PLS teljesítményjelzők elfogadható értékűek. Egy jóval nagyobb mintaszámon alapuló PLS elemzés lehetővé tenné az elérhető sejtmennyiség és mAb koncentráció előzetes becslésére alkalmas módszer kifejlesztését, mely a gyártás indítását megelőzően felhasználható lenne a kockázatok mérlegelésekor és a döntéshozatalban.

Ezenfelül szükséges megjegyezni, hogy az általam vizsgált mintákon alapuló minőségi meghatározás és mennyiségi kalibráció alkalmazása érzékeny a sarzsok közötti különbségre. A módszer gyártási ellenőrzés során történő felhasználásához több sarzs bevonása szükséges, valamint kérvényezni kell a tápoldatpor gyártónál, hogy termékváltoztatás esetén értesítse a felhasználót.

További terveim közé tartozik, hogy a hőkezelt minták aminosav összetételének vizsgálatát is elvégezzem, mely érdekében jelenleg mintáim NMR spektroszkópiai analízisét végzik. A kapott aminosav koncentráció értékek kimeneti paraméterei lehetnek egy újabb PLS kalibráció sorozat végrehajtásának. Továbbá az NMR és NIR (ill. FT-NIR) spektroszkópiai adatok közvetlenül is korrelálthatóak egy összetettebb kemometriai elemzés végrehajtásában.

6. Irodalomjegyzék

- [1] **W.R. Strohl, D.M. Knight.** Discovery and development of biopharmaceuticals: current issues, *Current Opinion in Biotechnology*. (2009) 20: 668-672.
- [2] **R. A. Rader.** FDA Biopharmaceutical Product Approvals and Trends in 2012. *BioProcess International* (2013) 11(3): 18-27.
- [3] Research Report on Global and China Monoclonal Antibody Industry, 2013-2017. China Research and Intelligence (2013) www.RnRMarketResearch.com
- [4] Biologics Still on Top in Best Selling Drugs of 2013. *The Dish* (2014) www.cellculturedish.com
- [5] **B. Huggett.** Public biotech 2012—the numbers. *Nature Biotechnology* (2013) 31: 697–703.
- [6] **S. Lawrence, R. Lahteenmaki.** Public biotech 2013—the numbers. *Nature Biotechnology* (2014) 32: 626-632.
- [7] **H. Eagle.** Nutrition Needs of Mammalian Cells in Tissue Culture. *Science* (1955) 122: 501-504.
- [8] **D. Jayme, T. Watanabe, T. Shimada.** Basal medium development for serum-free culture: a historical perspective. *Cytotechnology* (1997) 23(1-3): 95-101.
- [9] **M. Schröder, K. Matischak, P. Friedl.** Serum- and protein-free media formulations for the Chinese hamster ovary cell line DUKXB11. *Journal of Biotechnology* (2004) 108: 279-292.
- [10] **Pécs M.** Bioterméktechnológia I. Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék, Budapest Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Budapest.
- [11] **Pécs M.** Rekombináns fehérjék. Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék, Budapest Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Budapest.
- [12] **Y. Rouiller, A. Périlleux, N. Collet, M. Jordan, M. Stettler, H. Broly.** A high-throughput media design approach for high performance mammalian fed-batch cultures. *MAbs*. (2013) 5(3): 501-511.
- [13] **E. K. Read, J. T. Park, R. B. Shah, B. S. Riley, K. A. Brorson, A. S. Rathore.** Process Analytical Technology (PAT) for Biopharmaceutical Products: Part II. Concepts and Applications. *Biotechnology and Bioengineering* (2010) 105: 276-284.
- [14] **S. M. Mercier, B. Diepenbroek, M. C.F. Dalm, R. H. Wijffels, M. Streefland.** Multivariate data analysis as a PAT tool for early bioprocess development data. *Journal of Biotechnology* (2013) 167(3): 262-270.
- [15] Guidance for Industry PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance. FDA (2004).

- [16] **Ballagi A.** Rekombináns gyógyszerek fejlesztése (2008) Előadás: Innovatív Gyógyszerek Kutatására Irányuló Nemzeti Technológiai Platform – Gyógyszer hatásossági munkaértekezlet.
- [17] **E. K. Read, J. T. Park, R. B. Shah, B. S. Riley, K. A. Brorson, A. S. Rathore.** Process Analytical Technology (PAT) for Biopharmaceutical Products: Part II. Concepts and Applications. *Biotechnology and Bioengineering* (2010) 105: 285-295.
- [18] **L. Liu, M. A. Arnold.** Selectivity for glucose, glucose-6-phosphate, and pyruvate is ternary mixtures from the multivariate analysis of near-infrared spectra. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2009) 392: 669-677.
- [19] **A. O. Kirdar, K. D. Green, A. S. Rathore.** Application of multivariate data analysis for identification and successful resolution of a root cause for a bioprocessing application. *Biotechnology Progress* (2008) 24: 720-726.
- [20] **A.P. Teixeira, R. Oliveirac, P. M. Alves, M. J. T. Carrondo.** Advances in on-line monitoring and control of mammalian cell cultures: Supporting the PAT initiative. *Biotechnology Advances* (2009) 27(6): 726-732.
- [21] **M. Clavaud, Y. Roggo, R. Von Daeniken, A. Liebler, J. O. Schwabe.** Chemometrics and in-line near infrared spectroscopic monitoring of a biopharmaceutical Chinese hamster ovary cell culture: Prediction of multiple cultivation variables. *Talanta* (2013) 111: 28-38.
- [22] **B. Li, P. W. Ryan, M. Shanahan, K. J. Leister, A. G. Ryder.** Fluorescence excitation-emission matrix (EEM) spectroscopy for rapid identification and quality evaluation of cell culture media components. *Applied Spectroscopy* (2011) 65(11): 1240-1249.
- [23] **P. W. Ryan, B. Li, M. Shanahan, K. J. Leister, A. G. Ryder.** Prediction of Cell Culture Media Performance Using Fluorescence Spectroscopy. *Analytical Chemistry* (2010) 82(4): 1311-1317.
- [24] **M. Bloomfield, D. Andrews, P. Loeffen, C. Tombling, T. York, P. Matousek.** Non-invasive identification of incoming raw pharmaceutical materials using Spatially Offset Raman Spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2013) 76: 65-69.
- [25] **B. Li, P. W. Ryan, B. H. Ray, K. J. Leister, N. M. Sirimuthu, A. G. Ryder.** Rapid characterization and quality control of complex cell culture media solutions using raman spectroscopy and chemometrics. *Biotechnology and Bioengineering* (2010) 107(2): 290-301.
- [26] **Pokol Gy., Sztatisz J.** Analitikai kémia I. Műegyetem Kiadó, Budapest (2003).
- [27] **Balázs G., Bugyi Zs., Gergely Sz., Hegyi A., Hevér A., Salgó A., Tömösközi S.** Élelmiszeranalitika gyors és automatizált módszerei. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (2011).
- [28] ISO 20375:2007 Textiles – Determination of antibacterial activity of antibacterial finished products.

- [29] **P. R. Griffiths, J. A. De Haseth.** Fourier Transform Infrared Spectrometry. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey (2007).
- [30] **S. P. Davis, M. C. Abrams, J. W. Brault.** Fourier Transform Spectrometry. Academic Press, USA (2001).
- [31] **R. Foley, S. Hennessy, I. W. Marison.** Potential of Mid-Infrared Spectroscopy for On-Line Monitoring of Mammalian Cell Culture Medium Components. *Applied Spectroscopy* (2011) 66(1): 33-39.
- [32] **M. Sandor, F. Rüdinger, R. Bienert, C. Grimm, D. Solle, T. Scheper.** Comparative study of non-invasive monitoring via infrared spectroscopy for mammalian cell cultivations. *Journal of Biotechnology* (2013) 168(4): 636-645.
- [33] **K. J. Kaffka, K. H. Norris, J. Perédi, A. Balogh.** Attempts to determine oil, protein, water and fiber content in sunflower seeds by the NIR technique. *Acta Alimentaria* (1982) 11(8): 258-269.
- [34] **M. A. Augustin, S. K. Berry.** Efficacy of the antioxidants BHA and BHT in palm olein during heating and frying. *Journal of the American Oil Chemists' Society* (1983) 60 (8): 1520-1523.
- [35] **Da-Wen Sun.** Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control. Elsevier Inc. (2009).
- [36] **Y. Roggo, P. Chalus, L. Maurer, C. Lema-Martinez, A. Edmond, N. Jent.** A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2007) 44: 683-700.
- [37] **M. Jamrógiewicz.** Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2012) 66: 1-10.
- [38] **O.Ye. Rodionova, A.L. Pomerantsev.** NIR-based approach to counterfeit-drug detection. *Trends in Analytical Chemistry* (2010) 29 (8): 795-803.
- [39] **C. Hakemeyer, U. Strauss, S. Werz, G. E. Jose, F. Folque, J. C. Menezes.** At-line NIR spectroscopy as effective PAT monitoring technique in Mab cultivations during process development and manufacturing. *Talanta* (2012) 90: 12-21.
- [40] **R Cinier;J Guilment.** Qualification of Solid Raw-Materials Using Near-Infrared Spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* (1998) 6: A231-A237.
- [41] **O.Ye. Rodionova,, Ya.V. Sokovikov, A.L. Pomerantsev.** Quality control of packed raw materials in pharmaceutical industry. *Analytica Chimica Acta* (2009) 642: 222-227.
- [42] **M. S. Kemper, L. M. Luchetta.** A guide to raw material analysis using near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* (2003) 11: 155-174.

- [43] **C. Hakemeyer, U. Strauss, S. Werz1, F. Folque, J. C. Menezes.** Near-infrared and two-dimensional fluorescence spectroscopy monitoring of monoclonal antibody fermentation media quality: Aged media decreases cell growth. *Biotechnology Journal* (2013) 8(7): 835-846.
- [44] User manual: Countess® Automated Cell Counter. Catalog no. C10227, Invitrogen™ (2009)
- [45] IgG Assay for Cedex Bio and Cedex Bio HT Analyzer. Roche Custom Biotech (2013)
- [46] **Stark E., Luchter K.** Diversity in NIR instrumentation. In: Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11th International Conference (2004.) Davies A.M.C., Garrido-Varo A. (Eds.) NIR Publications, Chichester, 55–66.
- [47] **M. J. Adams.** Chemometrics in Analytical Spectroscopy. The Royal Society of Chemistry, Cambridge (2004)
- [48] **I.E. Frank, R. Todeschini.** The Data Analysis Handbook. Elsevier Science B. V. (1994)
- [49] **Kemény S., Deák A.** Kísérletek tervezése és értékelése. Műszaki Könyvkiadó, Budapest (2000)
- [50] **A. Mauerer, G. Lee.** Changes in the amide I FT-IR bands of poly-L-lysine on spray-drying from α -helix, β -sheet or random coil conformations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2006) 62(2): 131-142.
- [51] **B. G. Osborne, T. Fearn.** Theory of near infrared spectrophotometry. In *Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis*, Longman Scientific & Technical, Harlow (1986) 20-42.

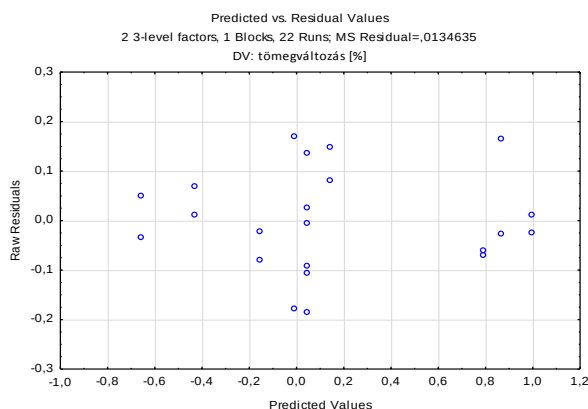
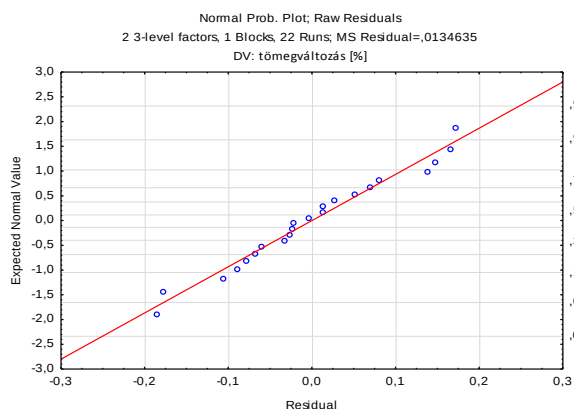
Melléklet

A minták százalékos tömegváltozásának ANOVA vizsgálata során kapott eredmények és a reziduumok ábrái

ANOVA; Var.:tömegváltozás [%]; R-sqr=,97328; Adj:,95683 2 3-level factors, 1 Blocks, 22 Runs; MS Residual=,0118841 DV: tömegváltozás [%]					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)T [°C](L)	5,067080	1	5,067080	426,3764	0,000000
T [°C](Q)	0,108007	1	0,108007	9,0884	0,009954
(2)t [h](L)	0,064803	1	0,064803	5,4529	0,036214
t [h](Q)	0,000005	1	0,000005	0,0004	0,984083
1L by 2L	0,249457	1	0,249457	20,9909	0,000515
1L by 2Q	0,001198	1	0,001198	0,1008	0,755903
1Q by 2L	0,020660	1	0,020660	1,7385	0,210089
1Q by 2Q	0,039064	1	0,039064	3,2871	0,092971
Error	0,154493	13	0,011884		
Total SS	5,781567	21			

ANOVA; Var.:tömegváltozás [%]; R-sqr=,96274; Adj:,9511 2 3-level factors, 1 Blocks, 22 Runs; MS Residual=,0134635 DV: tömegváltozás [%]					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)T [°C](L)	5,067080	1	5,067080	376,3581	0,000000
T [°C](Q)	0,157559	1	0,157559	11,7027	0,003502
(2)t [h](L)	0,064803	1	0,064803	4,8133	0,043355
t [h](Q)	0,002836	1	0,002836	0,2106	0,652438
1L by 2L	0,249457	1	0,249457	18,5285	0,000546
Error	0,215415	16	0,013463		
Total SS	5,781567	21			

Effect Estimates; Var.:tömegváltozás [%]; R-sqr=,96274; Adj:,9511 2 3-level factors, 1 Blocks, 22 Runs; MS Residual=,0134635 DV: tömegváltozás [%]										
Factor	Effect	Std.Err.	t(16)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/ Interc.	0,17493	0,025870	6,7618	0,000005	0,12008	0,22977	0,174926	0,025870	0,120084	0,229767
(1)T [°C](L)	-1,29963	0,066991	-19,4000	0,000000	-1,44164	-1,15761	-0,649813	0,033496	-0,720820	-0,578805
T [°C](Q)	-0,17634	0,051549	-3,4209	0,003502	-0,28562	-0,06707	-0,088172	0,025774	-0,142811	-0,033533
(2)t [h](L)	-0,14697	0,066991	-2,1939	0,043355	-0,28899	-0,00496	-0,073486	0,033496	-0,144494	-0,002479
t [h](Q)	-0,02366	0,051549	-0,4590	0,652438	-0,13294	0,08562	-0,011829	0,025774	-0,066468	0,042810
1L by 2L	-0,35317	0,082047	-4,3045	0,000546	-0,52710	-0,17924	-0,176585	0,041024	-0,263551	-0,089619

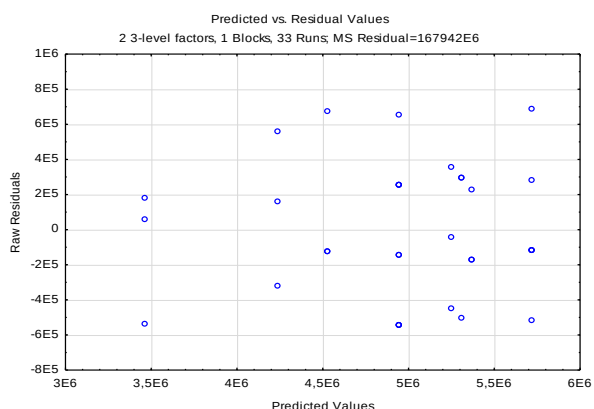
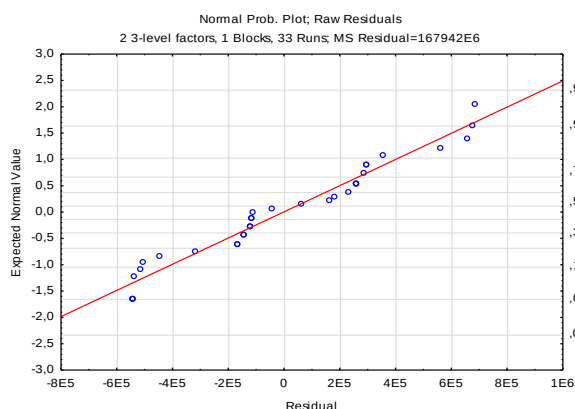


Az 5. napon mért élősejt-koncentrációk ANOVA vizsgálatának eredményei és a reziduumok ábrái

ANOVA; Var.:Live_4,9; R-sqr=,75783; Adj.:67711 (Sejtkoncentracio in Lombikok) 2 3-level factors, 1 Blocks, 33 Runs; MS Residual=181170E6 DV: Live_4,9					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Term (L)	5,120000E+12	1	5,120000E+12	28,26069	0,000019
Term (Q)	3,029952E+11	1	3,029952E+11	1,67243	0,208243
(2)Time (L)	6,384356E+12	1	6,384356E+12	35,23951	0,000004
Time (Q)	1,365952E+11	1	1,365952E+11	0,75396	0,393826
1L by 2L	1,555200E+12	1	1,555200E+12	8,58419	0,007326
1L by 2Q	2,560000E+10	1	2,560000E+10	0,14130	0,710291
1Q by 2L	3,484444E+10	1	3,484444E+10	0,19233	0,664907
1Q by 2Q	1,259041E+11	1	1,259041E+11	0,69495	0,412707
Error	4,348089E+12	24	1,811704E+11		
Total SS	1,795462E+13	32			

ANOVA; Var.:Live_4,9; R-sqr=,74745; Adj.:70068 (Sejtkoncentracio in Lombikok) 2 3-level factors, 1 Blocks, 33 Runs; MS Residual=167942E6 DV: Live_4,9					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Term (L)	5,120000E+12	1	5,120000E+12	30,48669	0,000008
Term (Q)	2,228248E+11	1	2,228248E+11	1,32680	0,259474
(2)Time (L)	6,384356E+12	1	6,384356E+12	38,01521	0,000001
Time (Q)	2,339181E+11	1	2,339181E+11	1,39285	0,248218
1L by 2L	1,555200E+12	1	1,555200E+12	9,26033	0,005168
Error	4,534437E+12	27	1,679421E+11		
Total SS	1,795462E+13	32			

