

Opinnäytetyö AMK

Prosessi- ja materiaalitekniikka

2018

Jami Penttilä

SILMIEN JA PILOLINSSIEN HOITONESTETUOTTEIDEN KVALITATIIVINEN TUNNISTUSMENETELMÄ

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Prosessi -ja materiaalitekniikka (insinööri AMK)

2018 | 50 sivua

Jami Penttilä

SILMIEN JA PIILOLINSSIEN HOITONESTETUOTTEIDEN KVALITATIIVINEN TUNNISTUSMENETELMÄ

Toimeksiantajana toimi Oy Finnsusp Ab ja työ toteutettiin Turun ammattikorkeakoulun laboratorion tiloissa. Yritys valmistaa piilolinssisiä, niiden hoitonestetuotteita sekä silmätippoja. Yhtiön markkinoinnin ja myynnin edistämiseksi ja laadun varmistuksen parantamiseksi on syntynyt tarve menetelmälle, joka mittaa tuotteiden koostumusta ja mahdollisesti luo uniikin kromatogrammin tuotteesta.

Tavoitteena oli luoda hyaluronihappoa ja trehaloosia sisältävien silmä ja piilolinssien hoitonestetuotteiden kvalitatiivinen tunnistusmenetelmä. Tarkoituksena oli kehittää helppo, nopea ja tarkka menetelmä. Menetelmässä käytettiin HPLC -kromatografiaa eksklusiokolonilla ja detektorina sekä UV/Vis -detektoria ja taitekerroindetektoria. Lisäksi tarkoituksena oli havainnollistaa mahdollisia tuotteissa tapahtuvia muutoksia, joita tapahtuu pilaantumisen aikana.

Kaikista näytteistä ajettiin kromatogrammit sekä UV/Vis -detektorilla että taitekerroindetektorilla. Trehaloosia ei pystytty tunnistamaan kunnolla UV/Vis -detektorilla. Kaikista näytteistä saatiin tunnistettua hyaluronihappo. Trehaloosia ei saatu erottumaan muista komponenteista. Vanhojen näytteiden kromatogrammien todettiin olevan identtisiä tuoreiden kanssa ja saatiin käsitys, miltä pilaantuneiden näytteiden kromatogrammit voisivat näyttää.

ASIASANAT:

HPLC, silmätipat, hyaluronihappo, taitekerroindetektori, UV/Vis -detektori, eksklusiokromatografia

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Chemical and Materials Engineering

2018 | Total number of pages 50

Jami Penttilä

QUALITATIVE IDENTIFICATION METHOD FOR EYE DROPS AND CONTACT LENS SOLUTIONS

The commissioner of thesis was Oy Finnsusp Ab and the experimental work was performed in the laboratory of Turku University of Applied Sciences. Finnsusp manufactures contact lenses and contact lens solutions and eye drops. To improve the company's marketing and sales and to ensure product quality, the need for chromatograms describing product properties and unique nature was met.

The main purpose of this thesis was to create an HPLC method which qualitatively identifies trehalose and hyaluronic acid from ophthalmic solutions. The desired properties of the new method were accuracy, speed and user friendliness. The method used size exclusion chromatography and as detectors UV/Vis and refractive index detectors were used. A minor goal for the work was to observe changes that might happen when the product ages.

All of the samples were analyzed with both UV/Vis and refractive index detectors. Trehalose was not successfully identified with UV/Vis detector. Hyaluronic acid, on the contrary, was identified from every sample. Trehalose was not separated properly from other components with this method. It was noticed that older samples had identical chromatograms with fresh samples. Also, it was determined what kind of changes there would probably be in chromatograms, if aging was visible.

KEYWORDS:

HPLC, eye drops, hyaluronic acid, refractive index detector, UV/Vis detector, exclusion chromatography

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	7
2 SILMÄTIPAT	8
2.1 Hyaluronihappo	8
2.2 Trehaloosi	9
2.3 Hyaluronihapon hajoaminen	11
3 ANALYYSIMENETELMIÄ	12
3.1 Nestekromatografia	12
3.1.1 HPLC	15
3.2 Muita menetelmiä hyaluronihapon tunnistamiseen	19
4 HPLC HYALURONIHAPON JA TREHALOOSIN ANALYSOINNISSA	21
4.1 Laitteisto	21
4.2 Suoritus	22
5 TULOKSET	25
5.1 Tulokset käyttäen taitekerroindetektoria	29
5.2 Mahdollisesti pilaantuneet näytteet	33
5.3 Pakotettu hajotus-testin tulokset	34
6 POHDINTA	40
7 YHTEENVETO JA KEHITTÄMISEHDOTUKSET	42
8 LÄHDELUETTELO	44

LIITTEET

Liite 1. Kolonnityypin valinta-algoritmi.

Liite 2. Hyaluronihappo -ja trehaloosistandardien UV -absorptiospektrit.

KUVAAJAT

Kuvaaja 1. Trehaloosistandardin kromatogrammi.	25
Kuvaaja 2. Hyaluronihappostandardin (P100) kromatogrammi.	26

Kuvaaja 3. Hyaluronihappostandardin (E2.0) kromatogrammi.	27
Kuvaaja 4. BioDrop MD -näytteen kromatogrammi.	27
Kuvaaja 5. BioDrop MD Plus -näytteen kromatogrammi.	28
Kuvaaja 6. BioTwin -näytteen kromatogrammi.	28
Kuvaaja 7. BioDrop MD Spray -näytteen kromatogrammi.	29
Kuvaaja 8. Hyaluronihappostandardin (P100) kromatogrammi.	30
Kuvaaja 9. Trehaloosistandardin kromatogrammi.	30
Kuvaaja 10. BioDrop MD -näytteen kromatogrammi.	31
Kuvaaja 11. BioTwin -näytteen kromatogrammi.	31
Kuvaaja 12. Biodrop MD Spray -näytteen kromatogrammi.	32
Kuvaaja 13. BioDrop MD Plus -näytteen kromatogrammi.	32
Kuvaaja 14. A116 kromatogrammi.	33
Kuvaaja 15. W256 kromatogrammi.	34
Kuvaaja 16. Hajotetun hyaluronihapon (P100) standardinäytteen kromatogrammi.	35
Kuvaaja 17. Hyaluronihappostandardi punaisella ja hajotettu hyaluronihappostandardi sinisellä.	35
Kuvaaja 18. BioDrop MD -näyte sinisellä ja punaisella hajotettu BioDrop MD -näyte.	36
Kuvaaja 19. BioDrop MD Plus -näyte punaisella ja sinisellä hajotettu BioDrop MD Plus -näyte.	37
Kuvaaja 20. BioTwin -näyte punaisella ja hajotettu BioTwin -näyte sinisellä.	38
Kuvaaja 21. BioDrop MD Spray -näyte kuvattu sinisellä ja hajotettu BioDrop MD Spray -näyte punaisella.	39

KUVAT

Kuva 1. Hyaluronihappostandardin UV -absorbanssi.	1
Kuva 2. Trehaloosistandardin UV -absorbanssi.	2

KUVIOT

Kuvio 1. Nestekromatografian eri lajit jaoteltuna stationäärifaasin olomuodon perusteella.	13
Kuvio 2. Kolonnityypin valintaa helpottava kaavio, kun eroteltavan molekyylin moolimassa on alle 2000 g/mol. (Harris, 2010)	1
Kuvio 3. Kolonnityypin valintaa helpottava kaavio, kun eroteltavan molekyylin moolimassa on yli 2000 g/mol. (Harris, 2010)	2

TAULUKOT

Taulukko 1. UV/Vis -detektorilla saadut avainyhdisteiden retentioajat.	25
Taulukko 2. taitekerroindetektorilla saadut avainyhdisteiden retentioajat.	29