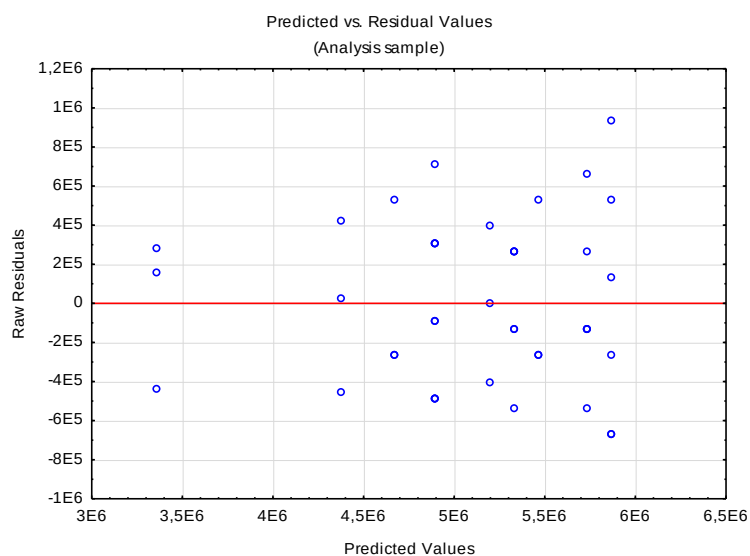
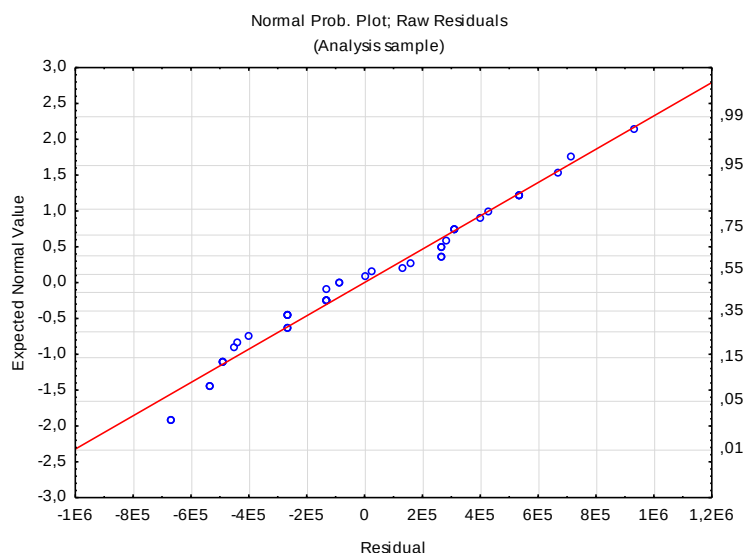
Effect Estimates; Var.:Live_4,9; R-sqr=,74745; Adj.:70068 (Sejtkoncentracio in Lombikok) 2 3-level factors, 1 Blocks, 33 Runs; MS Residual=167942E6 DV: Live_4,9										
Factor	Effect	Std.Err.	t(27)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Intercept	4945965	74601,2	66,29876	0,000000	4792896	5099034	4945965	74601,2	4792896	5099034
(1)Term(L)	-1066667	193185,1	-5,52148	0,000008	-1463050	-670284	-533333	96592,5	-731525	-335142
Term (Q)	171228	148652,8	1,15187	0,259474	-133782	476238	85614	74326,4	-66891	238119
(2)Time (L)	-1191111	193185,1	-6,16565	0,000001	-1587494	-794728	-595556	96592,5	-793747	-397364
Time (Q)	-175439	148652,8	-1,18019	0,248218	-480449	129572	-87719	74326,4	-240224	64786
1L by 2L	-720000	236602,4	-3,04308	0,005168	-1205468	-234532	-360000	118301,2	-602734	-117266



A kontroll minták és a 30 °C-on 1 óráig kezelt mintákból készített tápoldatokban 5. napra elért sejtkoncentrációk alapján végzett kontrasztanalízis eredményei és a reziduumok ábrái

Contrast	Contrast Estimates (Sejtkoncentracio in Lombikok) Dependent variable: Live_4,9					
	Estimate	Std.Err	t	p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
CNTRST1	-133333	391807,5	-0,34030	0,736000	-933511	666844
CNTRST2	-400000	391807,5	-1,02091	0,315460	-1200178	400178
CNTRST3	266667	554099,4	0,48126	0,633823	-864955	1398289

Source	Univariate Test of Significance for Planned Comparison (Sejtkoncentracio in Lombikok) Dependent variable: Live_4,9				
	Sum of Squares	Degr. of Freedom	Mean Square	F	p
Effect	3,200000E+11	3	1,066667E+11	0,463225	0,710066
Error	6,908089E+12	30	2,302696E+11		



A hőkezelt mintákból készített tápoldatokban elért 6. napi relatív Mab koncentráció alapján készített ANOVA elemzés, homoszkedaszticitás vizsgálat és kontrasztanalízis eredményei

Factor	ANOVA; Var.:Relative IgG; R-sqr=,95985; Adj: ,94646 (IgG in Lombikok) 2 3-level factors, 1 Blocks, 33 Runs; MS Residual=,0002781 DV: Relative IgG:				
	SS	df	MS	F	p
(1)Term (L)	0,016618	1	0,016618	59,7557	0,000000
Term (Q)	0,012757	1	0,012757	45,8741	0,000001
(2)Time (L)	0,079122	1	0,079122	284,5149	0,000000
Time (Q)	0,000284	1	0,000284	1,0215	0,322247
1L by 2L	0,032234	1	0,032234	115,9095	0,000000
1L by 2Q	0,000325	1	0,000325	1,1675	0,290659
1Q by 2L	0,008390	1	0,008390	30,1694	0,000012
1Q by 2Q	0,001784	1	0,001784	6,4156	0,018262
Error	0,006674	24	0,000278		
Total SS	0,166226	32			

Factor	Effect Estimates; Var.:Relative IgG; R-sqr=,95985; Adj: ,94646 (IgG in Lombikok) 2 3-level factors, 1 Blocks, 33 Runs; MS Residual=,0002781 DV: Relative IgG									
	Effect	Std.Err.	t(24)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,87865	0,00309	284,519	0,000000000	0,8723	0,8850	0,8786	0,0031	0,8723	0,8850
(1)Term (L)	-0,06077	0,00786	-7,730	0,000000058	-0,0770	-0,0445	-0,0304	0,0039	-0,0385	-0,0223
Term (Q)	0,04256	0,00628	6,773	0,000000526	0,0296	0,0555	0,0213	0,0031	0,0148	0,0278
(2)Time (L)	-0,13260	0,00786	-16,868	0,000000000	-0,1488	-0,1164	-0,0663	0,0039	-0,0744	-0,0582
Time (Q)	0,00635	0,00628	1,011	0,322247251	-0,0066	0,0193	0,0032	0,0031	-0,0033	0,0097
1L by 2L	-0,10366	0,00963	-10,766	0,000000000	-0,1235	-0,0838	-0,0518	0,0048	-0,0618	-0,0419
1L by 2Q	0,00901	0,00834	1,080	0,290659098	-0,0082	0,0262	0,0045	0,0042	-0,0041	0,0131
1Q by 2L	0,04580	0,00834	5,493	0,000012007	0,0286	0,0630	0,0229	0,0042	0,0143	0,0315
1Q by 2Q	0,01534	0,00606	2,533	0,018262240	0,0028	0,0278	0,0077	0,0030	0,0014	0,0139

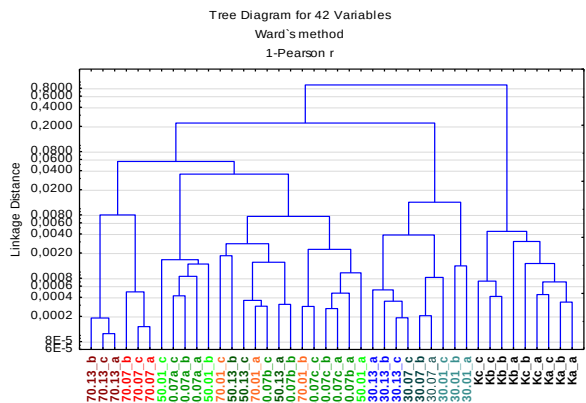
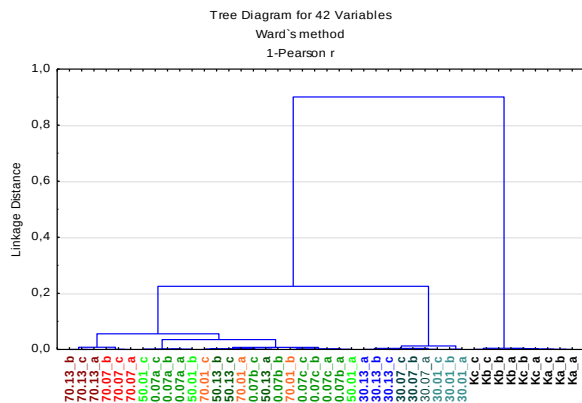
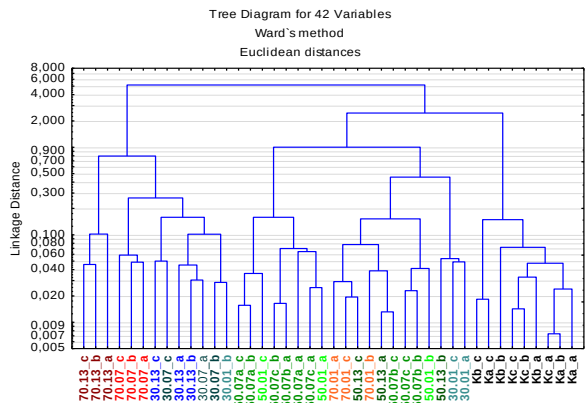
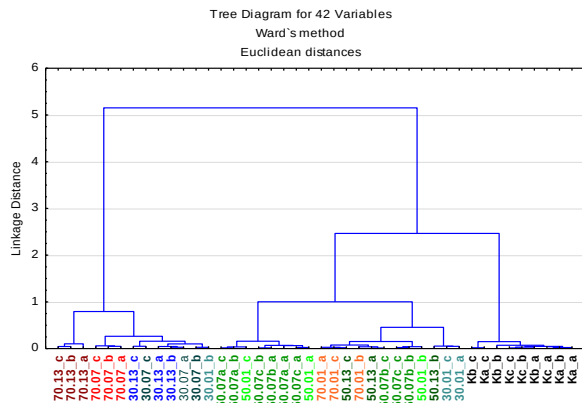
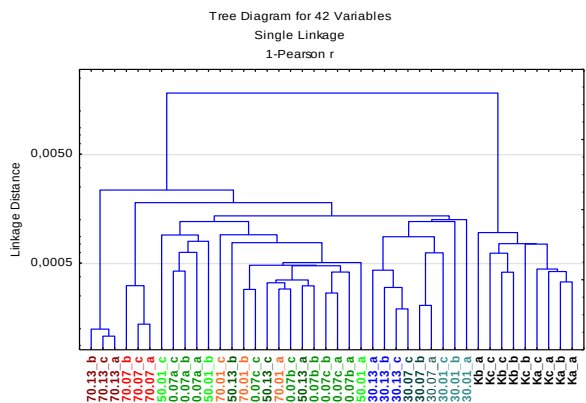
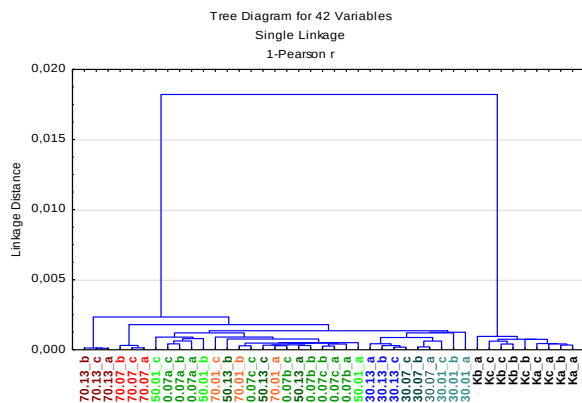
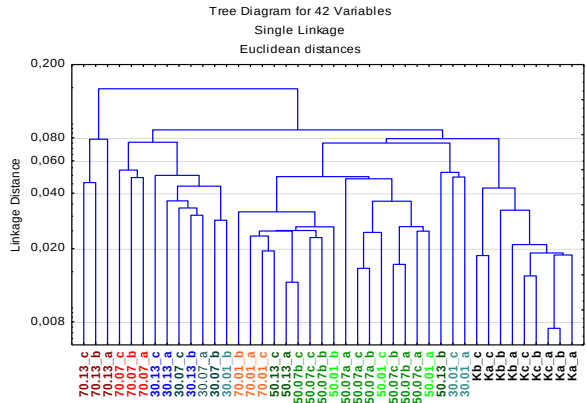
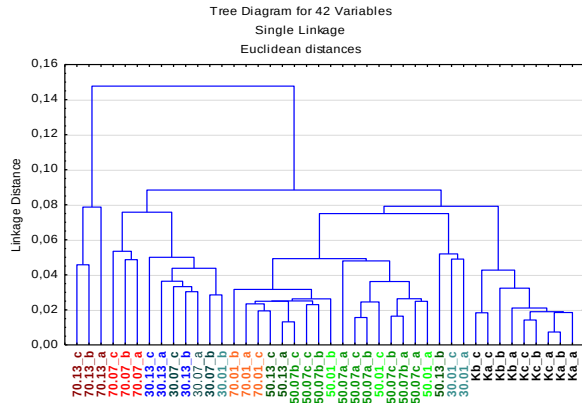
	Tests of Homogeneity of Variances (IgG in Lombikok) Effect: Term*Time				
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
Rel(IgG)	191,0604	0,526948	18,68220	8	0,016655

	Levene's Test for Homogeneity of Variances (IgG in Lombikok) Effect: Term*Time Degrees of freedom for all F's: 8, 24			
	MS Effect	MS Error	F	p
Rel(IgG)	0,00021	0,00007	2,78603	0,02472

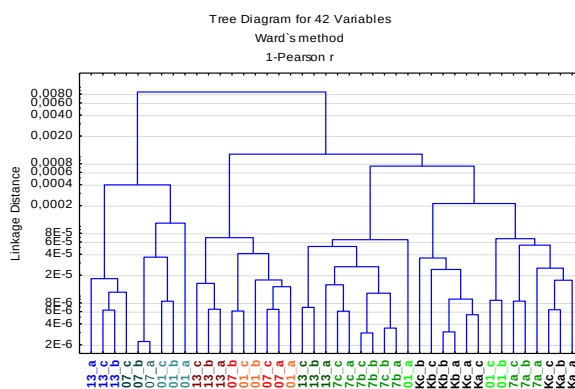
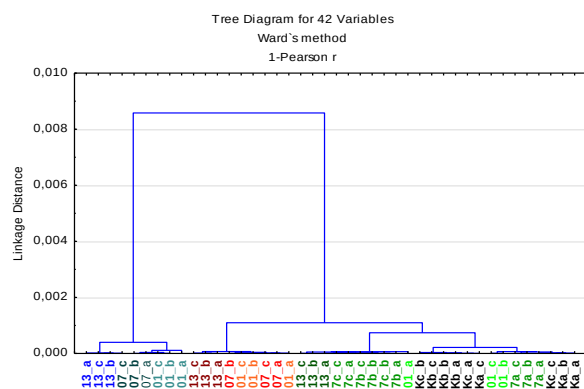
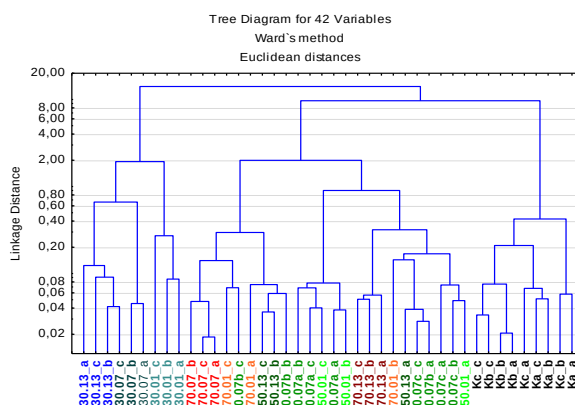
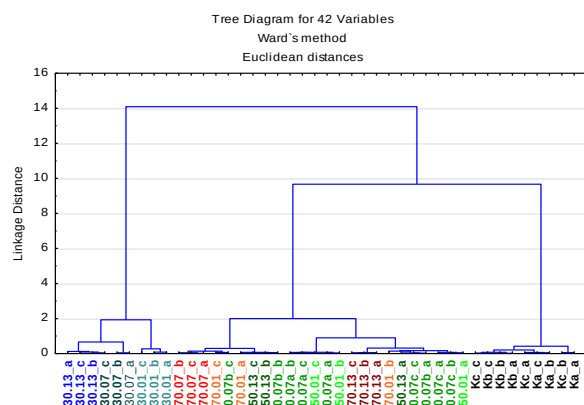
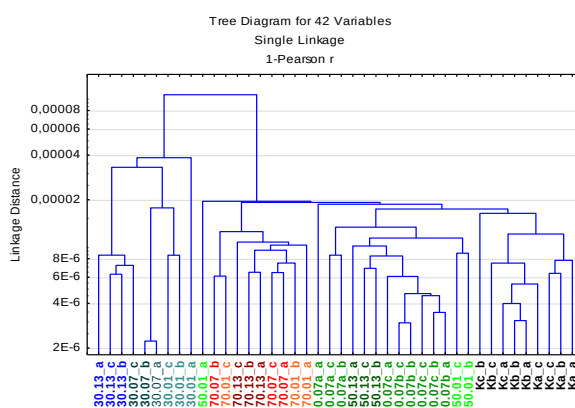
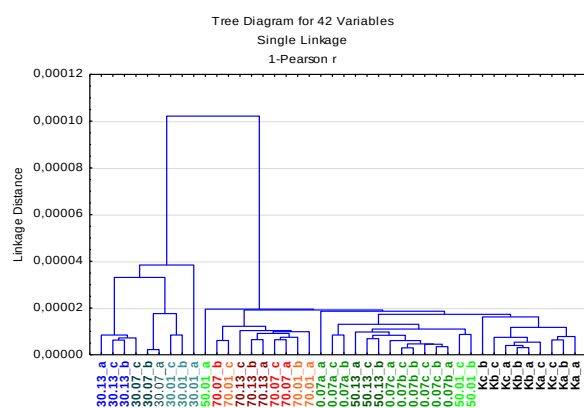
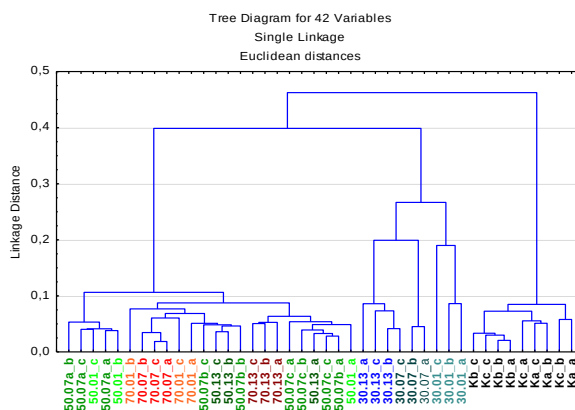
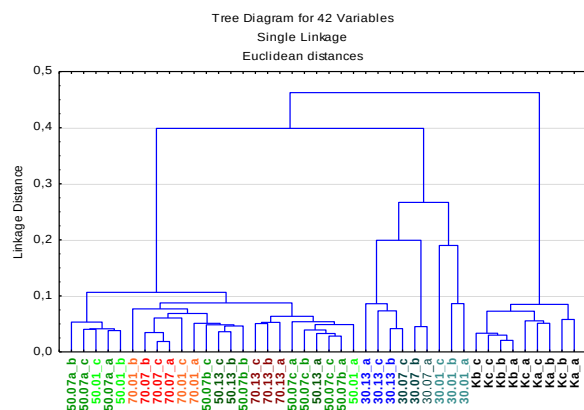
Contrast	Contrast Estimates (IgG in Lombikok) Dependent variable: Relative IgG					
	Estimate	Std.Err	t	p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
CNTRST1	-0,064187	0,012400	-5,17657	0,000014	-0,089511	-0,038864
CNTRST2	-0,007718	0,012400	-0,62240	0,538379	-0,033041	0,017606
CNTRST3	-0,061724	0,017536	-3,51991	0,001401	-0,097537	-0,025911