1 JOHDANTO

Kuivat silmät ovat yleinen oireyhtymä ja Suomessa sen oireista kärsii jopa 40 % ihmisistä jossain vaiheessa elämää. Oireita ovat usein ärsytys, kutina, kirvely, polttelu valonarkuus ja väsyneet silmät. Normaalisti silmän pintaan erittyy jatkuvasti hyytelömäistä kyynelnestettä, joka estää silmiä kuivumasta. Kuiville silmille altistaa ilman kuivuus, ilmavirta, koneellinen ilmastointi ja vastaavat silmien kuivuutta edistävät tekijät. Kuivia silmiä voidaan hoitaa silmätipoilla, jotka kosteuttavat silmää ja matkivat silmän itse-erittämää kyynelnestettä. Silmätippoja voidaan käyttää myös taittovirheleikkauksen jälkeen, jonka jälkeen silmät ovat normaalia kuivemmat. (Sandberg-Lall, 2014)

Tutkimus toteutettiin Turun Ammattikorkeakoulun laboratoriossa Oy Finnsusp Ab:n toimeksiannosta. Tutkimuksessa oli tarkoitus kehittää HPLC-menetelmä tiettyjen silmän ja piilolinssien hoitotuotteiden laaduntarkkailua varten ja luoda tuotteille ominaiset kromatogrammit. Pää tavoitteina olivat hyaluronihapon ja trehaloosin tunnistaminen näytteistä helpolla ja tarkalla menetelmällä. Selvitettiin myös, nähdäänkö väärin säilytetyn näytteen kromatogrammista mahdollinen pilaantuminen. Pilaantumista tarkkailtiin tässä hyaluronihapon hajoamisen kannalta. Hyaluronihapon suuren molekyylikoon vuoksi kromatografiseksi metodiksi valikoitui molekyylien koon mukaiseen erotteluun perustuva geelisuodatuskromatografia. Kromatografisella analyysillä saatiin myös tuotteelle ominainen tunnistuskromatogrammi, joka on toimeksiantajalle myynnin edistämisen ja markkinoinnin kannalta tärkeä asia.

2 SILMÄTIPAT

Silmätippojen vaikuttavia ainesosia on monia ja niillä on erilaisia hyötyjä erilaisiin tapauksiin. Kuivien silmien hoitoon tarkoitettujen silmätippojen vaikuttavia ainesosia ovat esimerkiksi hyaluronihappo, trehaloosi, dekspantenoli, karboksimeetyyliselluloosa ja hypromelloosi (hydroksipropyylimetyyliselluloosa). Kaikkien aineiden vaikutusmekanismeja ei tunneta, mutta kliinisissä testeissä niiden on todettu auttavan kuivien silmien oireisiin. Dekspantenoli (D-pantenoli) on vanha keksintö, jota käytetään edelleen laajalti haavoja parantavana ainesosana. Sen hygroskooppiset ominaisuudet tekevät siitä hyvän kosteuttajan ja sen kyky luoda suojakerros ihon pinnalle parantaa ihon lipidien synteesiä. Nämä ominaisuudet tekevät siitä hyvän komponentin silmätippoihin. Karboksimeetyyliselluloosaa ja hypromelloosia käytetään molempia yleisesti silmiä kosteuttavina ja voitelevina ainesosina. Ne estävät kuivumista ja nopeuttavat kuivien silmien paranemista. Näytteinä olevien Piilokset BioDrop -silmänhoitotuotteiden pääkomponenttina on hyaluronihappo. BioDrop Plus-tuotteeseen on lisätty trehaloosia tehostamaan vaikutusta. (Choy, et al., 2006) (Greene, et al., 1992) (Sparshi, et al., 2017) (Zheng, et al., 2014)

2.1 Hyaluronihappo

Hyaluronihappoa löydetään luonnostaan selkärankaisten hermo- ja epiteelisolujen sekä tukikudosten soluväliaineesta. Lisäksi sitä on havaittu olevan keuhkoissa, munuaisissa, aivoissa ja lihaskudoksessa. Kehossa se esiintyy tyypillisesti hyaluronihapon suoloina. Ihmisessä, joka painaa 70 kg, on keskimäärin 15 g hyaluronihappoa ja tästä noin kolmannes hajoaa ja syntyy uudestaan päivittäin. Hyaluronihappopolymeerien koko vaihtelee 200 kDa ja 10 MDa välillä ja se on keskimäärin kooltaan 2-5 MDa. Pituudeltaan yksi disakkaridi (n. 400 Da) on noin 1 nm luokkaa. Disakkaridiketju, joka sisältää 10 000 disakkaridia (n. 4 MDa) on siten noin 10 µm pitkä. (Necas, et al., 2008) (Sigma-Aldrich, 2018) (Stern, 2004) (Sze, et al., 2016)

Hyaluronihappo on glykosaminoglykaani eli pitkäketjuinen suora, haarautumaton polysakkaridi. Glykosaminoglykaanit ovat koostuneet peräkkäisistä disakkaridi -yksiköistä, joiden päärakenteena ovat aminosokeri ja uronihappo. Hyaluronihapossa aminosokerina on N-asetyyli-glukosamiini ja uronihappona on glukuronihappo. Nämä ovat kiinnitty-

neet toisiinsa vaihtelevilla β -1,3- ja β -1,4-glykosididoksilla. Toisin kuin muut glykosaminohapot, hyaluronihappo ei sisällä ollenkaan sulfaatteja. Hyaluronihappo ei myöskään muodosta proteoglykaaneja kiinnittymällä proteiineihin, toisin kuin muut glykosaminohapot. (Sigma-Aldrich, 2018).

Hyaluronihapon liuoksella on todettu olevan erityisiä ominaisuuksia, jotka tekevät siitä hyvän liukasteen ja aiheuttavat sen veden sidontakyvyn. Liuenneena hyaluronihappomolekyylit laajenevat ja ottavat käämimäisen muodon sekä takertuvat toisiinsa jo pienissä pitoisuuksissa. Suuremmissa pitoisuuksissa ne kasvattavat liuoksen viskositeettiä. Jo yhden prosentin seos hyaluronihappoa voi olla viskoosia ja hyytelömäistä, mutta paineen alla se muuttuu helposti juoksevaksi nesteeksi. Tämä ominaisuus tekee siitä hyvän liukasteen. Hyaluronihapon käämimäinen rakenne johtuu vetysidoksista, jotka muodostuvat hydroksyyliyhmiä välille molekyylissä. Nämä sidokset vetävät toisiaan puoleensa aiheuttaen näin jäykähkön käämimäisen rakenteen. Tämä rakenne pystyy sitomaan itseensä noin tuhatkertaisen määrän vettä omaan massaansa nähden. (Necas, et al., 2008)

Hyaluronihapon muita havaittuja hyötyjä ovat haavojen nopeutunut paraneminen, solujen lisääntyminen, iskujen vaimentaja ja silmässä se toimii tukirakenteena. Sitä voidaan käyttää silmätippojen lisäksi esimerkiksi injektoituna polven nivelnesteisiin helpottamaan kipuja. Nivelnesteessä sen tehtävä on toimia liukasteena ja näin vähentää jänteiden rasitusta. Hyaluronihappohoito polveen voi vähentää nivelleikkauksen tarvetta. (Ruckmani, et al., 2013) (Stern, 2004)

Hyaluronihappoa on saatu alun perin eristämällä eläinkudoksista, kuten esimerkiksi kukan heltasta. Koska eläinperäisten ainesosien käyttöä on tautiriskien vähentämiseksi voimakkaasti rajoitettu, valmistetaan erityisesti ihmisille tarkoitetuissa tuotteissa käytettävä hyaluronihappo nykyään fermentoimalla soveltuvia mikrobikantoja. Hyaluronihappoa tuottavia kantoja ovat esimerkiksi *Streptococcus*-suvun kannat. Tuotannosta saatua hyaluronihappoa lajitellaan molekyylimassan perusteella, joka määrää myös tuotteen käyttökohteen. (Sze, et al., 2016)

2.2 Trehaloosi

Trehaloosi on kahden glukoosin muodostama disakkaridi. Trehaloosissa glukoosimolekyylit ovat kiinnittyneet toisiinsa alfa,alfa-1,1 -sidoksin. Maltoosissa ja sellobioosissa on

myös kaksi glukoosimolekyyliä kiinnittyneenä toisiinsa, mutta niiden sidokset ovat erilaisia. Maltoosissa glukoosien välinen sidos on alfa-1,4 -sidos ja sellobioosissa beeta-1,4 -sidos. Trehaloosia löytyy luonnostaan hyönteisistä, sienistä, kasveista ja selkärangattomista eläimistä. Sienet voivat sisältää trehaloosia jopa 25 % kuivapainostaan. Nisäkkäät eivät pysty syntetisoimaan trehaloosia. Ihmiset voivat kuitenkin metaboloida ravinnosta saatavan trehaloosin suolistossa olevan trehalaasi-entsyymin ansiosta. Trehaloosin teollinen valmistaminen tapahtuu tärkkelyksen entsyymaattisella hajottamisella. (Luyckx & Baudouin, 2011) (Higashiyama, 2002) (Stoker, 2015)

Trehaloosi on yksi vakaimmista sokereista. Sillä on laaja vakaa pH-alue ja se kestää hyvin kuumuutta. Se ei hajoa veteen liuotettuna pH-alueella 3,5 – 10 ja 24 tunnin käsittelyajalla 100 °C lämpötilassa, kun vesiliuoksen trehaloosipitoisuus on 4 %. Trehaloosin makeus vastaa 45 prosenttia sakkaroosin makeudesta. Erityiset fysikaaliset ominaisuudet ja vakaus tekevät trehaloosista teollisiin sovelluksiin mielenkiintoisen aineen. (Higashiyama, 2002).

Trehaloosilla on todettu olevan suojeleva vaikutus proteiineihin ja solukalvoihin, joihin kohdistuu rasitusta kuivuudesta, kuumuudesta ja oksidatiivisesta stressistä. Trehaloosin on todettu olevan kaikista tehokkain sokeri estämään kuivumista. Tarkkaa syytä siihen, miksi trehaloosi kosteuttaa ja suojaa kuivuudelta, ei vielä tiedetä tarkkaan. Trehaloosin ominaisuuksia on tutkittu solujen ja kudosten syväjää-säilytyksen lisäaineena. Tutkimus osoitti, että sen käyttö paransi huomattavasti maksa- ja munasolujen palautumista jäädytyksen jälkeen. (Luyckx & Baudouin, 2011).

Tutkimuksissa on todettu, että trehaloosilla on kuivuutta ja vaurioita ehkäisevä vaikutus sarveiskalvosoluihin. Tutkimuksessa todettiin, että trehaloosilla käsitellyt solut kuolivat kuivuuteen huomattavasti harvemmin kuin kontrollisolut, jota ei oltu käsitelty trehaloosilla. Hiirillä tehdyt testit osoittivat, että trehaloosilla käsiteltyjen silmien sarveiskalvon solut olivat paremmassa kunnossa ja niiden pinnalla havaittiin vähemmän apoptoosia (ohjelmoitua solukuolemaa) kuin vertailusilmissä. Kaneilla tehdyillä testeillä todettiin trehaloosin suojaavan silmiä hyvin UV-B-säteilyn haittavaikutuksilta. (Luyckx & Baudouin, 2011)

Trehaloosin on todettu olevan mahdollisesti jopa tehokkaampi kuin hyaluronihappo tai hydroksietyyliseluloosa kuivien silmien hoidossa. Tutkimuksessa, jossa seurattiin 26 potilasta LASIK (laser-assisted in situ keratomileusis) leikkauksen jälkeen, puolta poti-

lasryhmästä hoidettiin trehaloosilla ja toista puolta perinteisellä hyaluronihapolla. Trehaloosilla hoidetuilla potilailla silmän solujen ja kyynelten palautuminen oli tehokkaampaa. Tämä tarkoittaisi trehaloosin olevan tehokkaampi hoitomenetelmä leikkauksen jälkeen, mutta lisätutkimuksia tarvitaan. (Orobia, et al., 2017) (Luyckx & Baudouin, 2011)

2.3 Hyaluronihapon hajoaminen

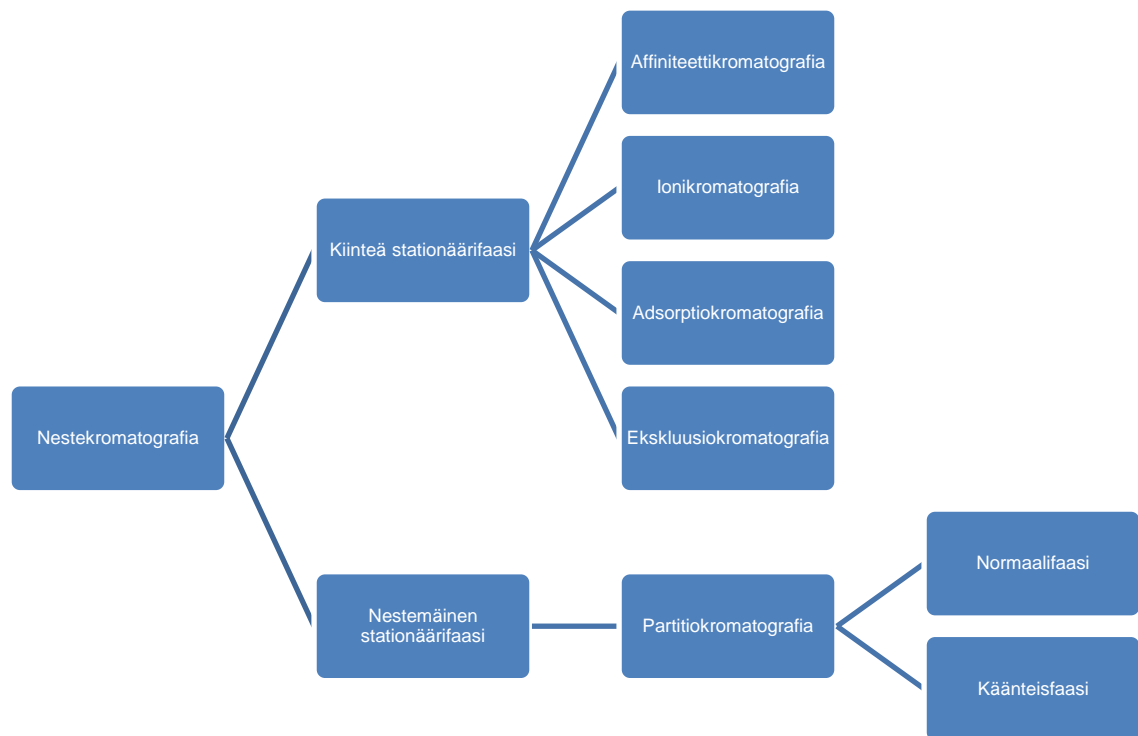
Hyaluronihapon hydrolyyttisen hajoamisen on huomattu noudattavan ensimmäisen asteen kinetiikkaa, eli sillä on vakio puoliintumisaika. Lisäksi on todettu, että hyaluronihappoketju ei katkea tietystä kohtaa, vaan katkeaminen on satunnaista. Happo- ja emäskatalysoiduissa reaktioissa katkeavat glukuronihappo- ja N-asetyyli-glukosamiini-ryhmät. Hydrolyyttisen hajoamisen tapahtuessa vaikuttaa hajoamistuotteeseen ympäröivä pH-arvo. Hyaluronihappo voi hajota kehossa myös entsymaattisesti. Tällöin hyaluronidaasi-niminen entsyymi toimii hyaluronihapon pilkkojana. (Tokita & Okamoto, 1995) (Patterson, et al., 2010)