Source	Univariate Test of Significance for Planned Comparison (IgG in Lombikok) Dependent variable: Relative IgG				
	Sum of Squares	Degr. of Freedom	Mean Square	F	p
Effect	0,009127	3	0,003042	13,19133	0,000011
Error	0,006919	30	0,000231		

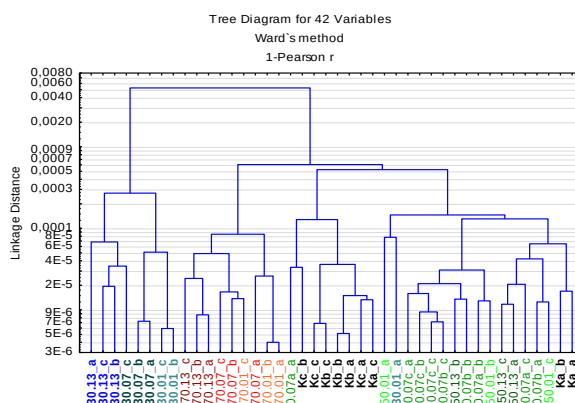
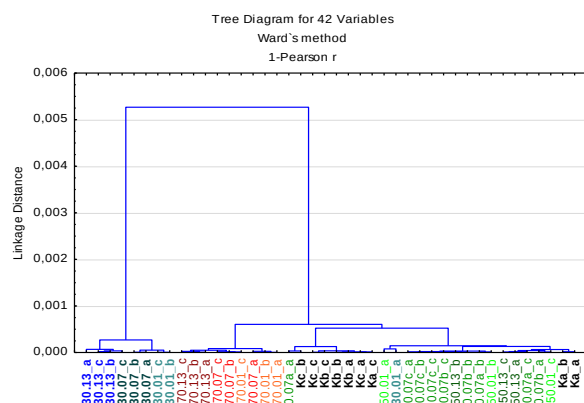
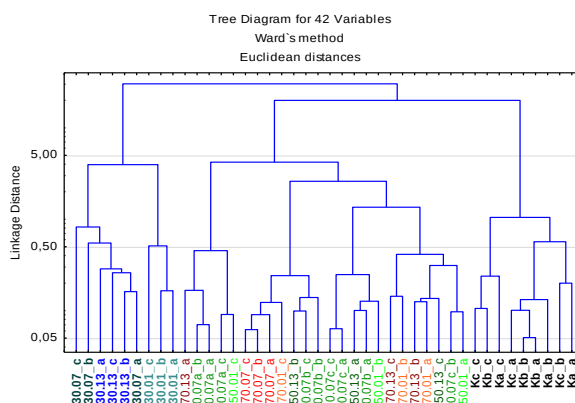
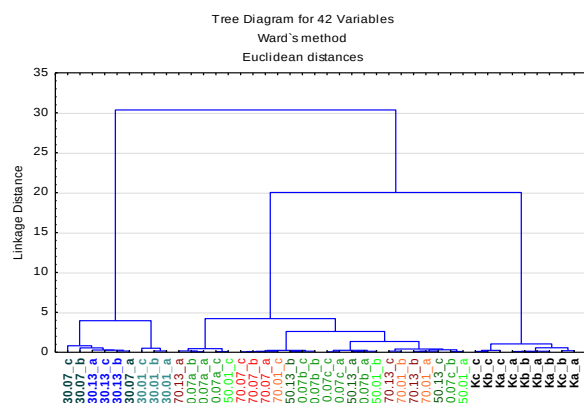
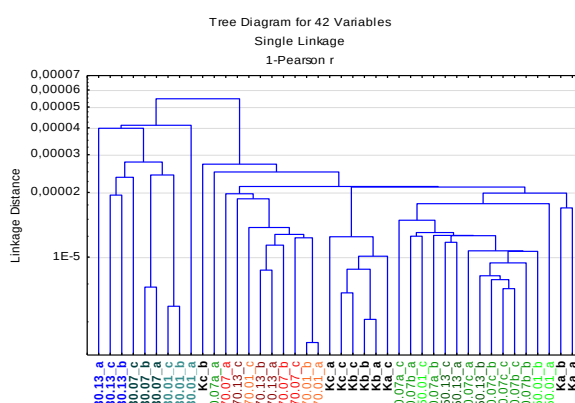
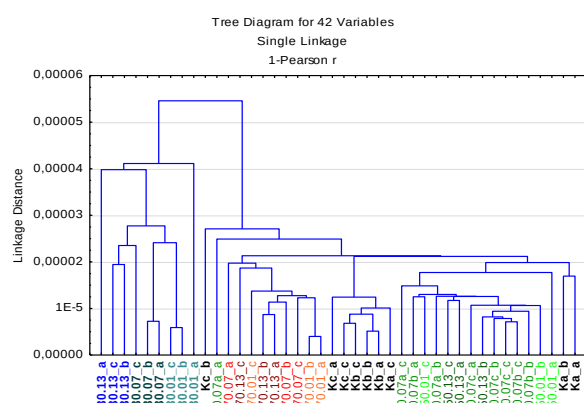
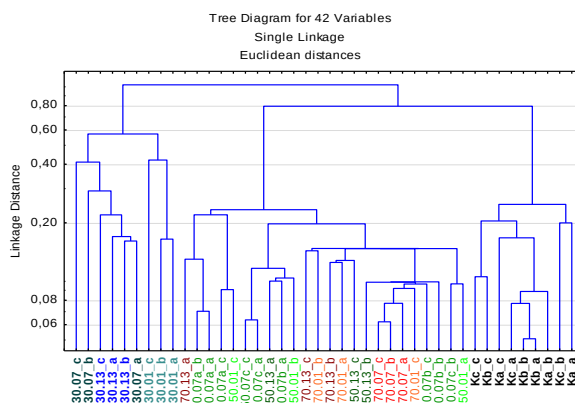
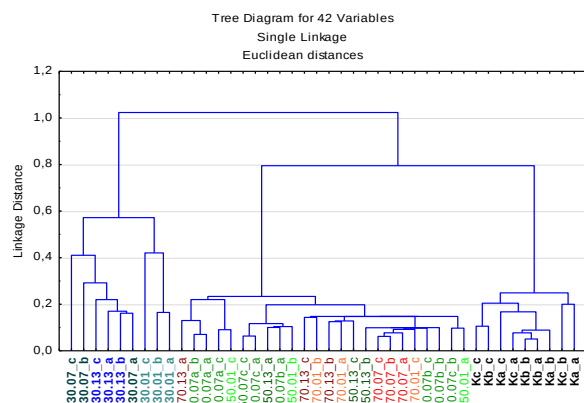
VIS alapspektrumokra végzett klaszteranalízis dendrogramjai



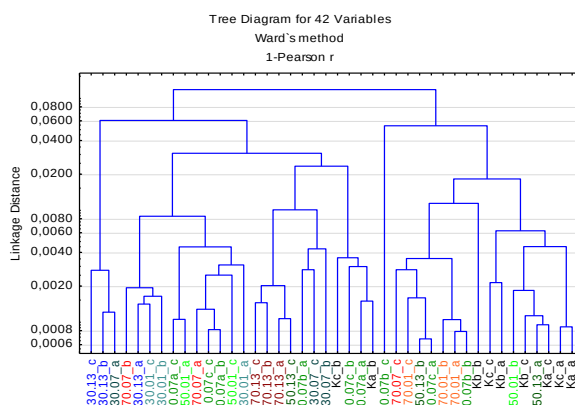
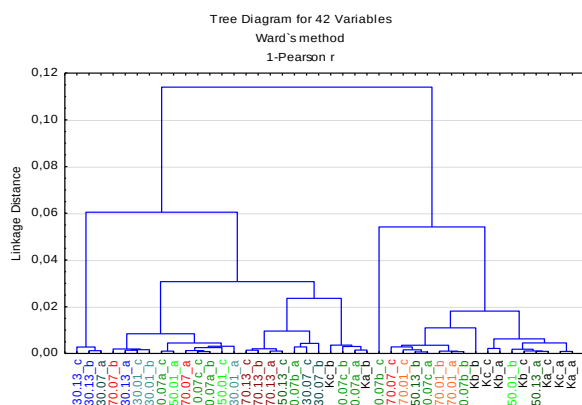
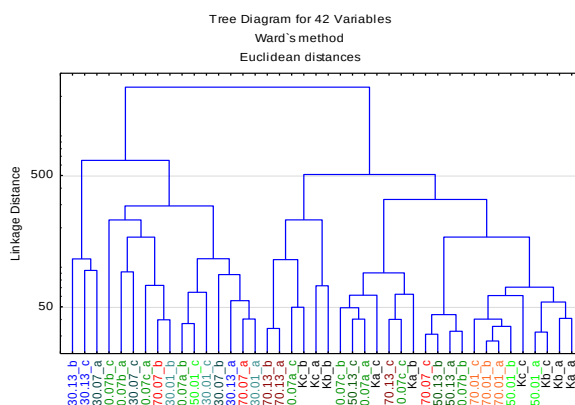
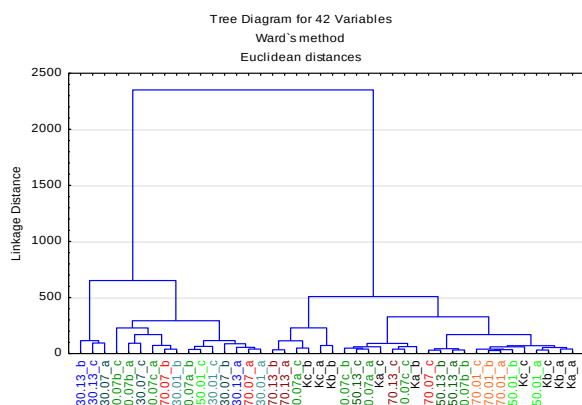
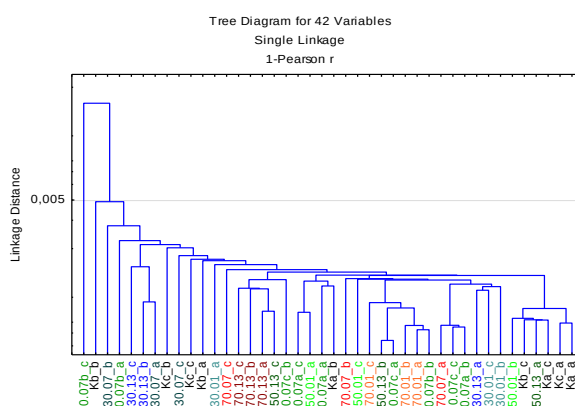
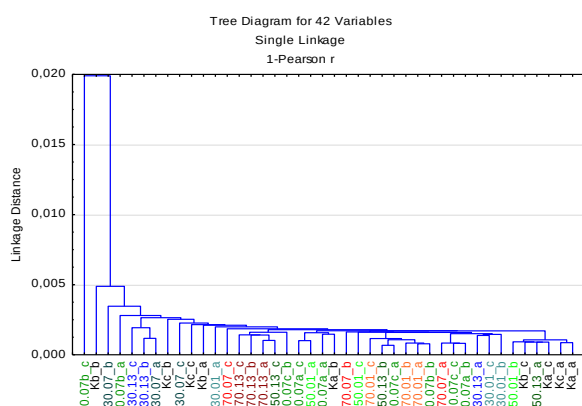
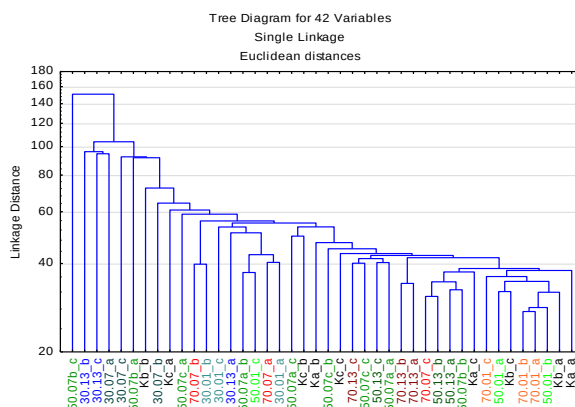
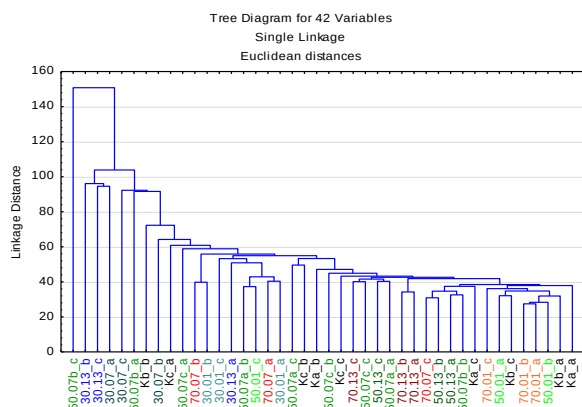
NIR alapspektrumokra végzett klaszteranalízis dendrogramjai



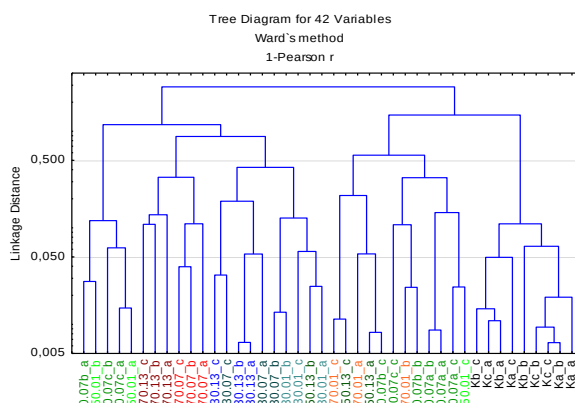
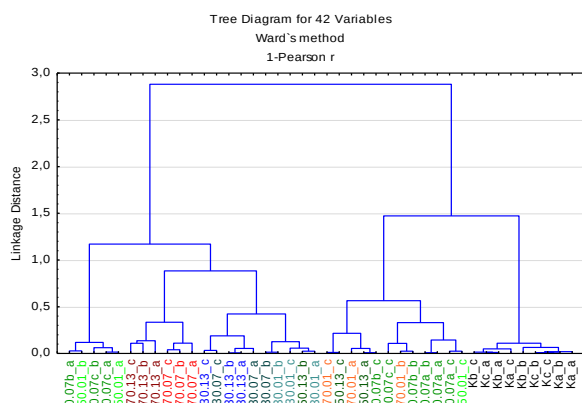
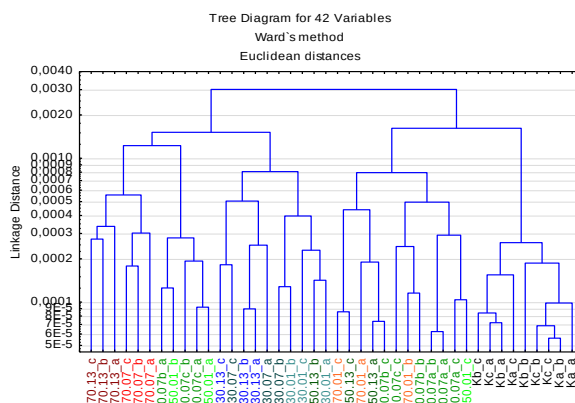
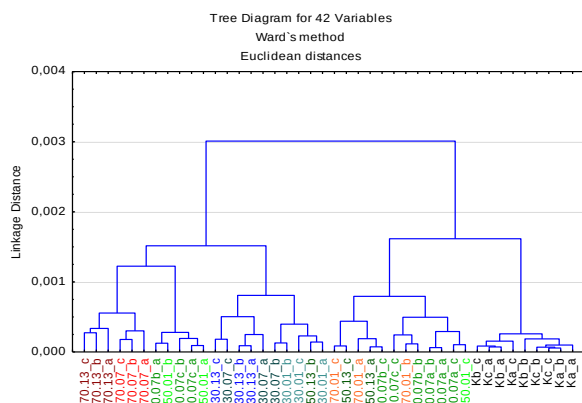
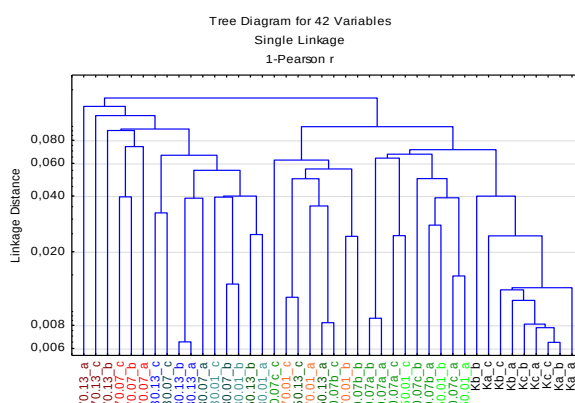
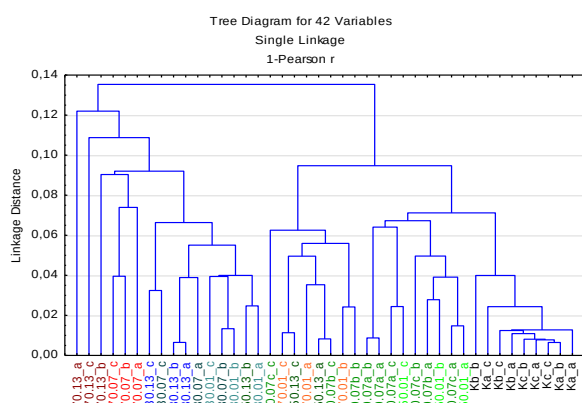
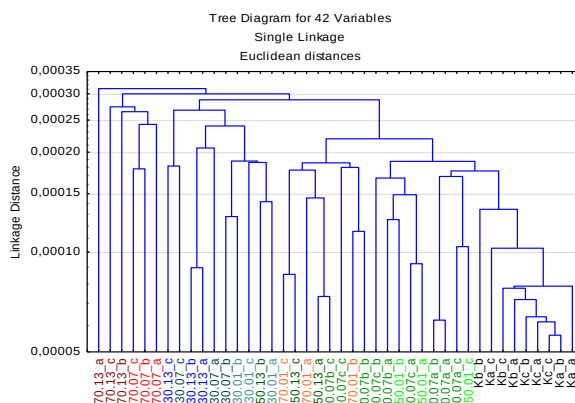
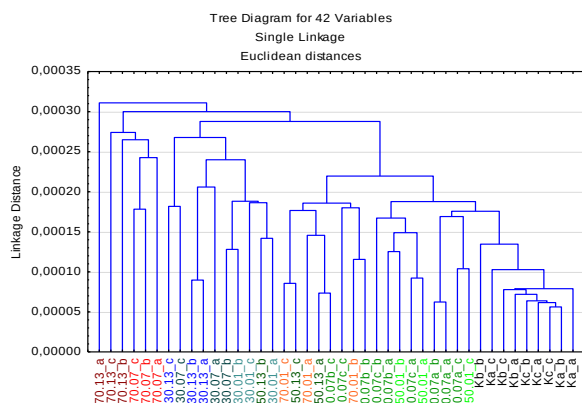
FT-NIR alapspektrumokra végzett klaszteranalízis dendrogramjai