3 ANALYYSIMENETELMIÄ

3.1 Nestekromatografia

Kromatografialla tarkoitetaan menetelmiä, joissa aineet erotetaan toisistaan vuorovai-
kutusten perusteella. Komponenttien erottuminen toisistaan tapahtuu kromatografiako-
lonnissa tai -levyllä. Niissä jakautuminen tapahtuu vuorovaikutuksessa stationäärifaas-
sin ja liikkuvan faasin välillä. Liikkuvassa faasissa olevat analysoitavan näytteen yhdis-
teet sitoutuvat stationäärifaasiin eri voimakkuuksilla ja näin etenevät eri nopeuksilla, jol-
loin erottuminen tapahtuu. Stationäärifaasi on useimmiten viskoosia nestettä, joka on
sidottu kromatografiakolonnin sisäpintaan kiinni kemiallisesti, tai kiinteä aine. Liikkuva
faasi on nestekromatografiassa aina neste. (Jaarinen & Niiranen, 1995)

Kromatografian muotoja on todella monia ja yleisesti ne voidaan jakaa kahteen liikku-
van faasin olomuodon mukaan: nestekromatografiaan ja kaasukromatografiaan. Neste-
kromatografiset menetelmät voidaan jakaa vielä useampaan erilaiseen lajiin erotuksesta
vastaavan periaatteen mukaan: partitio-, adsorptio-, ioni-, eksklusio- ja affiniteettikro-
matografia. Kuviossa 1. esitettynä kromatografian eri lajit stationäärifaasin olomuodon
mukaan. (Harris, 2010) (Jaarinen & Niiranen, 1995)



Kuvio 1. Nestekromatografian eri lajit jaoteltuna stationäärifaasin olomuodon perusteella.

Partitiokromatografiassa on nestemäinen stationäärifaasi, joka on kemiallisesti sidottu kiinteään aineeseen. Partitiokromatografian erottelukyky perustuu stationäärifaasin ja liikkuvan faasin liukoisuuseroihin ja poolisuuseroihin. Poolinen stationäärifaasi hidastaa poolisia yhdisteitä ja jos stationäärifaasi on pooliton, se hidastaa poolittomia yhdisteitä. Partitiokromatografia on yleisin erotusmenetelmä HPLC:tä käyttäessä. (Kenkel, 2003)

Adsorptiokromatografiassa on kiinteä, hyvin polaarinen stationäärifaasi, joka on yleensä valmistettu alumiinioksidista tai silikasta. Adsorptiokromatografiassa liikkuvassa faasissa olevat yhdisteet adsorptoituvat stationäärifaasin pintaan ja mitä vahvemmin ne adsorptoituvat, sitä hitaammin ne retentoituvat. Retentoitumisella tarkoitetaan kolonnin aikaansaamaa hidastumista. Mitä voimakkaammin kolonni pidättää komponenttia kolonnin sisällä, sitä hitaammin kyseinen komponentti retentoituu. Retentioajalla tarkoitetaan aikaa, joka kuluu näytteen komponentin kulkiessa injektorilta detektorille. (Harris, 2010) (Kenkel, 2003)

Ionikromatografiassa ionimuotoiset molekyylit muodostavat kovalenttisiä sidoksia stationäärifaasin kanssa. Voimakkaammin sitoutuneet liikkuvat hitaammin kuin huonosti si-

toutuvat. Ionikromatografiasta voidaan myös puhua silloin, kun ioninvaihtohartsin sidotaan tietty molekyyli liuksesta. Tällöin pystytään poistamaan liuksesta ei-toivottu ainesosa. Ei-toivottu ainesosa sitoutuu ioninvaihtohartsin, eikä irtoa ilman hartsin regeneroimista esimerkiksi hapolla. Ionikromatografiaa voidaan usein käyttää proteiinien puhdistukseen tai näytteiden analysoimiseen, kun halutaan erotella varautuneita molekyylejä tai ioneja toisistaan. (Harris, 2010) (Jaarinen & Niiranen, 1995) (Mendham, et al., 2000)

Affiniteettikromatografia on kaikista selektiivisin kromatografian lajeista. Siinä stationäärifaasi on pinnoitettu tietyillä aineilla, jotka vaikuttavat vain muutamiin tai yhteen tiettyyn aineeseen. Sitä käytetään esimerkiksi proteiinien puhdistuksessa, jossa stationäärifaasi on voitu pinnoittaa kyseisen proteiinin vasta-aineella. Kun liikkuva faasi on kuljetanut kaikki muut näytteessä olleet molekyylit pois erotuspylvästä, muutetaan liikkuvan faasin ionista vahvuutta lisäämällä eluentin suolapitoisuutta. Tällöin stationäärifaasin sitomiskyky muuttuu ja kyseinen proteiini saadaan eluoitua. Tässä menetelmässä voidaan käyttää myös muuttuvaa gradienttia, jos stationäärifaasin on sitoutunut useita eri molekyylejä. Tällöin eri molekyylit voidaan erottaa toisistaan muuttuvalla gradientin pitoisuudella, jolloin molekyylit irtoavat suolapitoisuuden mukaan. (Harris, 2010) (Mendham, et al., 2000)

Eksklusiokromatografiassa (SEC, Size exclusion chromatography) eli geelisuodatuskromatografiassa stationäärifaasin rakenne on huokoinen ja geelimäinen. Muista kromatografisista menetelmistä poiketen, eksklusiokromatografian erottelukyky ei perustu kemiallisiin vuorovaikutuksiin, vaan molekyylien kokoon. Liikkuvassa faasissa olevat pienet molekyylit tunkeutuvat stationäärifaasin huokosiin, jotka hidastavat niiden retentoitumista. Suuret molekyylit eivät mahdu tunkeutumaan stationäärifaasin huokosiin ollenkaan tai hyvin vähän ja retentoituvat paljon nopeammin. (Harris, 2010)

Yleisimpiä kromatografisia laitteita ovat HPLC (high performance liquid chromatography), eli korkean erotuskyvyn nestekromatografia ja GC (gas chromatography), eli kaasukromatografia.

3.1.1 HPLC

HPLC-laitteisto hyödyntää korkeaa painetta ja pakottaa liikkuvan faasin kulkemaan kolonnin lävitse. Kolonni sisältää stationäärifaasin, joka hidastaa tiettyjen molekyylien liikettä liikkuvassa faasissa. Korkea paine ja kolonnin erottelu ominaisuudet aiheuttavat korkean erotuskyvyn. Kolonnin lisäksi laitteistoon kuuluu detektori, pumppu, injektor, näitä yhdistävät kapillaarit ja tietokone, jolla ohjataan laitteistoa ja otetaan tulokset talteen. Lisäksi laitteistoon saattaa kuulua kolonniuuni, jonka avulla on mahdollista säätää liuoksen lämpötila tasaiseksi. Kolonnin lisäksi voidaan käyttää esikolonnia, joka suojaa itse analyttistä kolonnia liukenemattomilta yhdisteiltä ja epäpuhtauksia, jotka muuten lyhentäisivät kolonnin käyttöikä. Esikolonnin täytemateriaali on sama kuin analyttisellä kolonnilla. (Harris, 2010) (Jaarinen & Niiranen, 1995)

HPLC-laitteiston ainoat rajoittavat tekijät ovat näytteen saaminen liukoiseen muotoon ilman, että ne reagoivat keskenään, ja herkän yleisdetektorin puute. Näytteenkin saa tarvittaessa kerättyä talteen vahingoittumattomana, mikä on etu esimerkiksi kaasukromatografiaan verrattuna. Näistä syistä johtuen suurikokoisten orgaanisten molekyylien analysoinnissa HPLC-laitteistoa pidetään usein korvaamattomana. Kaasukromatografia on kuitenkin HPLC-laitteistoon nähden kuitenkin useasti edullisempi ja tuottaa vähemmän jätteitä. (Harris, 2010) (Jaarinen & Niiranen, 1995)

Kolonni

HPLC-kolonneja ovat tyypillisesti normaalifaasikolonnit, käänteisfaasikolonnit, ioninvaihtokolonnit, SEC-kolonnit ja affiniteetikromatografiaa varten valmistetut kolonnit. Affiniteetikromatografian kolonneja ja ioninvaihtokolonneja on olemassa valmiiksi pakattuja malleja tai pelkkää hartsia, jota itse pakataan pylvääseen. Erilaisten kolonnien sisällä oleva pinta, stationäärifaasi, vaihtelee käyttötarkoituksen mukaan, mutta yleisin tukimateriaali on silika. Silikaan on usein kemiallisesti sidottu muita molekyyliyhmiä erotuskyvyn ja kolonnin kestävyuden parantamiseksi. (Harris, 2010)

Normaalifaasikolonneilla on vahvasti poolinen materiaali kolonnin sisällä, mistä johtuen käytettävän eluentin pitää olla poolitonta. Tyypillisiä normaalifaasikolonneja ovat amino, syano ja dioli. Normaalifaasikolonneja käytetään esimerkiksi silloin kuin halutaan erottaa poolisia aineita toisistaan. (Braithwaite & Smith, 1996) (Harris, 2010)

Käänteisfaasikolonneista puhutaan silloin, kun kolonnin stationäärifaasi on pooliton ja käytettävä eluentti tästä syystä poolinen. Käänteisfaasikolonnin stationäärifaasi on tyyppillisesti C18, C8 tai C4. Nimitys tulee hiiliketjun pituudesta, jolla saavutetaan pooliton ominaisuus. Käänteisfaasikolonneilla pystytään erottamaan poolittomia aineita toisistaan. (Braithwaite & Smith, 1996) (Harris, 2010)

SEC-kolonnin stationäärifaasi on valmistettu polymeerihartsista. Polymeerihartsissa on erikokoisia huokosia, joihin pienemmät molekyylit pidättyvät. Tämä aiheuttaa isompien molekyylien nopeamman etenemisen. SEC-kolonnit jaetaan kahteen ryhmään käytettävän liikkuvan faasin mukaan. Geelipermeaatiokolonne (GPC, gel permeation chromatography) käyttää eluenttina poolittomia orgaanisia liuottimia ja sillä voidaan erotella esimerkiksi orgaanisia polymeerejä, kuten lipidejä, toisistaan. Geelipermeaatiokolonnien stationäärifaasit ovat jäykkiä geelejä kuten silikageeli. Geelisuodatuskolonnit (GFC, gel filtration chromatography) käyttää taas vesipohjaisia eluenteja ja niiden stationäärifaasit ovat pehmeitä geelejä. Sillä voidaan erotella esimerkiksi luonnon polymeerejä kuten proteiineja ja nukleiinihappoja. SEC-kolonnit eivät kestä kuitenkaan samanlaisia painemääriä kuin muut HPLC-kolonnit geelimäisen stationäärifaasin vuoksi. Käyttäessä SEC-kolonneja pitää olla tietoinen halutusta huokoiskoosta, jonka yksikkö on Å (Ångström). Yksi Å vastaa $1,0 \cdot 10^{-10}$ metriä. (Kenkel, 2003) (Mendham, et al., 2000)

Ionikromatografiassa kolonnin stationäärifaasi sisältää ioninvaihtohartsia, joka soveltuu joko kationinvaihtoon tai anioninvaihtoon. Ioninvaihtohartsit sisältää kiinnittymiskohtia, joihin negatiivisesti tai positiivisesti varautuneet ionit kiinnittyvät ja näin kolonne hidastaa joko anionien tai kationien liikettä liikkuvassa faasissa. Eluenttina käytetään aina pH-puskuria, joka on tehty veteen. (Kenkel, 2003)

Kolonnin ominaisuuksiin vaikuttaa stationäärifaasin lisäksi kolonnin mittasuhteet. Kolonnin pituus vaikuttaa erottelun nopeuteen ja erottelutehokkuuteen. Pidempi kolonne antaa todennäköisesti paremman resoluution, mutta erottelu kestää kauemmin. Lyhyet kolonnit soveltuvat nopeisiin analyysiin. Pitkillä kolonneilla voidaan saada myös nopeampia analyysitinkimättä resoluutiosta, mikäli ne on pakattu pienemmällä (esim. 3 µm) partikkelikoolla normaalin (5 µm) sijaan. Pienemmällä partikkelikoolla pakatut kolonnit ovat kuitenkin kalliimpia. Toinen huomioitava tekijä on kolonnin halkaisija. Pienemmällä halkaisijalla varustetun kolonnin lävitse virtaa vähemmän liuotinta ja näin pitoisuusmittauksiin perustuvat detektorit saavat isomman vasteen näytteestä. Tämä mahdollistaa detektorirajan laskemisen ja herkkyuden paranemisen. (Mendham, et al., 2000)

Kolonnin valinnassa pitää ottaa huomioon monta yksityiskohtaa: erotettavien aineiden molekyyli-massat, liukoisuus veteen tai orgaaniseen liuottimeen, poolisuus ja ionisuus. Liitteessä 1 nähdään yksi esimerkki valinta-algoritmista, jonka avulla pystytään päättämään näytteelle soveltuva kolonnityyppi. (Harris, 2010)

Eluentti

HPLC:ssä käytetään liikkuvana faasina nestettä, jota kutsutaan eluentiksi. Eluentin valintaan vaikuttavat käytettävän kolonnin stationäärifaasi, poolisuus ja näyte, jonka pitää liueta eluenttiin. Muita vaikuttavia tekijöitä ovat liuottimen kiehumispiste, viskositeetti, yhteensopivuus detektorin kanssa, syttymisherkkyys ja myrkyllisyys. Eluentin pohjana käytetään liuotinta, johon näyte liukenee ja joissain tapauksissa liuottimeen lisätään toista ainetta, jotta saadaan tiettyjä ominaisuuksia korostettua. Esimerkiksi veteen voidaan lisätä suolaa sen poolisuuden ja ionivahvuuden muuttamiseksi. (Mendham, et al., 2000)