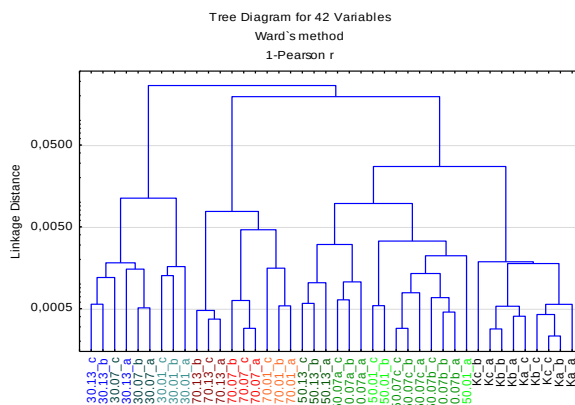
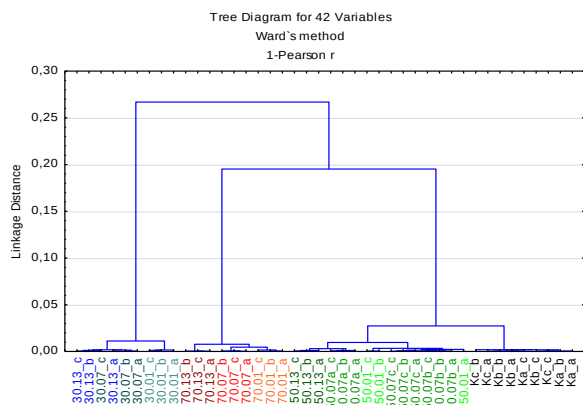
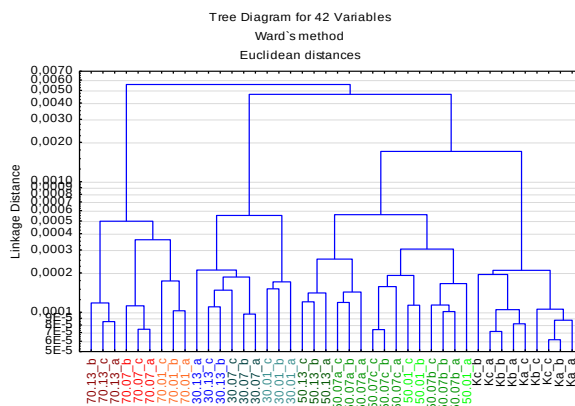
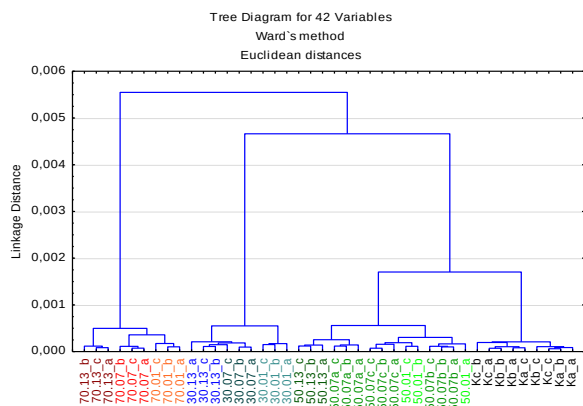
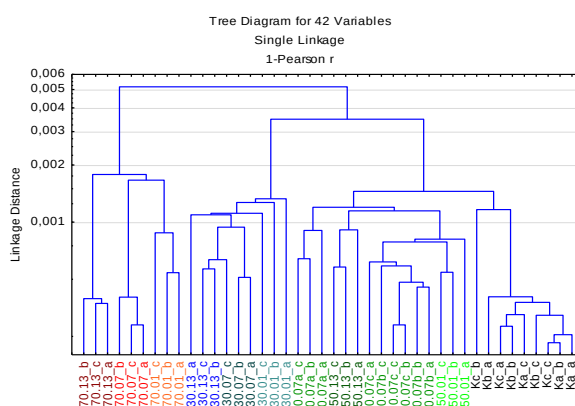
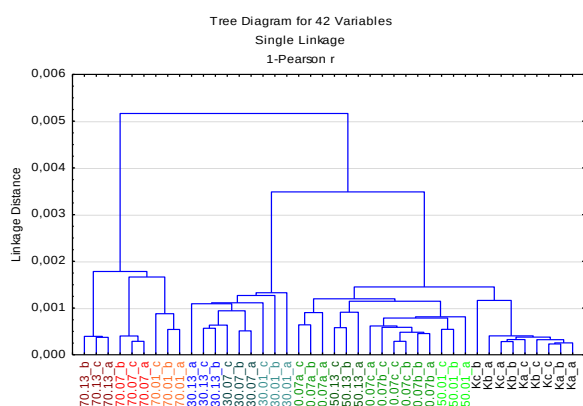
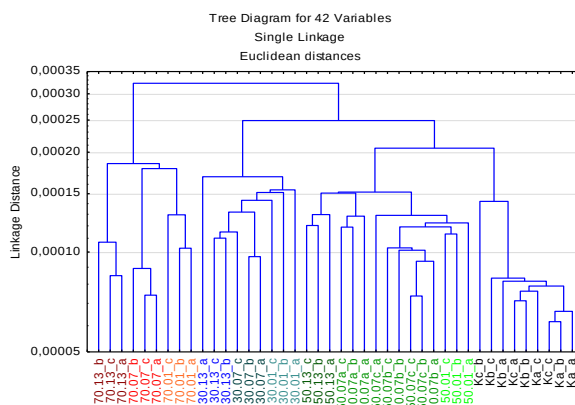
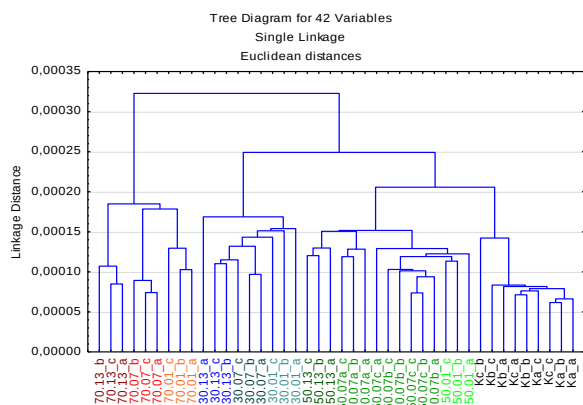
FT-IR alapspektrumokra végzett klaszteranalízis dendrogramjai



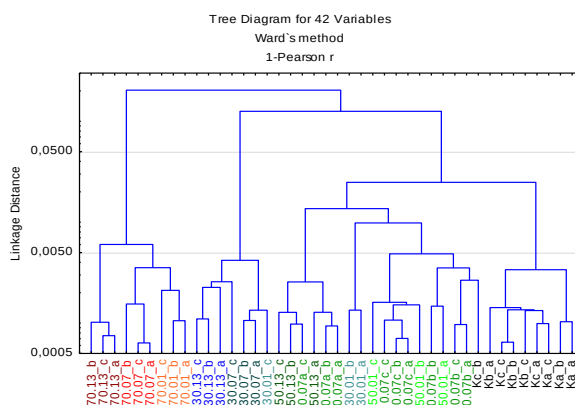
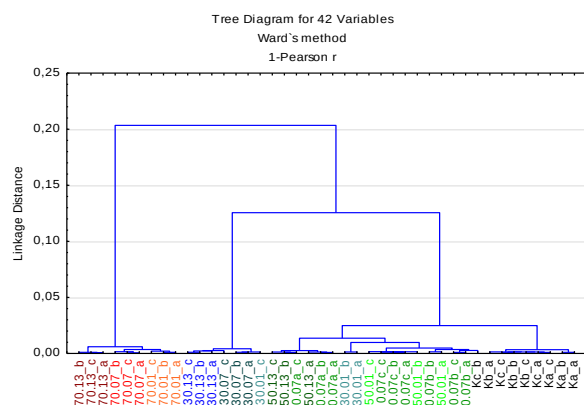
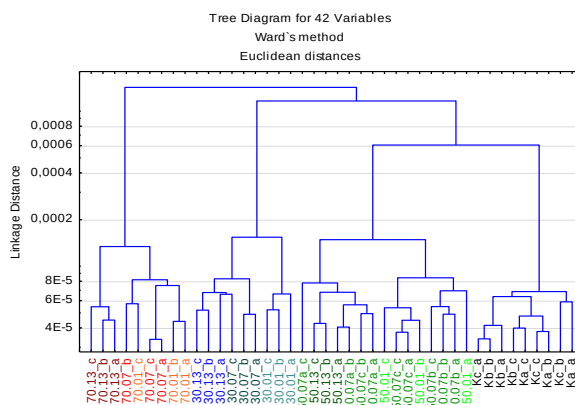
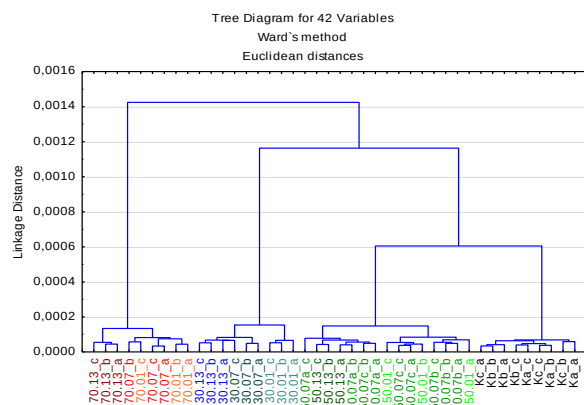
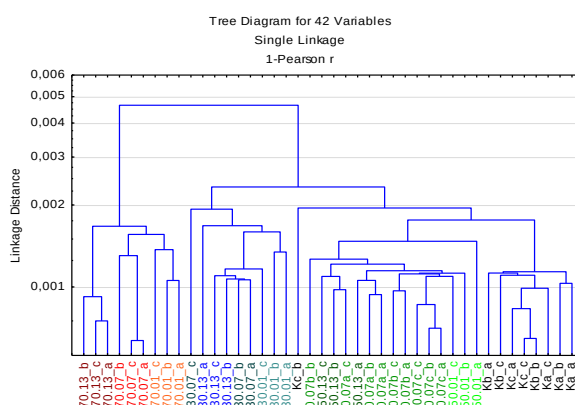
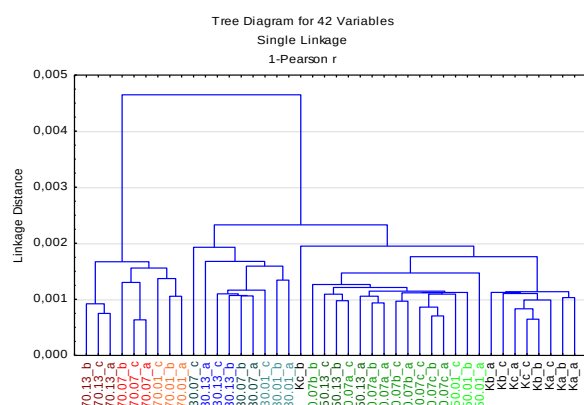
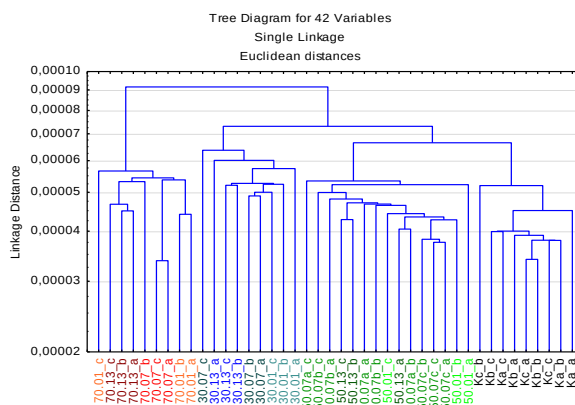
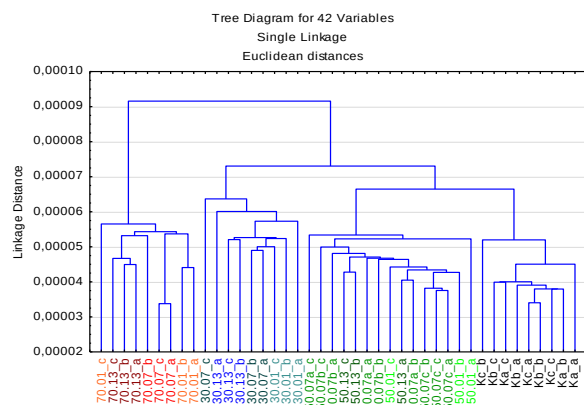
Második derivált VIS spektrumokra végzett klaszteranalízis dendrogramjai (D2_5pt)



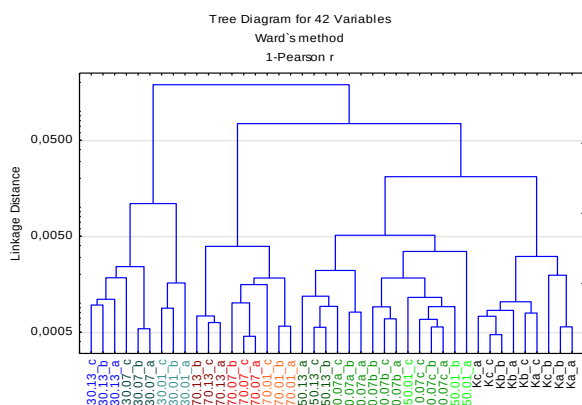
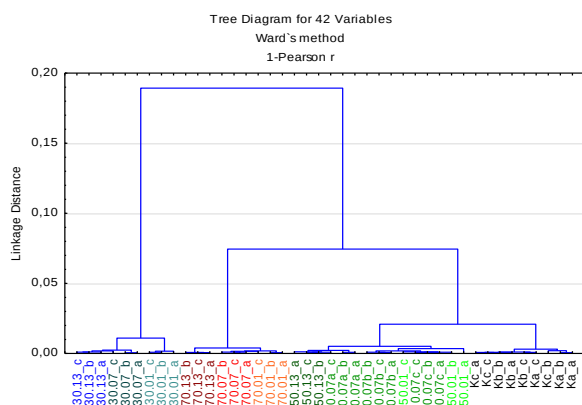
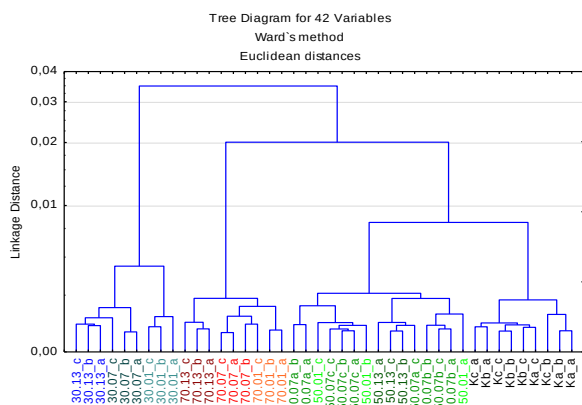
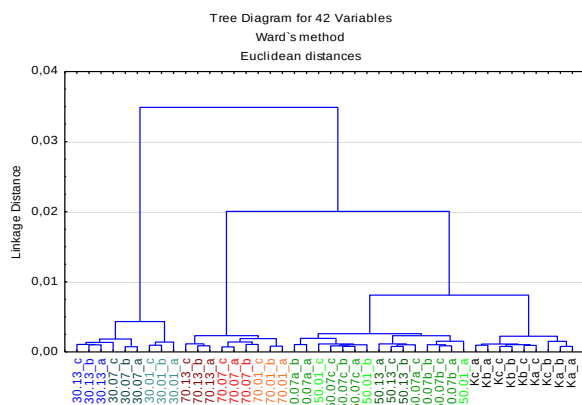
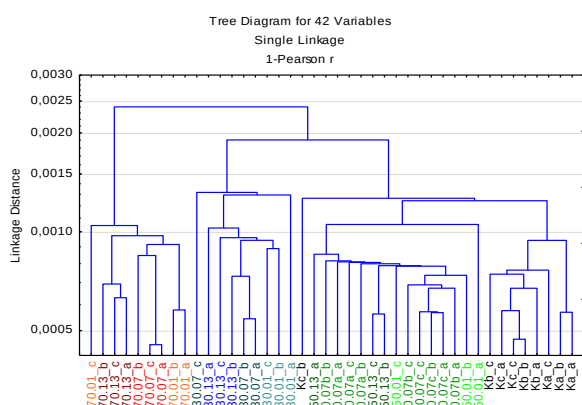
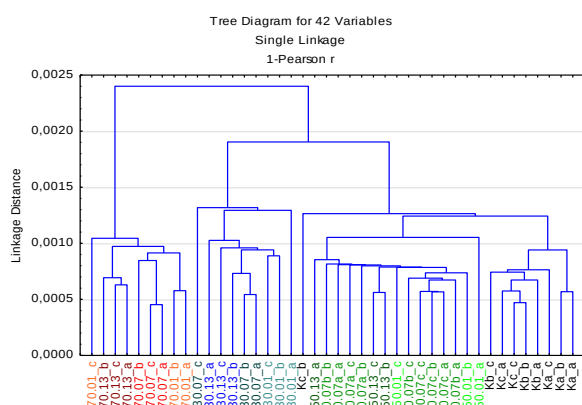
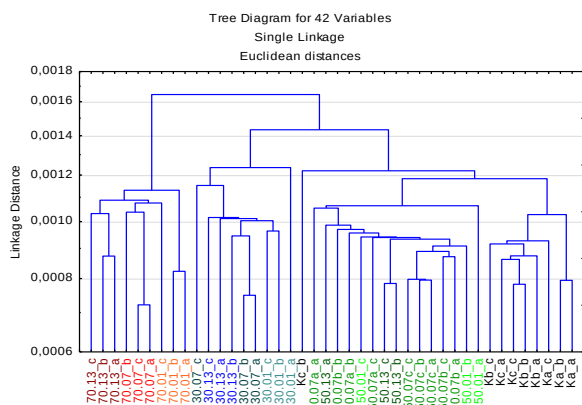
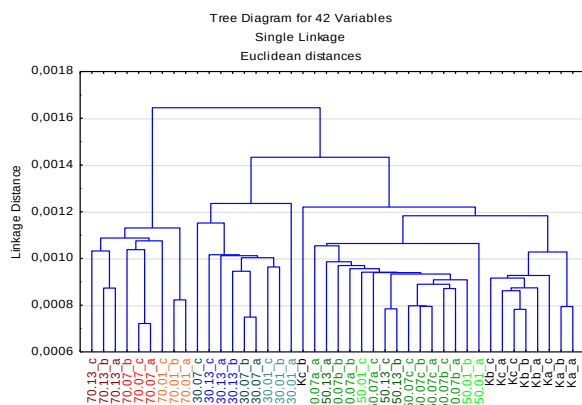
Második derivált NIR spektrumokra végzett klaszteranalízis dendrogramjai (D2_5pt)