Eluentin tehtävä on saada näyte liukenemaan siihen, kuitenkin hajottamatta näytemolekyyliä. Eluentti ei myöskään saa häiritä detektointia, mikä pitää huomioida eluenttia valittaessa. Eluentin poolisuus vaikuttaa liikkuvan faasin eluoivaan voimaan ja näytteiden retentioaikoihin. Käänteisfaasikromatografiassa kaikista poolisimmat yhdisteet eluoituvat ensimmäisenä, kun taas normaalifaasikromatografiassa tilanne on päinvastainen. Käänteisfaasikromatografiassa eluentin poolisuutta kasvattamalla voidaan hidastaa poolittomampien retentoitumista, jolloin voidaan saada aikaan parempi resoluutio. Eluentissa voidaan myös käyttää muuttuvaa poolisuutta, joka tarkoittaa käytännössä suolaliuoksen pitoisuuden lisäämistä kesken ajon. Tällöin puhutaan gradienttiajosta. Gradienttiajota käytetään silloin, kun ajo kestäisi muuten liian kauan ja viimeiseksi retentoituvat aineet halutaan eluoida kohtalaisessa ajassa. Toinen tapaus, jossa gradienttiajota käytetään, on tilanne, jossa näytemolekyylit on sidottu alhaisemalla suolapitoisuudella stationäärifaasiin ja ne irrotetaan myöhemmin korkeammalla suolapitoisuudella stationäärifaasista. Tämä on yleinen tapa esimerkiksi proteiinien puhdistuksessa käyttäessä affiniteetikromatografiaa. (Jaarinen & Niiranen, 1995) (Mendham, et al., 2000) (Kenkel, 2003)

Eluentin pH-arvolla on myös vaikutusta näytteiden retentoitumiseen ja sitä säätämällä voidaan esimerkiksi hienosäätää saatavien piikkien muotoa ja retentioaikoja. Varsinkin käänteisfaasikromatografiassa näytteisiin, jotka ionisoituvat, on mahdollista vaikuttaa eluentin pH-arvon säädöllä merkittävästi. Eluentin pH-arvon tulisi olla suurempi kuin ionisoituvan komponentin pK_a -arvo. Kun tiedetään eluentin haluttu pH-arvo, katsotaan

pK_a -arvotaulukosta, mikä olisi sopiva komponentti eluenttiin. Ionisoitumattomilla näytteillä ei eluentin pH-arvon säätelyllä ole havaittu suurta vaikutusta. (Braithwaite & Smith, 1996) (Verma, 2018)

Eluenttia valmistaessa on hyvä muistaa suodattaa eluentti ja poistaa siitä ilma. Partikkelit voivat helposti tukkia kolonnin, jos eluenttia ei ole suodatettu ja ilma voi pahimassa tapauksessa pilata kolonnin. On myös olemassa kaupallisia tuotteita, jotka ovat suoraan valmiita käyttää ja näitä kutsutaan HPLC-laatusiksi tuotteiksi. Eluentille ei ole yhtä oikeaa valintaa olemassa ja sitä valittaessa kannattaa keskustella kolonnin valmistajan kanssa eluentin sopivuudesta kolonnille. Hyvänä nyrkkisääntönä toimii myös ”samanlainen liuottaa samanlaista”, joka pätee myös tässä asiassa. (Mendham, et al., 2000)

HLPC-detektoreja

Erilaisia HPLC-detektoreita on monia ja jokaisella on omat hyvät ja huonot puolensa. Oikean detektorin valinnassa on aina otettava huomioon käyttötarkoitus. UV/Vis- ja fluoresenssidetektorit perustuvat spektrometriaan, joka asettaa niille tiettyjä rajoitteita. UV/Vis-detektori mittaa UV-valon absorbanssia määrättyllä aallonpituudella eluentista ja fluoresenssidetektori mittaa taas eluentin fluoresoivaa ominaisuutta. Taitekerroin eli RI-detektorin toiminta perustuu eluentin taitekertoimen jatkuvaan mittaamiseen. Sähkökemiallinen detektori mittaa eluentista jännitettä, joka johdetaan eluenttiin. ELS-detektori (evaporative light-scattering detector) sopii yhdisteille, jotka haihtuvat huomattavasti huonommin kuin eluentti ja se mittaa valon hajoamista. CA-detektori (charged aerosol detector) on lähes universaali detektori, joka soveltuu esimerkiksi lipideille ja hiilihydraateille. Detektorina voidaan käyttää myös massaspektrometriä. (Harris, 2010) (Jaarinen & Niiranen, 1995).

UV/Vis-detektori on yleisin detektori, jota käytetään HPLC-laitteistossa. Suuri osa molekyyleistä absorboi valoa ja se on ainoa rajoittava tekijä tällä detektorilla. Sen muunneltava aallonpituuden mittausalue tekee siitä selektiivisen halutulle aallonpituudelle.

UV/Vis-detektoreja on olemassa kolmea erilaista: kiinteällä aallonpituudella mittaavaa, vaihdettavalla aallonpituudella mittaavaa ja diodirivillä varustettua. Diodirividetektorilla pystytään mittaamaan koko aallonpituusalueita samanaikaisesti, eikä vain yhtä tiettyä aallonpituutta. Tämä voi olla hyödyllinen ominaisuus esimerkiksi T&K-toiminnassa, jossa ei aina tiedetä etukäteen, mikä olisi paras aallonpituus mittausta varten. UV/Vis-detektori on myös herkkä detektori ja sillä on laaja lineaarinen alue, joka kattaa 10^6 -kertaisen pitoisuusalueen. Tämä tarkoittaa, että sillä pystytään suotuisissa olosuhteissa

määrittämään jopa nanogrammatason ainemääriä. Tämä detektori sopii myös hyvin gradienttijaon. (Harris, 2010)

Taitekerroindetektorin (refractive index, RI) on yleisdetektorin nestekromatografille, mutta sen herkkyys on kuitenkin huomattavasti heikompi kuin spektrometriaan perustuvien detektorien. Se mittaa jatkuvasti taitekerrointa eluentista, mikä tekee siitä erittäin herkin lämpötilan vaihtelulle. Tämän detektorin kanssa on suositeltavaa käyttää koloniuunia ja taitekerroindetektorin oman optiikan lämmitystä lämpötilavaihtelun estämiseksi. Jo pienetkin, noin 0,01 °C, lämpötilavaihtelut aiheuttavat poikkeaman pohjavivassa. Taitekerroindetektorilla ajaessa ei myöskään pysty käyttämään gradienttia, sillä detektori tunnistaisi uuden komponentin eluentissa ja antaisi näin signaalia. Voidaankin todeta, että tämän detektorin ainut hyvä puoli muihin detektoreihin verrattuna on sen ominaisuus määrittää käytännössä mitä vain eluentista, oli sillä valon absorbanssia tai ei. (Harris, 2010) (Jaarinen & Niiranen, 1995)

3.2 Muita menetelmiä hyaluronihapon tunnistamiseen

Hyaluronihappoa on mahdollista määrittää myös muilla menetelmillä kuin kromatografisesti. Näitä ovat muun muassa NIRS (near infrared spectroscopy), ELISA (enzyme-linked sorbent assay) ja selluloosa-asetaattielektroforeesi.

NIRS on tekniikka, jossa mitataan aallonpituudella 780 – 2500 nm syntyvää elektromagneettista säteilyä. Säteily aiheutuu valosta, joka virittää tietyllä taajuudella näytteessä olevien molekyylien atomien väliset sidokset värähtelemään. Näytteeseen johdetaan valoa monokromaattorin läpi, ja siitä mitataan joko transmitranssi tai heijastus. Sillä pystytään mittaamaan kvantitatiivisesti ja kvalitatiivisesti. NIRS on tarkka ja nopea mittalaite, jota käytetään nykyisin yleisesti teollisuudessa reaaliaikaisessa mittauksessa. (Dong, et al., 2014) (Reich, 2005)

ELISA-testit hyödyntävät spesifejä vasta-aineita, jotka kiinnittyvät hyaluronihappomolekyyleihin. Vasta-aineet ovat pinnoitettu valmiiksi kuoppalevyn pohjaan, joka tulee testin mukana. Näytettä pipetoidaan kuoppiin, jossa hyaluronihappomolekyylit kiinnittyvät kuopan pohjassa oleviin vasta-aineisiin. Tämän jälkeen sitoutumattomat pestään pois ja lisätään fluoresoiva leima. Leima on kiinnitetty vasta-aineisiin, jotka kiinnittyvät kuoppaan sitoutuneisiin hyaluronihappomolekyyleihin. Näin saadaan aikaan niin sanottu

sandwich -rakenne. Testit voivat sisältää lisävaiheita kuten inkubointeja. Lopuksi mitataan fluoresenssi tai absorbanssi kuopista, jossa näytettä on ja tuloksesta saadaan laskettua pitoisuus standardinäytteiden avulla. Testi voi olla myös kompetentti, jolloin leimatut ja leimaamattomat näytemolekyylit kilpailevat vasta-aine paikoista. Tällöin pitoisuuden määrä on kääntäen verrannollinen kuopan fluoresenssiin tai absorbanssiin. (Lindqvist, et al., 1992) (Yuan, et al., 2015)

Selluloosa-asetaatielektroforeesissa näyte esikäsitellään siten, että se on täysin liukoisessa muodossa puskuriliuoksessa, jonka jälkeen se värjätään ja siirretään selluloosa-asetaatiliuskalle. Esikäsitely voi sisältää digestointeja, mikäli näyte ei ole valmiiksi nestemäisessä muodossa. Liuska upotetaan ajopuskuriin ja elektroforeesijolla saadaan hyaluronihappo erottumaan. Elektroforeesijossa luodaan sähkökenttä näyteliuskan ympärille, missä näytemolekyylit lähtevät liikkumaan vastakkaista varausta omaavaa elektrodia kohden. Molekyylin liikkumisnopeus riippuu näytteen koosta, varauksesta ja massasta. Tunnistaminen tapahtuu vertaamalla näytemolekyylin kulkemaa matkaa hyaluronihappostandardin kulkemaan matkaan. Pitoisuuden määrittäminen saadaan leikkaamalla kulkenut hyaluronihappo pois selluloosa-asetatti liuskalta, josta liuotetaan väriaine pois, mistä mitataan UV-absorbanssi. (Nakano, et al., 1994) (Powar & Chatwal, 2007)

4 HPLC HYALURONIHAPON JA TREHALOOSIN ANALYSOINNISSA

HPLC-laitteistoa päädyttiin käyttämään tässä työssä, koska näytettä ei tarvinnut esikäsittellä muuten kuin suodattamalla ja HPLC-laitteistoa käytettiin myös esimerkki Ruckmanin artikkelista, josta saatiin pohjatiedot kokeen toteuttamiselle. Etuna myös kaasukromatografiin oli näytteen olomuoto. Kaasukromatografiaa käyttäessä olisi näyte pitänyt saada kaasumaiseksi ja näytteessä olevat yhdisteet eivät välttämättä muutu kaasumaiseksi hajoamatta. Vain 20 % tunnetuista yhdisteistä on mahdollista analysoida kaasukromatografilla. (Braithwaite & Smith, 1996). (Ruckmani, et al., 2013)

4.1 Laitteisto

Työ suoritettiin Turun ammattikorkeakoulun laboratoriossa siellä olevalla HPLC-laitteistolla, jonka kokoonpano oli:

- Agilent 1200 series vacuum degasser, G1322A
- Agilent 1200 series binary pump, G1312A
- Agilent 1100 series autosampler, G1313A
- Agilent 1200 series thermostated column compartment, G1316A
- Agilent 1100 series variable wavelenght detector, G1314A
- Agilent 1200 series refractive index detector, G1362A

HPLC-laitteisto muodostuu moduuleista siten, että kokoonpanoa on mahdollista muokata. Molempia detektoreja oli mahdollista käyttää samanaikaisesti tai erikseen. Opinnäytetyötä suunnitellessa oli tarkoitus käyttää diodirividetektoria, mutta sellaista ei ollut saatavilla, joten päädyttiin käyttämään tavallista UV/Vis-detektoria, jossa oli muunneltava aallonpituus. Koska laitteessa oli myös taitekerroindetektor, päätettiin myöhemmin myös kokeilla sitä. Standardinäytteistä ajettiin ensin spektrit spektrofotometrillä sopivan detektioaallonpituuden selvittämiseksi. Spektrofotometrinä käytettiin Shimadzun UV-1800 spektrofotometriä, jossa on läpivirtauskyvetti.

Käytettävä kolonni oli Phenomenex BioSep SEC S-2000, 300 x 7,80 mm ja sitä vastaava esikolonni, Phenomenex safetyguard cartridge 4 x 3,0 mm. Kolonnin toiminta perustuu geelisuodatukseen, joka hyödyntää eksklusiokromatografiaa ja erottelee komponentit toisistaan molekyylikoon perusteella. Kolonni valittiin osittain siksi, että sitä oli

käytetty aiemmin K. Ruckmanin tutkimuksessa. K. Ruckmanin tutkimuksen lisäksi syynä oli hyaluronihappomolekyylin koko, joka saattaisi tukkia muunlaiset kolonnit. Kolonnin valintakuvaajaa liitteessä 1 katsoessa, voidaan hyaluronihapon ominaisuuksien perusteella valita oikea kolonni. Hyaluronihapon molekyylimassa on yli 2000 g/mol, veteen liukeneva ja ionisoitumaton. Täten voidaan todeta SEC-kolonnin olevan soveltuva tälle molekyylille, jonka koko on yli 30 nm.

4.2 Suoritus

Käytetty eluentti

Eluenttina käytettiin 50 mmol/l natriumfosfaattiliuosta, pH = 7,0. Tämä valmistettiin kantaliuksesta, jonka fosfaattipitoisuus oli 0,25 mol/l. Kantaliuos valmistettiin 0,25 mol/l Na_2HPO_4 -liuksesta ja 0,25 mol/l NaH_2PO_4 -liuksesta. Näitä kahta liuosta sekoitettiin siten, että pH-arvoksi saatiin 7,0. Eluenttia valmistaessa fosfaattipuskuri laimennettiin käyttöpitoisuuteen, imusuodatettiin 0,45 μm :n suodattimella ja ultraäänikäsiteltiin ennen käyttämistä. Eluentti valittiin K. Ruckmanin artikkelissa mainittujen tietojen pohjalta ja työssä käytettiin samaa eluenttia koko ajan.

Käytetyt standardit

Silmänhoitotuotteiden BioDrop MD ja BioDrop MD Plus hyaluronihappopitoisuus on 0,2 %:n luokkaa, joten standardeista päätettiin tehdä saman vahvuisia. Tärkeää ei ollut näytteiden sisältämän hyaluronihapon tarkka pitoisuus, vaan retentioaika, joka saatiin standardia ajamalla. Hyaluronihappostandardi valmistettiin liuottamalla 0,02 g hyaluronihapon natriumsuolaa 10 ml mittapullossa olevaan fosfaattipuskuriin, joka oli samaa puskuria, mitä käytettiin eluenttina. Osa puskurista jouduttiin lisäämään mittapullon pohjalle jo ennen hyaluronihapon punnitsemista, sillä se ei liennut kunnolla puskuriin, vaan muodosti geelimäisen kerroksen joutuessaan puskuriin, jota ei edes ultraäänikäsitteily liuottanut. Kun hyaluronihappo oli punnittu ja laimennettu 10 ml mittapulloon, sille tehtiin 20 minuutin ultraäänikäsitteily, jotta hyaluronihappo saatiin liukenemaan kokonaan fosfaattipuskuriin. Hyaluronihapon natriumsuolaa oli kahta erilaista laatua, P100 ja E2.0. P100-laadun ilmoitettu moolimassa oli noin $0,8 \cdot 10^6$ g/mol ja kosteus 9,4 %. E2.0-laadun ilmoitettu moolimassa oli noin $1,22 \cdot 10^6$ g/mol ja kosteus 6,7 %. Näitä molempia käytetään eri tuotteiden valmistuksessa. Standardeja valmistettaessa käytettiin pääasiassa P100-hyaluronihapon natriumsuolaa.