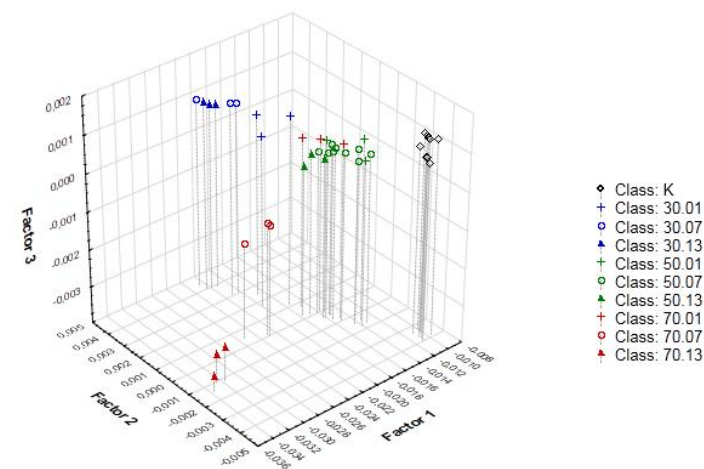
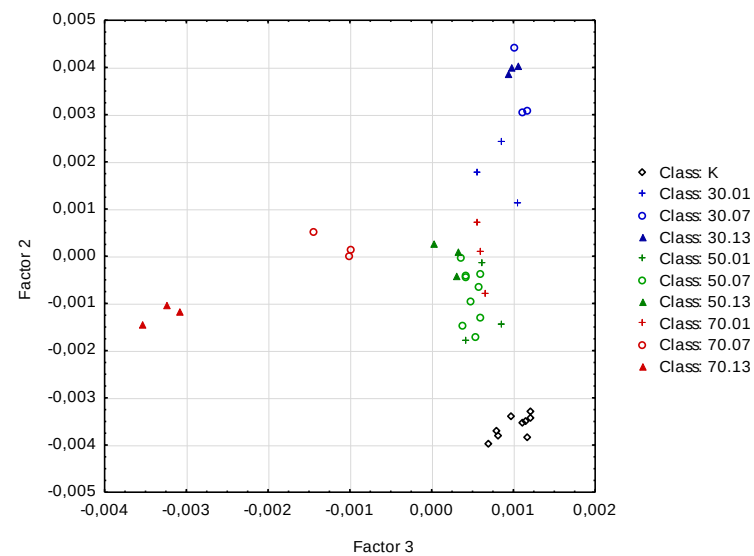
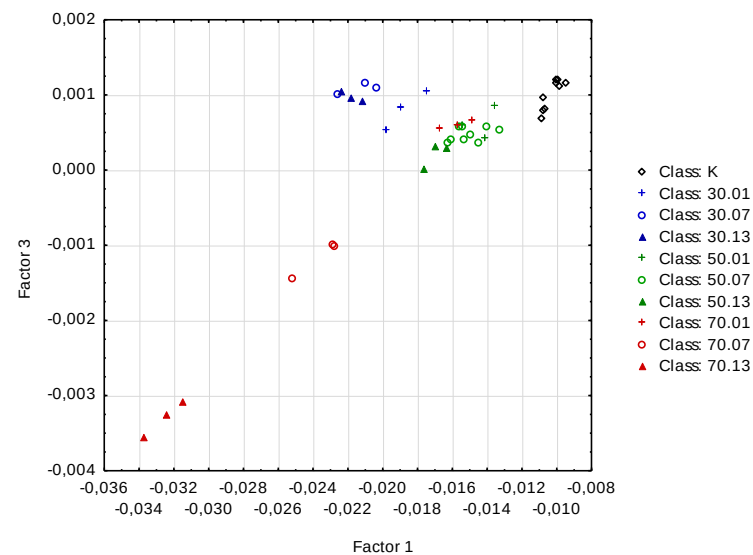
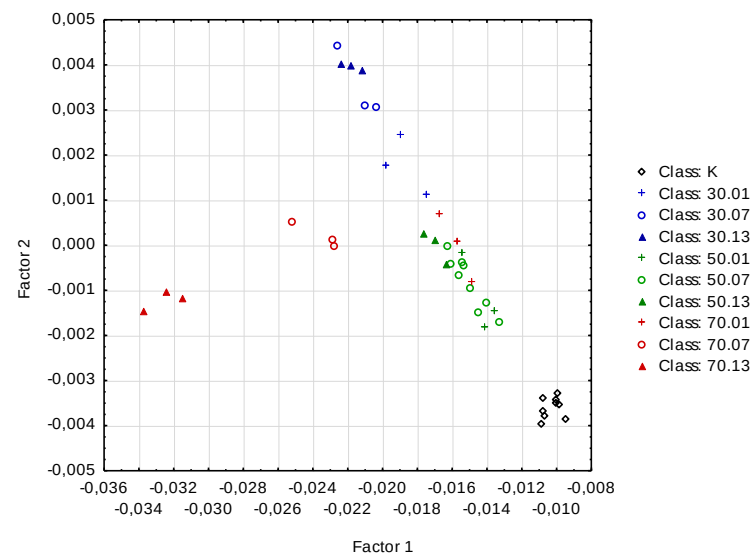
Második derivált FT-NIR spektrumokra végzett klaszteranalízis dendrogramjai (D2_19pt)



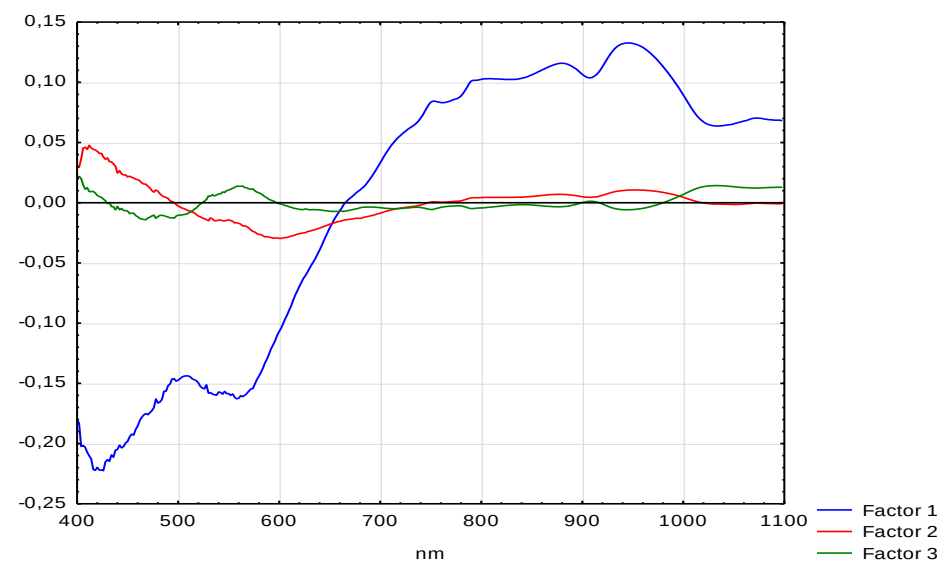
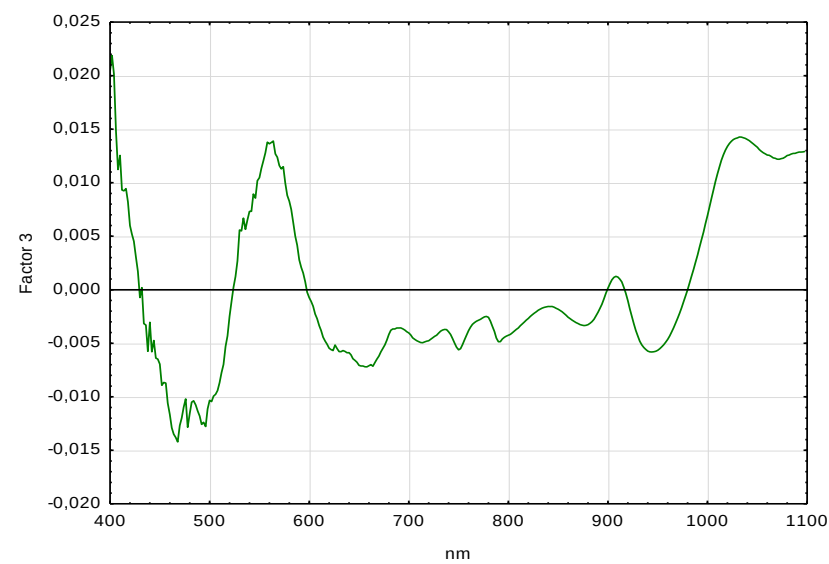
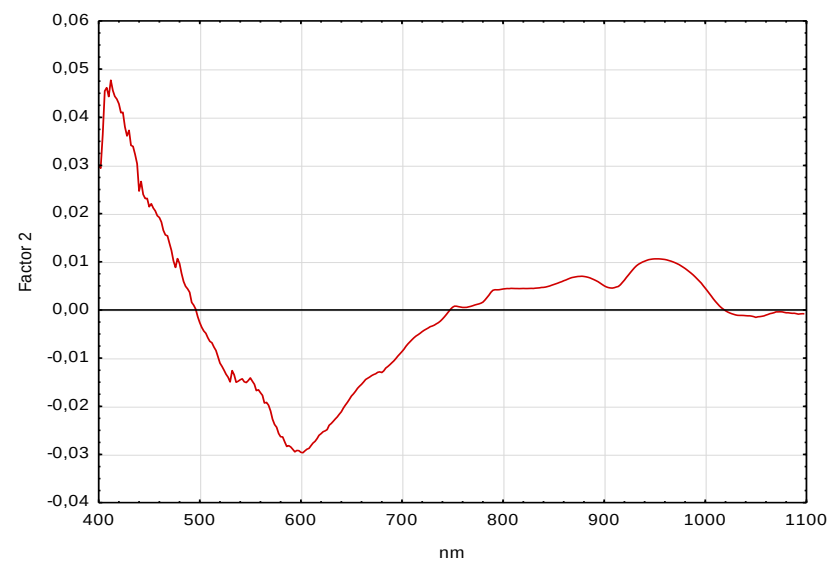
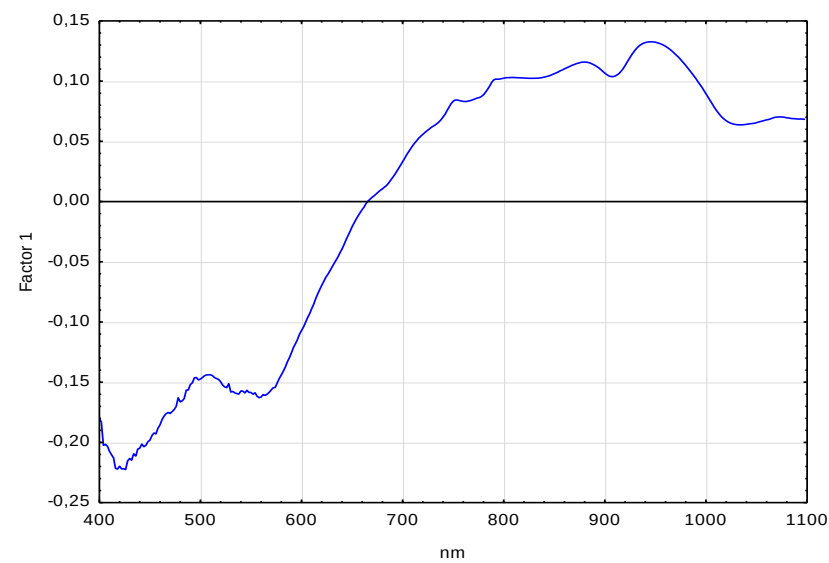
MSC-t követő Savitzky-Golay simításos derivált FT-NIR spektrumokra végzett klaszteranalízis



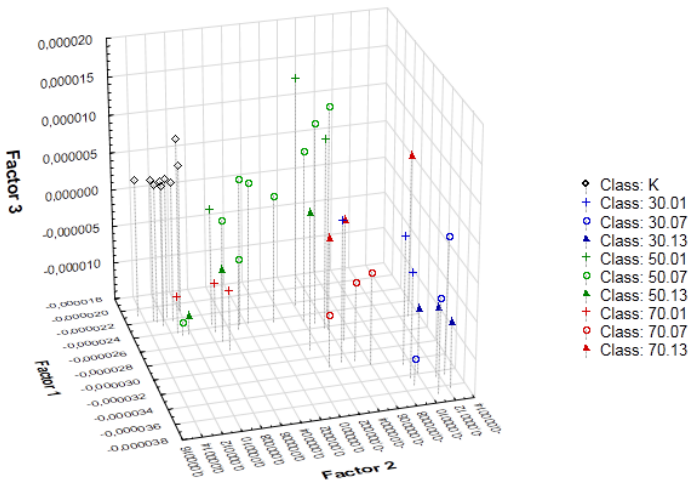
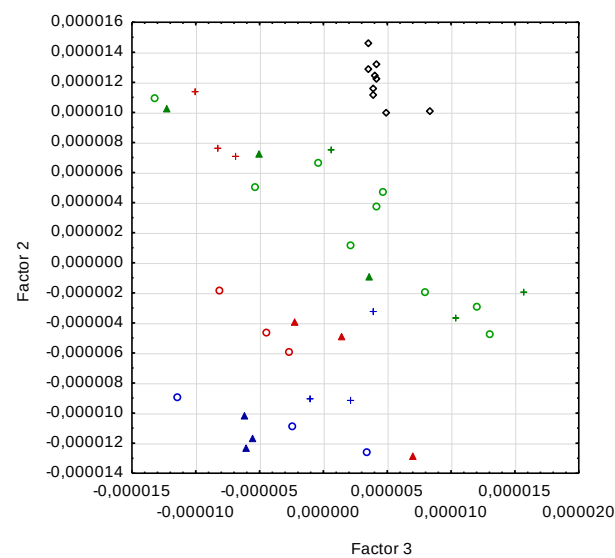
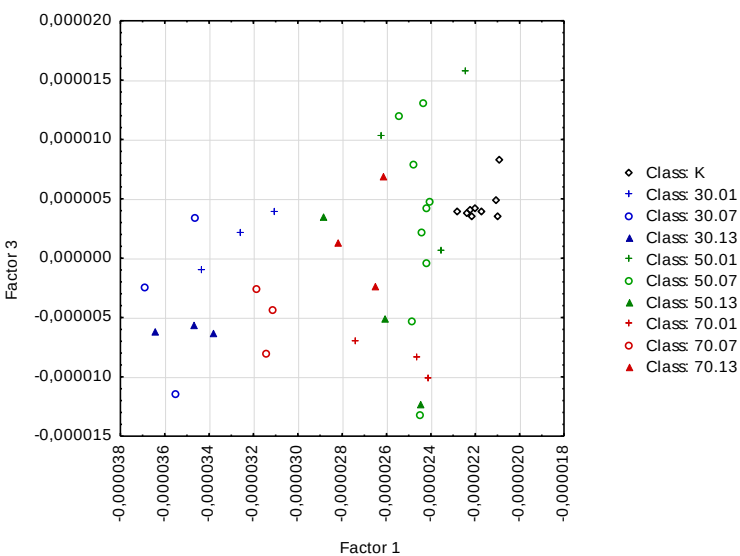
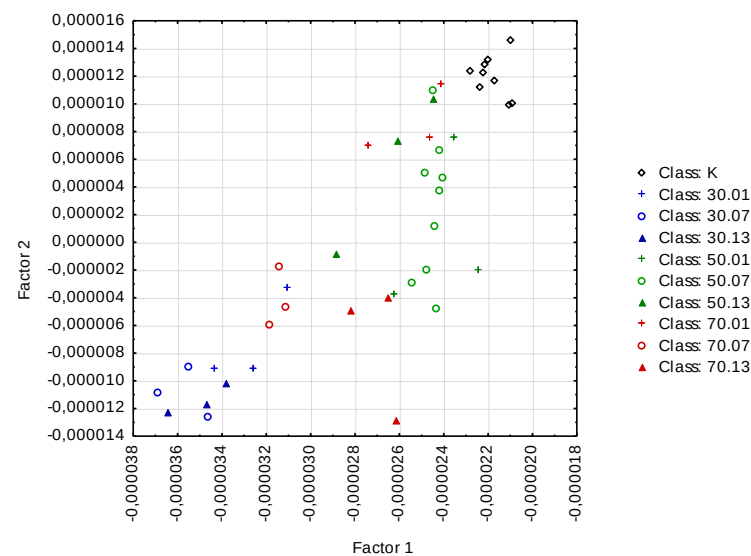
PCA score plotok VIS alapspektrumok alapján



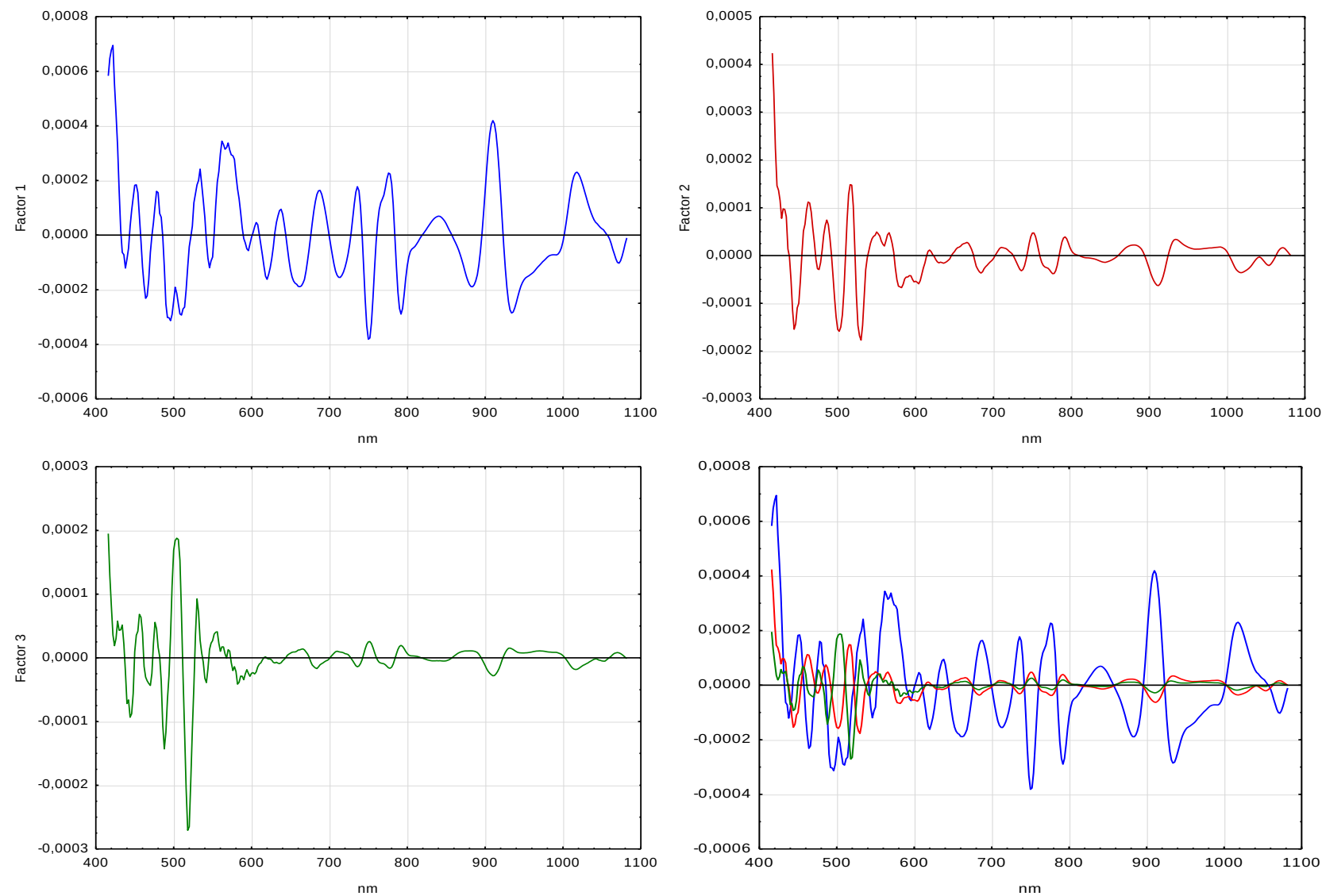
PCA súlyfüggvények VIS alapspektrumok alapján



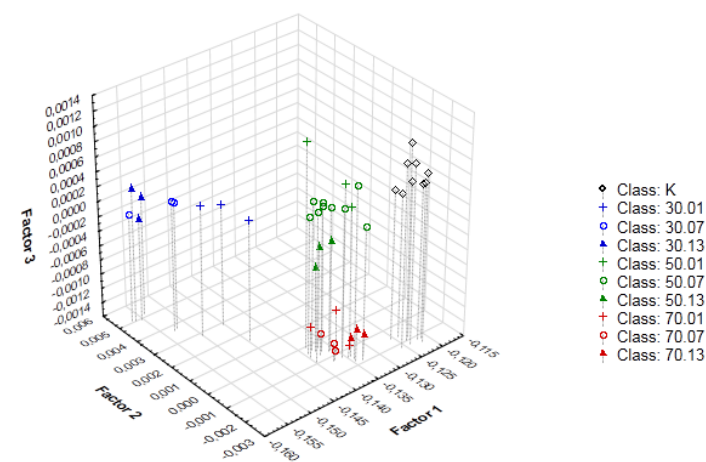
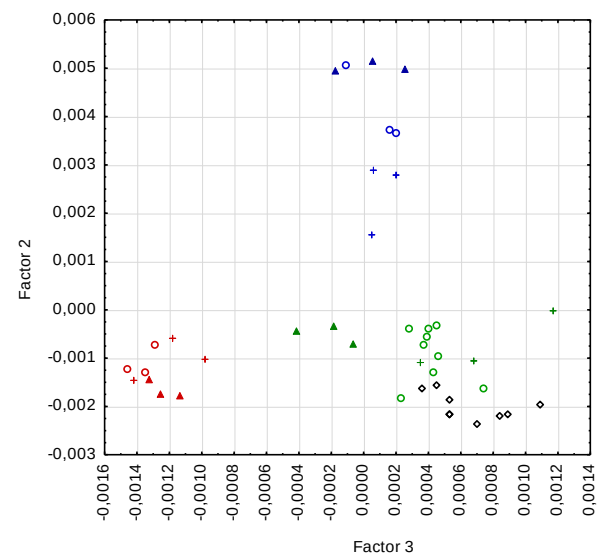
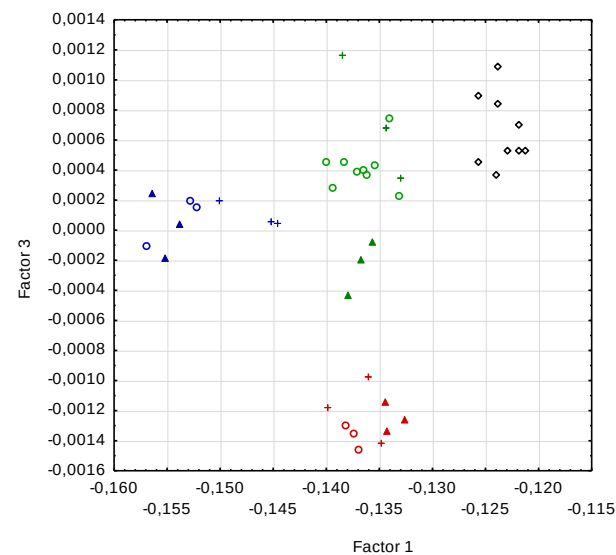
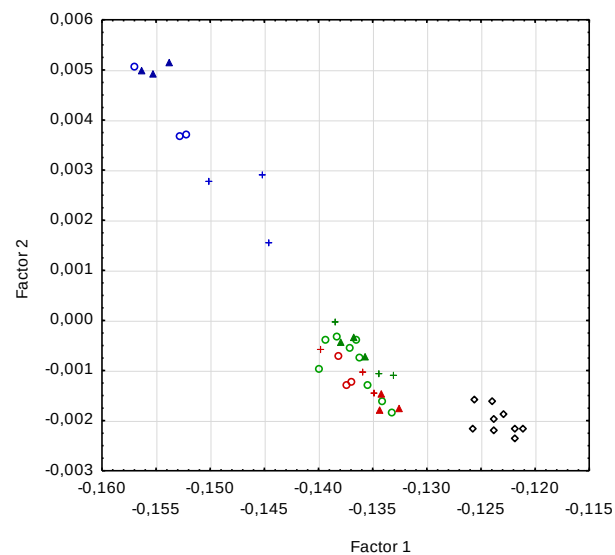
PCA score plotok második derivált VIS spektrumok alapján (D2_5pt)



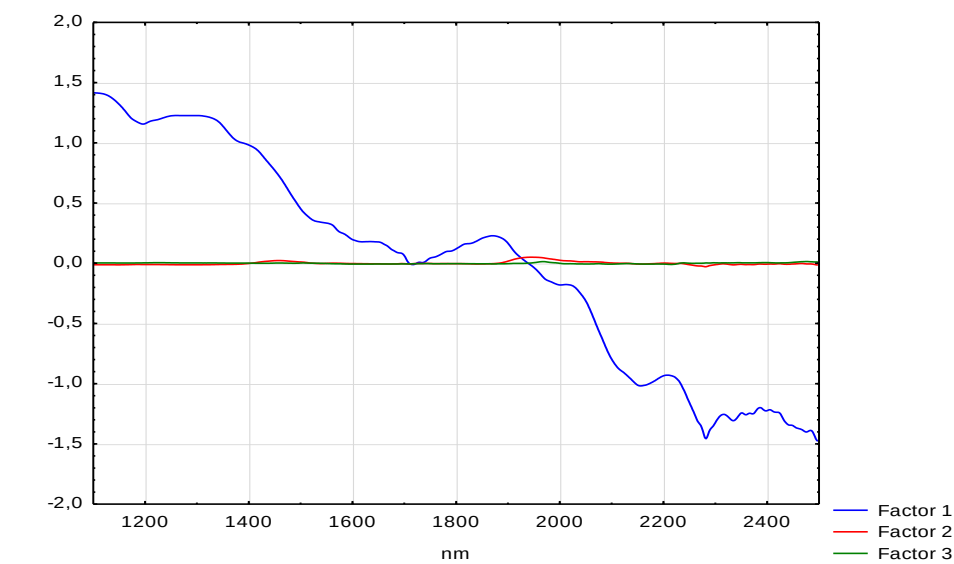
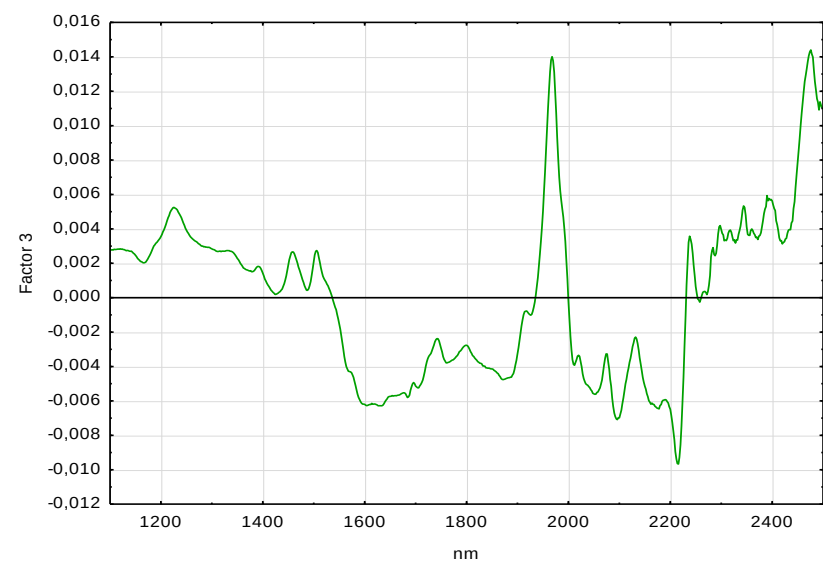
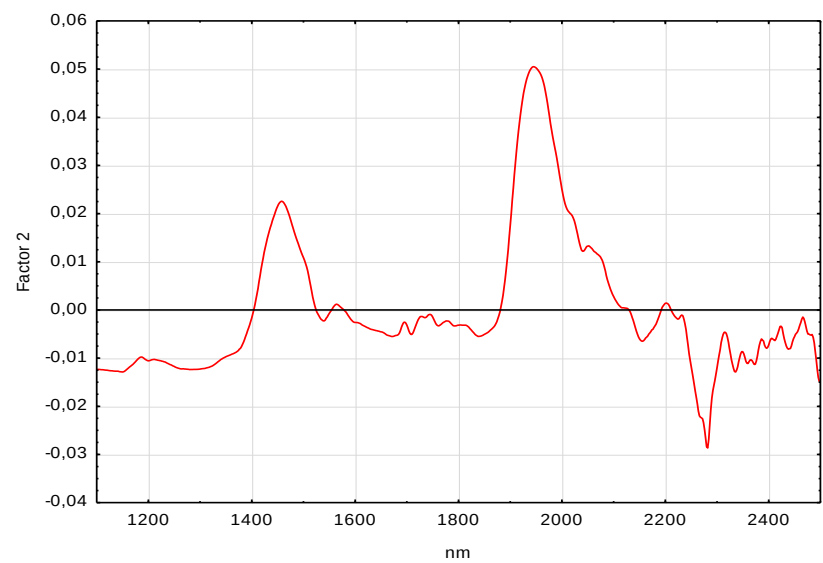
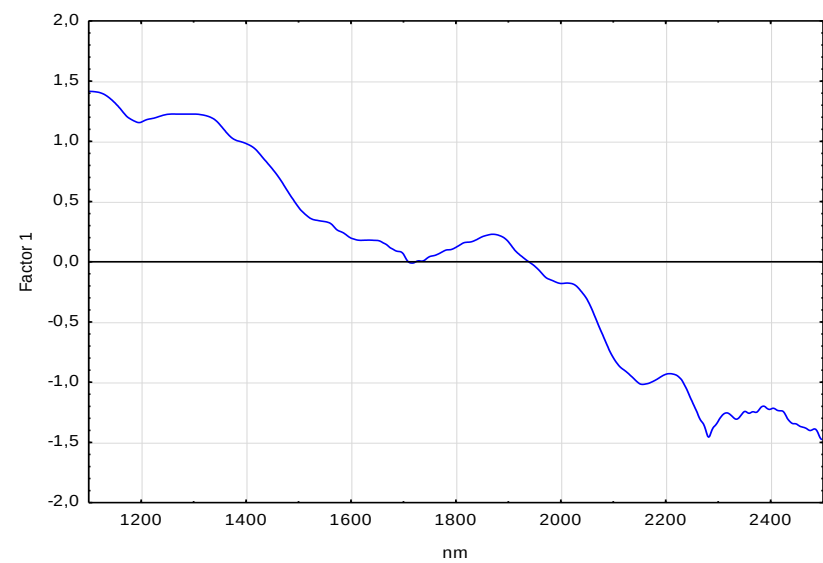
PCA súlyfüggvények második derivált VIS spektrumok alapján (D2_5pt)



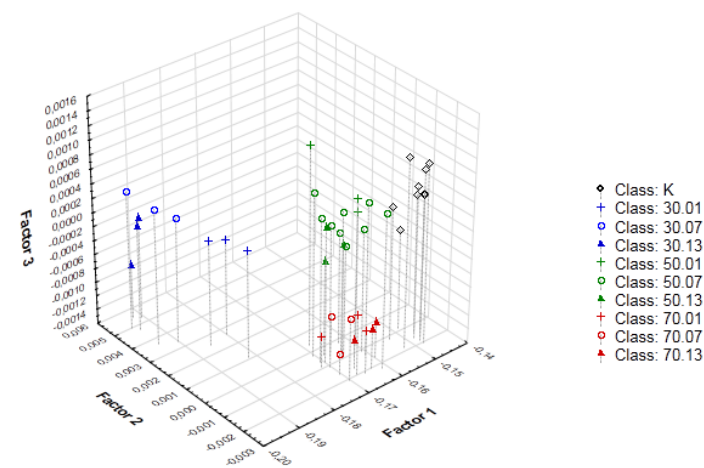
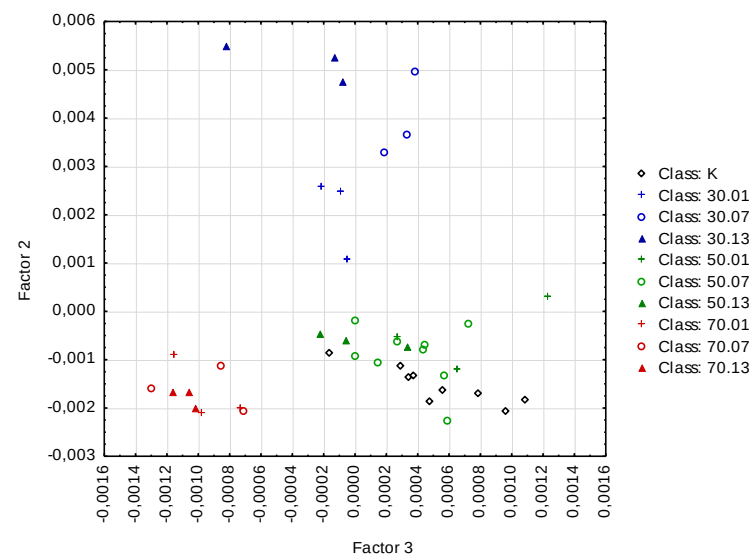
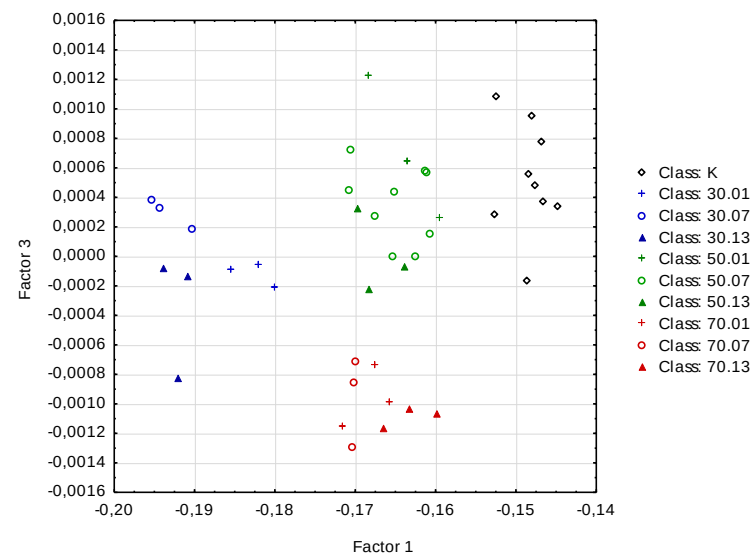
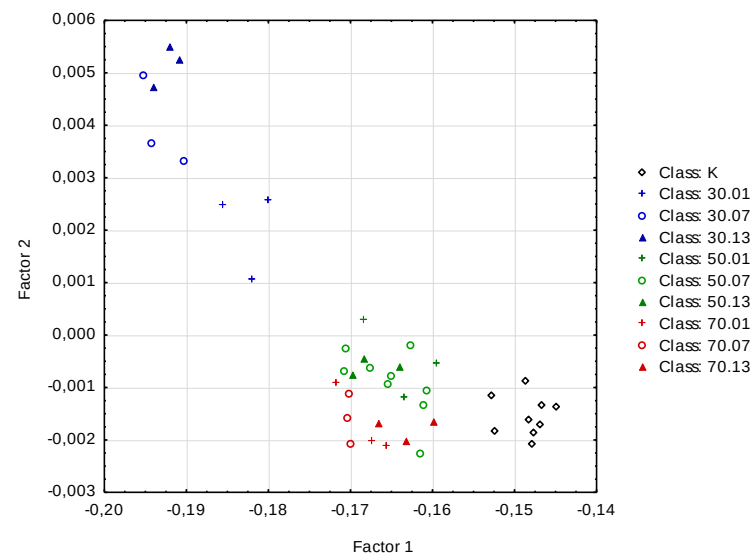
PCA score plotok NIR alapspektrumok alapján



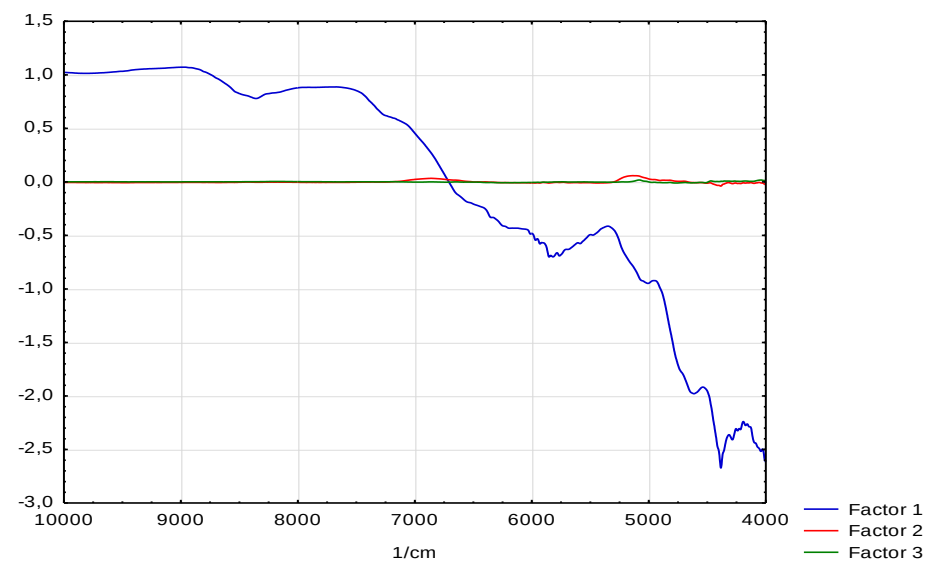
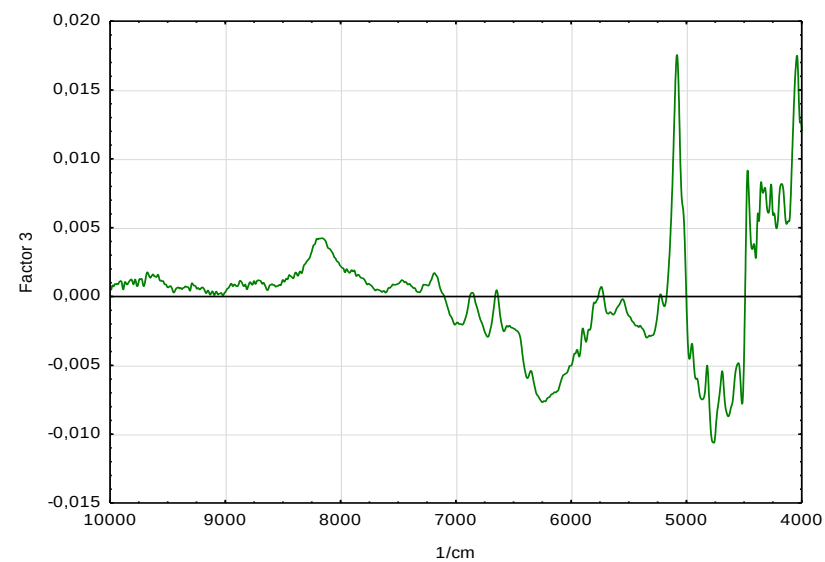
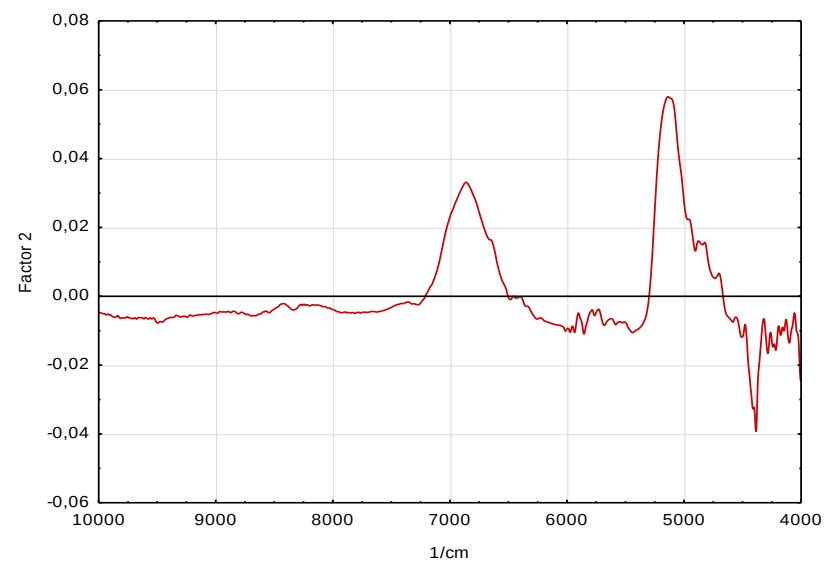
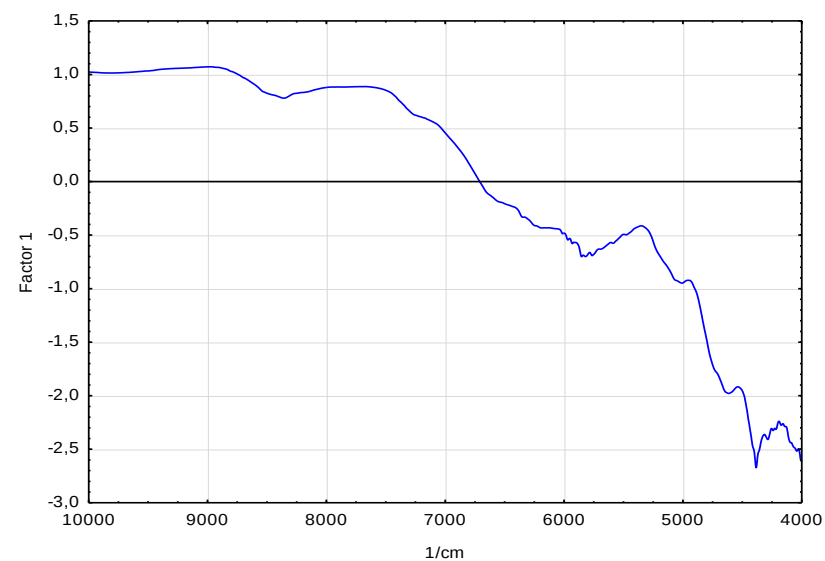
PCA súlyfüggvények NIR alapspektrumok alapján



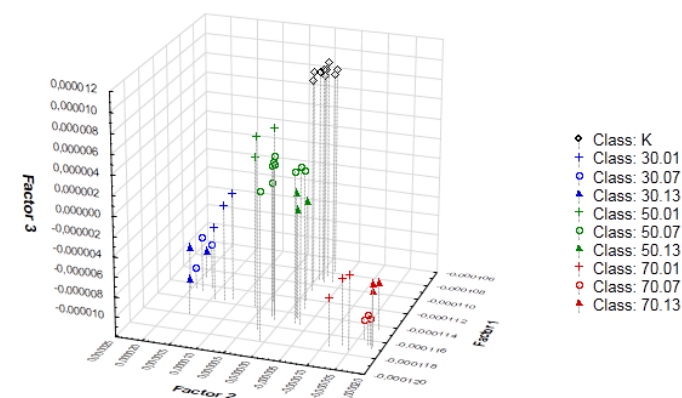
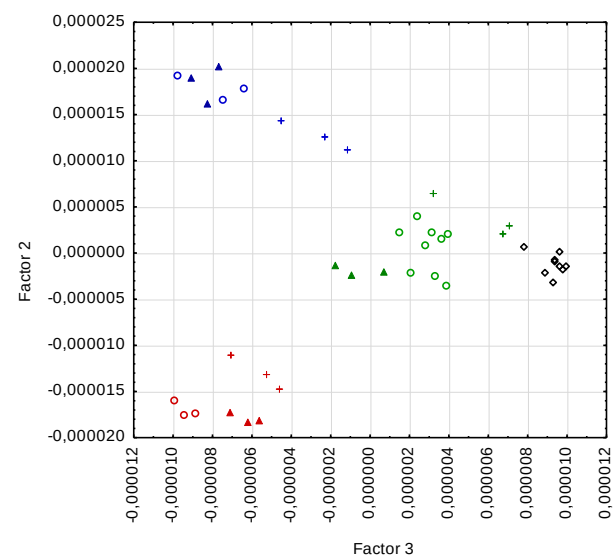
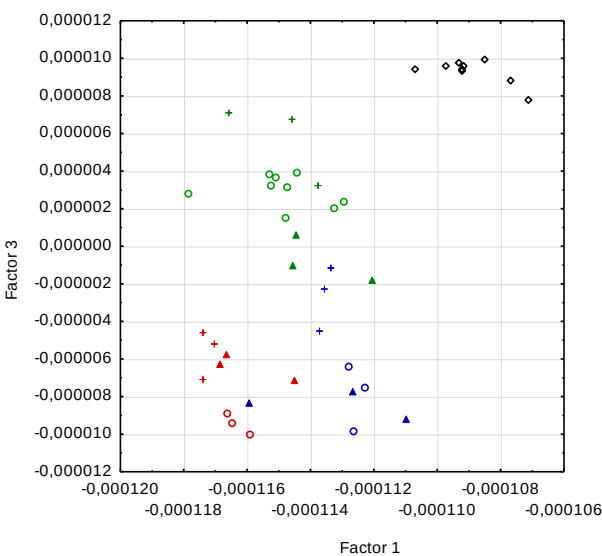
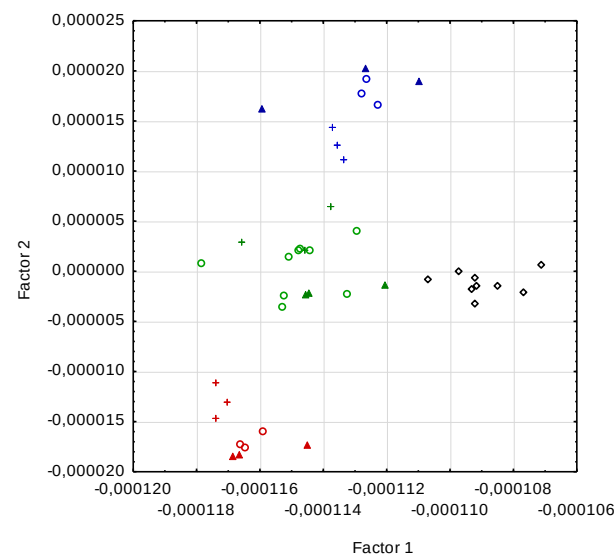
PCA score plotok FT-NIR alapspektrumok alapján



PCA súlyfüggvények FT-NIR alapspektrumok alapján



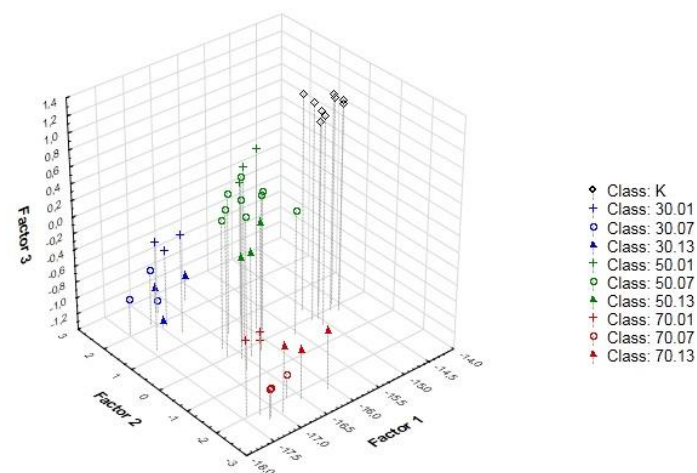
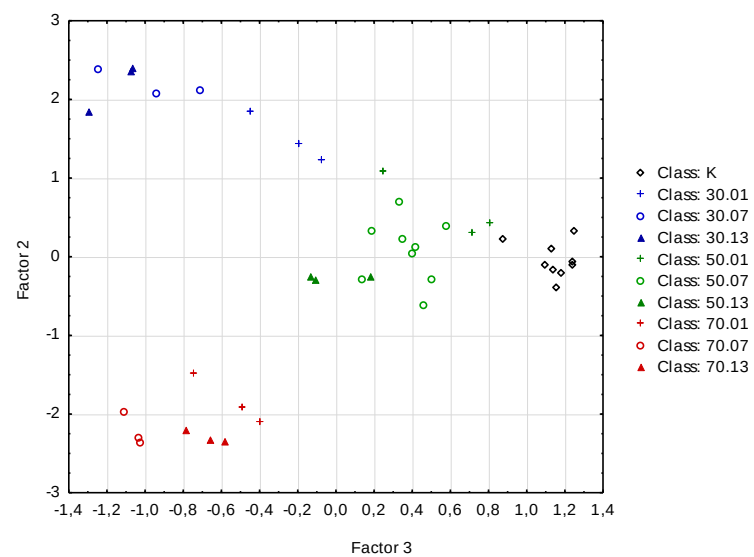
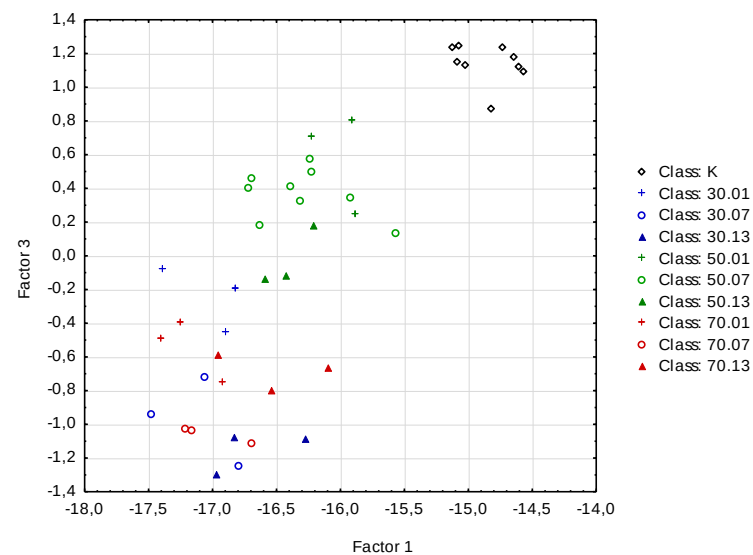
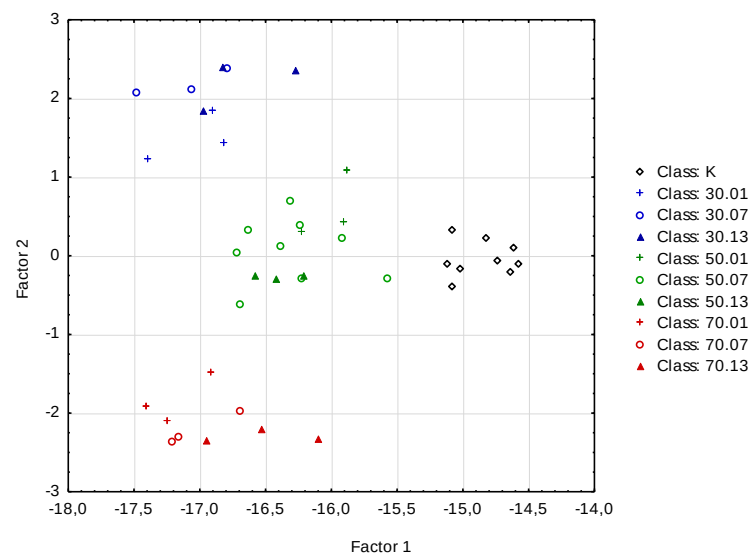
PCA score plotok második derivált NIR spektrumok alapján (D2_5pt)



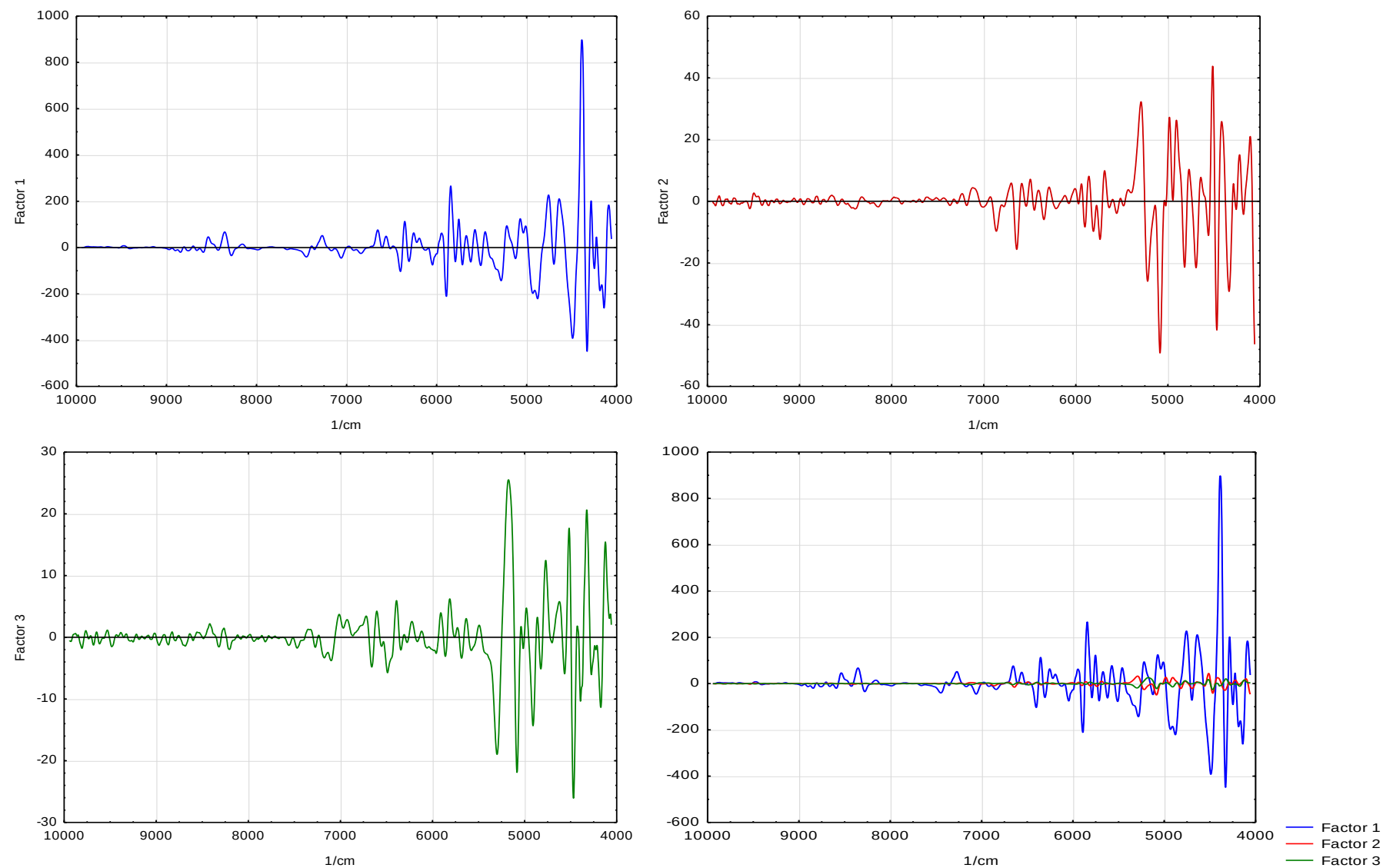
PCA súlyfüggvények második derivált NIR spektrumok alapján (D2_5pt)



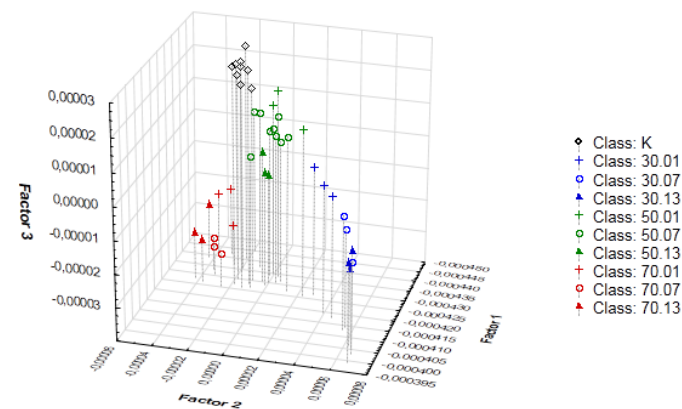
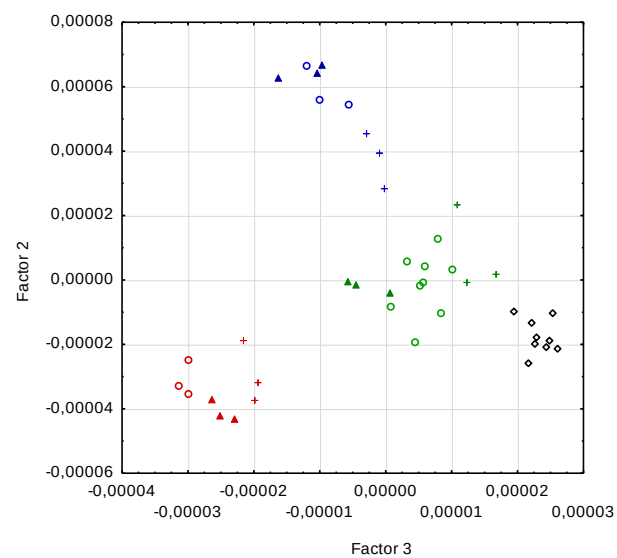
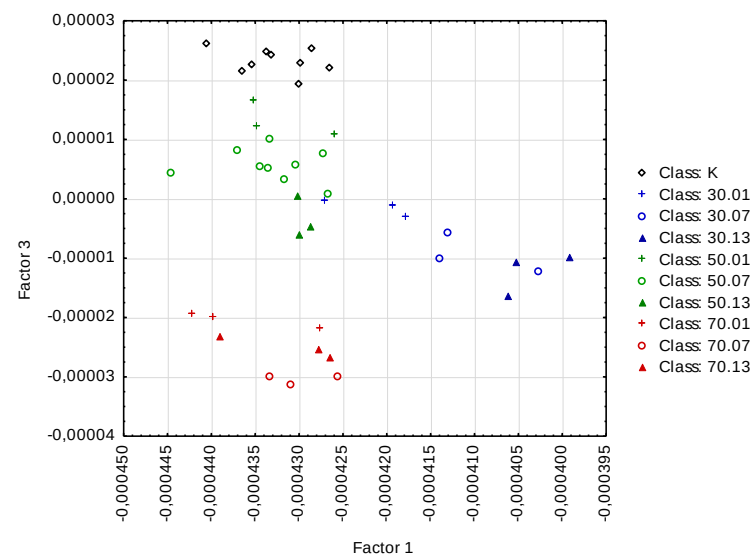
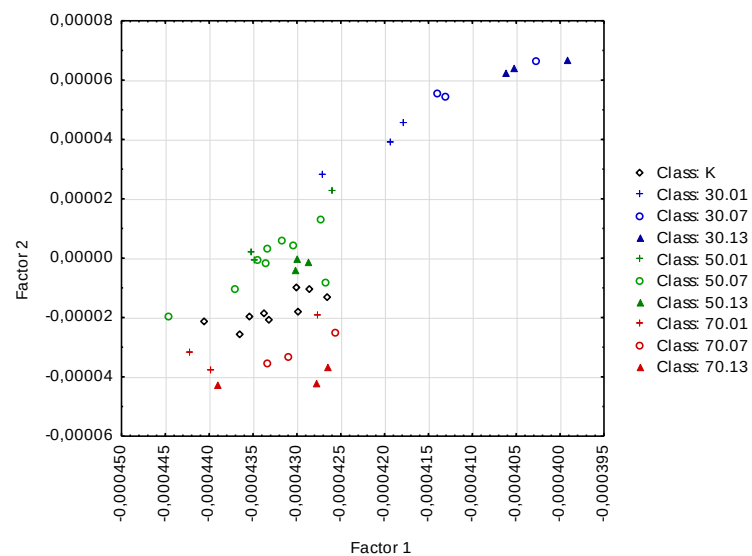
PCA score plotok második derivált FT-NIR spektrumok alapján (D2_19pt)



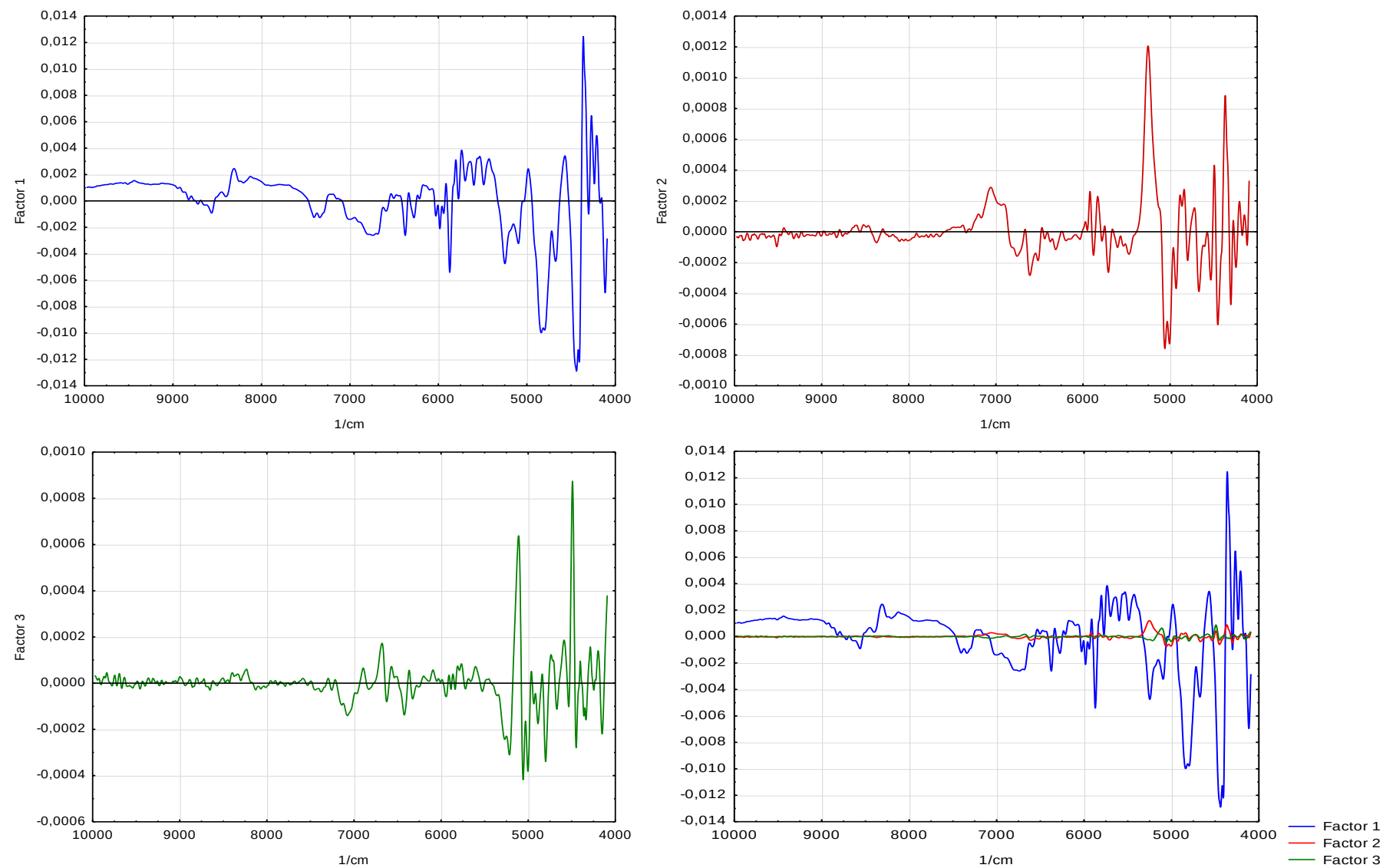
PCA súlyfüggvények második derivált FT-NIR spektrumok alapján (D2_19pt)



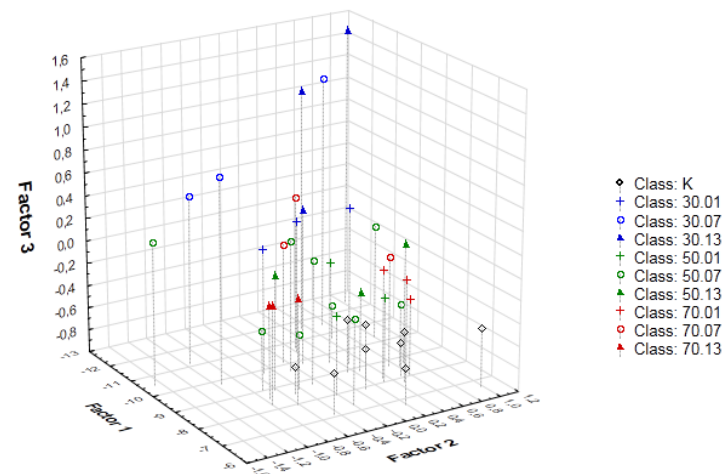
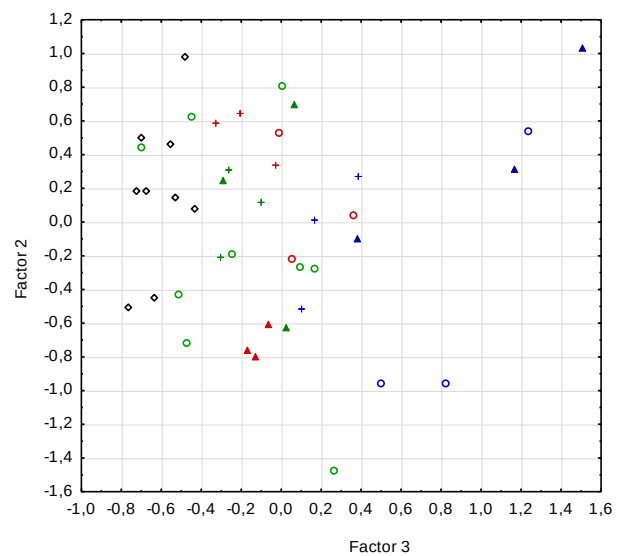
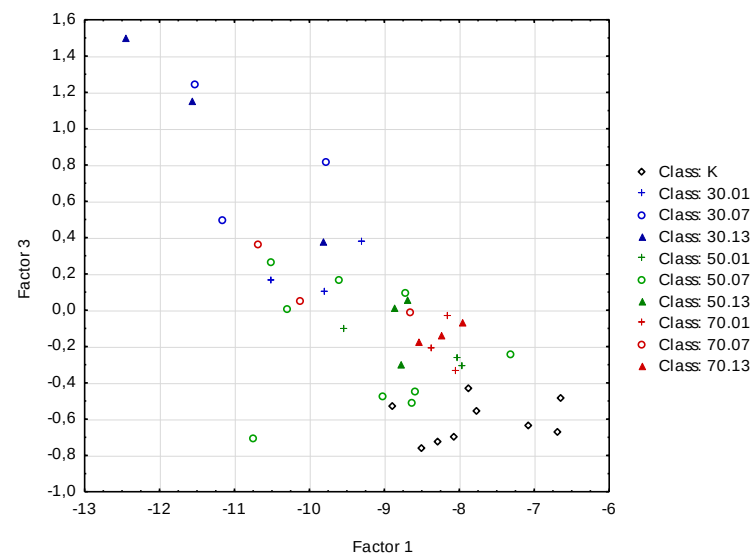
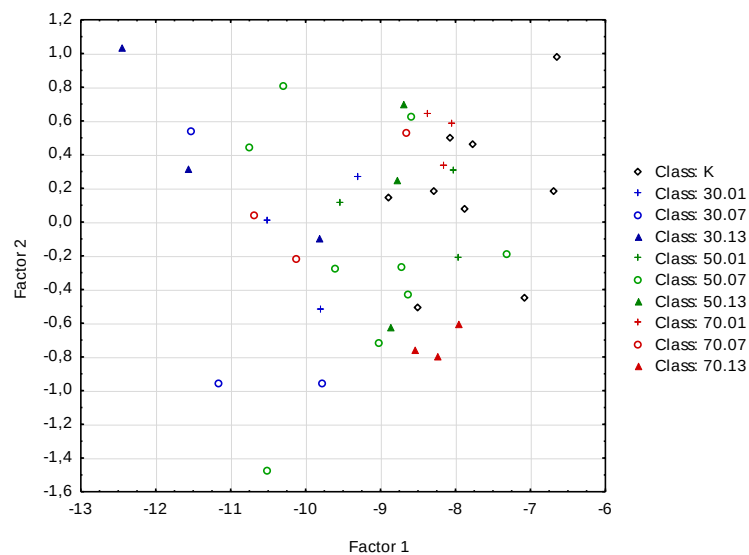
PCA score plotok MSC-t követően Savitzky—Golay derivált FT-NIR spektrumok alapján



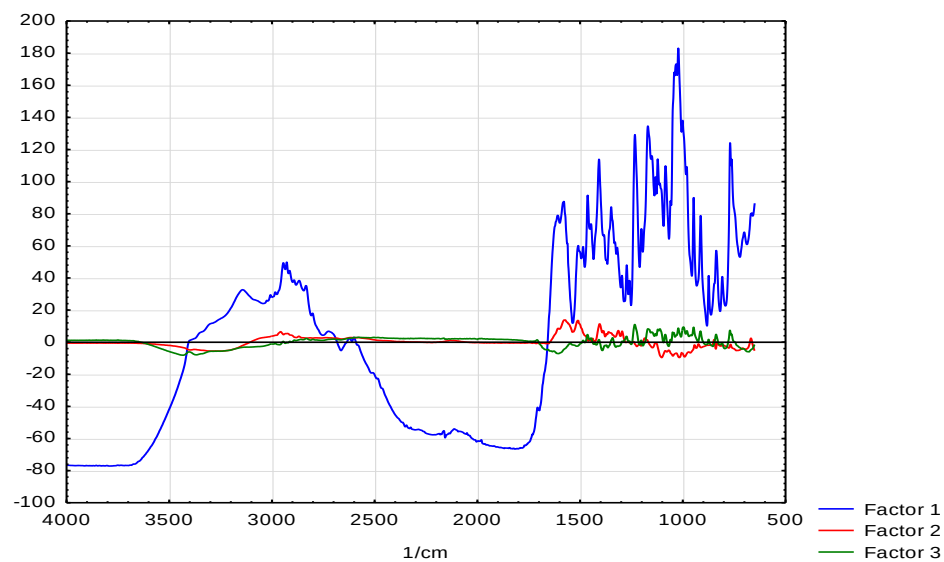
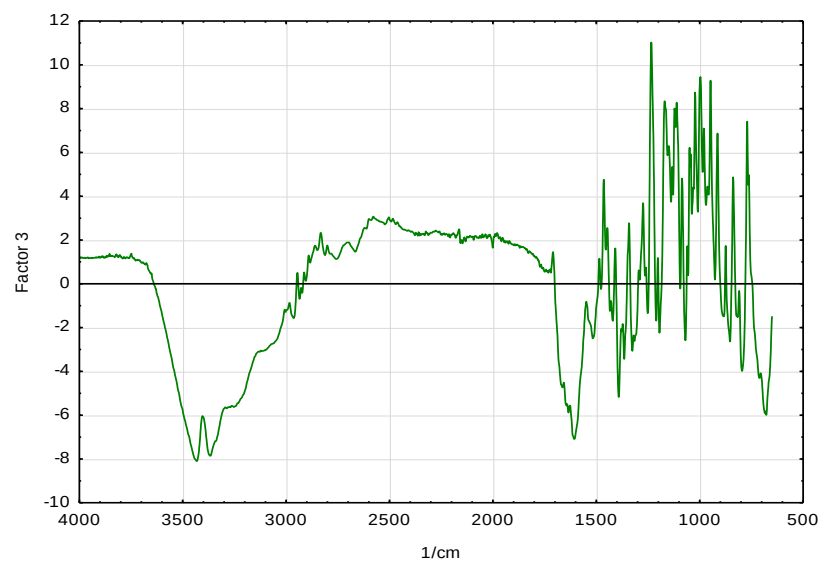
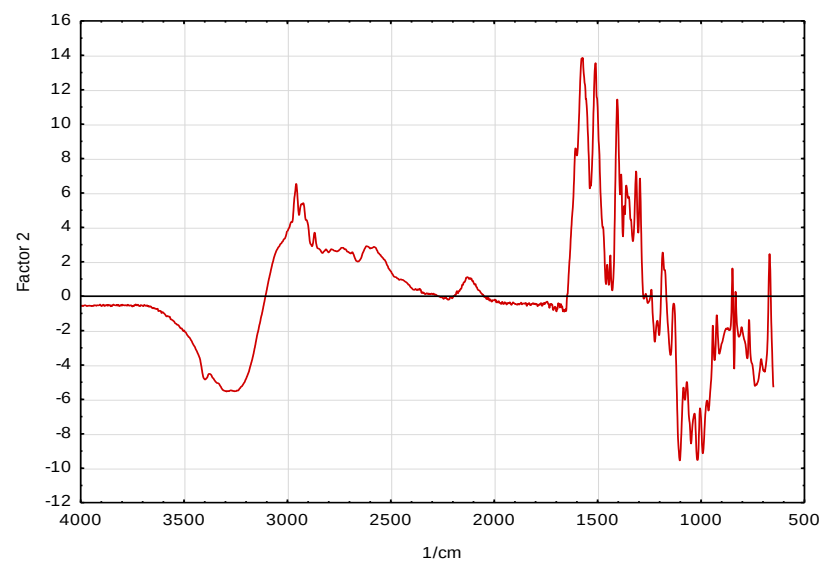
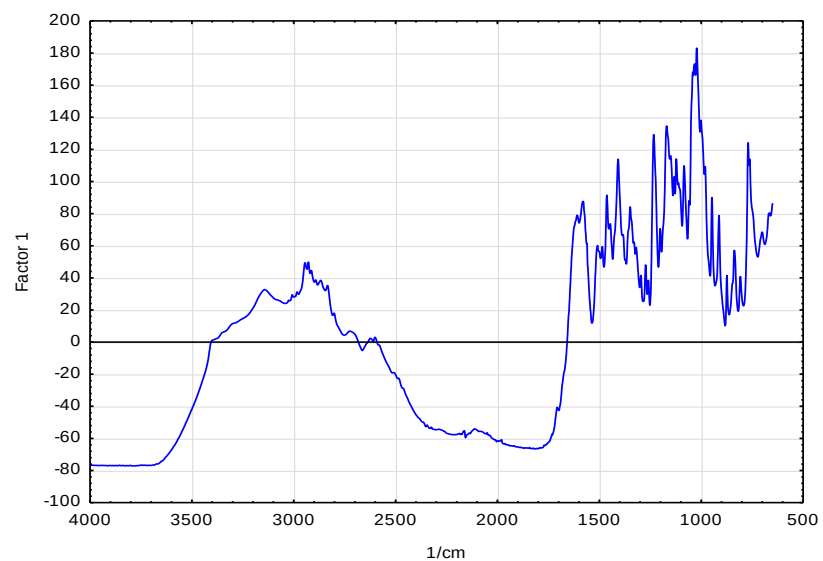
PCA score plotok MSC-t követően Savitzky—Golay derivált FT-NIR spektrumok alapján



PCA score plotok FT-IR alapspektrumok alapján



PCA súlyfüggvények FT-IR alapspektrumok alapján



Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek,
Dr. Gergely Szilveszternek munkám kimagasló szakmai támogatásáért,
valamint konzulenseimnek, Párta Lászlónak és Zalai Dénesnek,
akik lehetővé tették, hogy ez a dolgozat létrejöhessen.
Továbbá köszönettel tartozom Dr. Kemény Sándor professzor úrnak
a statisztikai értékelés során nyújtott hasznos tanácsaiért.