Trehaloosin pitoisuus silmänhoitotuotteessa BioDrop MD Plus on 2 %, joten trehaloosistandardista tehtiin saman vahvuinen. Trehaloosia punnittiin 0,2 g 10 ml mittapulloon ja liuotettiin fosfaattipuskuriin. Trehaloosi liukeni huomattavasti paremmin kuin hyaluronihappo. Standardit, kuten myös näytteet, suodatettiin 0,45 µm:n ruiskusuodattimella aina ennen näytepulloon siirtämistä ja laitteeseen injektioimista. Suodattimina käytettiin Sartoriuksen Minisart High Flow, hydrophilic, PES-suodattimia.

Aallonpituus UV/Vis detektorilla

Analyysin mitattavaksi aallonpituudeksi valikoitui 195 nm standardien absorptiospektrien perusteella. 195 nm ei ollut kaikista optimaalisin valinta trehaloosille eikä hyaluronihapolle, mutta molemmilla oli hyvä absorbanssi kyseisellä aallonpituudella. Hyaluronihapon ja trehaloosin spektrit näkyvillä liitteessä 2. Tarkoituksena oli saada yhdellä ajolla molempien tutkittavien aineiden piikit näkyviin.

Injektioilavuus

Injektioilavuutena käytettiin K. Ruckmanin artikkelissa käyttämää 10 µl. Ensimmäisten testiajojen perusteella taitekerroindetektorin aiheutti suuren määrän taustakohinaa.

Tästä syystä näytteen antamaa signaalia haluttiin nostaa ja joissakin taitekerroindetektorin ajoissa päädyttiin käyttämään isompaa 20 µl:n injektointia.

Lämpötilat

UV/Vis-detektoria käyttäessä ajot tapahtuivat huoneenlämmössä. Taitekerroindetektoria käyttäessä oli Agilentin ohjekirjan mukaan suositeltavaa, että taitekerroindetektorin optiikan lämpötila on 5-10 °C korkeampi kuin eluentin lämpö. Tästä syystä siirryttiin käyttämään kolonniuunia, joka asetettiin 25 °C:n lämpötilaan. Pohjaviiva saatiin tasaantumaan, kun taitekerroindetektorin optiikan lämpö oli 32 °C. Tasapainotuksessa kesti joka kerta yli tunti, sillä taitekerroindetektorin on erittäin herkkä lämpötilan muutoksille ja näiden kokemusten mukaan tasapainottuminen vie aikaa. (Agilent Technologies, 2003)

Virtausnopeus ja ajon kesto

Virtausnopeus oli ajoissa joka kerralla 1,0 ml/min, jota käytettiin K.Ruckmanin tutkimuksissa ja jota valmistaja suosittelee käytettäväksi. Ajojen aikana paine pysyi tasaisesti 41 – 44 bar välillä. Tämä pysyy myös kolonnin suositusrajoissa, sillä valmistaja on antanut maksimipaineeksi 69 bar (1 000 psi). Ajon kesto määräytyi kokeiluperiaatteella ja

huomattiin, että näyte oli poistunut kokonaisuudessaan kolonnista viimeistään 20 minuutin kuluessa ajon aloittamisesta.

Näytteet

Näytteinä olivat Piilokset-tuotteet BioTwin, BioDrop MD Plus, BioDrop MD Spray sekä BioDrop MD. BioTwin on piilolinssien hoitonesteeksi tarkoitettu tuote ja muut kolme tuotetta ovat silmien hoitonesteitä. Näytteistä Biodrop MD Plus sisältää trehaloosia ja hyaluronihappoa ja muut kolme sisältävät pelkästään hyaluronihappoa ilman trehaloosia. Tuotteille annetaan normaalisti 2–3 vuoden säilyvyys valmistuspäivästä, mutta tämä säilyvyysaika ei liity välttämättä hyaluronihapon säilyvyyteen tuotteessa. Tuotteet valmistetaan ja pakataan annostelupakkauksiin aseptisesti ilman säilöntäaineita. Tuotteiden hyaluronihapon kuntoa haluttiin tarkastella ja tästä näytteinä olivat BioDrop MD Spraystä mahdollisesti pilaantuneet näytteet eristä W255 ja W256, joita oli säilytetty noin 16 kk ajan 22 °C lämpötilassa. Toisina mahdollisesti pilaantuneina näytteinä olivat BioDrop MD Plus -näytteet eristä A117 ja A116, joita oli säilytetty noin 16 kk ajan 45 °C lämpötilassa. Tarkoituksena oli havaita mahdollisia muutoksia kromatogrammeissa, jotka voisivat aiheutua näytteiden pitkän säilytysajan vuoksi.

Mahdollisesti pilaantuneiden näytteiden lisäksi tehtiin myös pakotettu hajotus -testi. Testit tehtiin kaikille neljälle tuotteelle ja tämän lisäksi myös standardeille. Tässä testissä näytettä pipetoitiin haihdutusmaljalle ja sekaan pipepetoitiin vahvaa 37 % suolahappoa niin, että sitä oli näytteessä 5 til.-%. Näytteet siirrettiin tunniksi 40 °C lämpökaappiin. Tämän jälkeen näytteet neutraloitiin lisäämällä vastaava moolimäärä natriumhydroksidia. Vertailunäytteisiin pipetoitiin vastaavat määrät vettä, jotta vertailu olisi mahdollisimman todenperäinen. Tarkoitus oli saada hyaluronihappo hydrolyyttisesti hajoamaan ja nähdä, miltä hajonnut hyaluronihappo näyttäisi kromatogrammissa. Suuntaaviivat testille saatiin artikkelista, jossa käsiteltiin lääkkeiden hajoavuustestejä. (Blessy, et al., 2014)

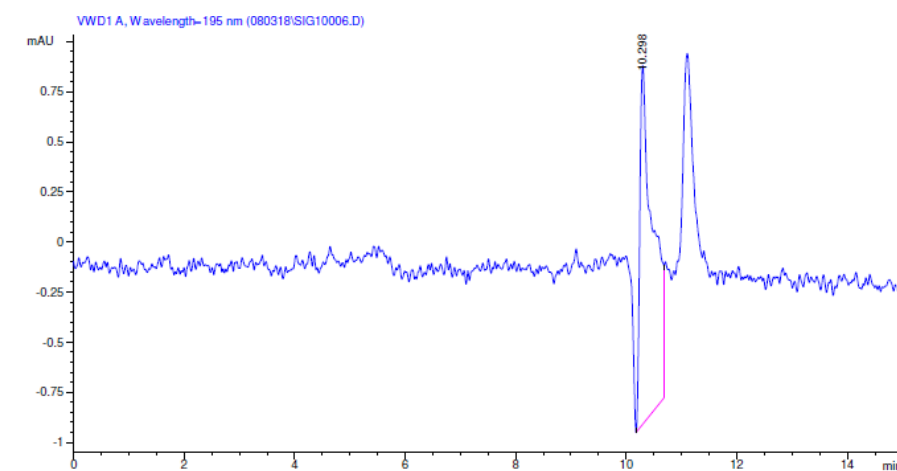
5 TULOKSET

Kaikki näytteet onnistuttiin analysoimaan ja niistä saatiin kromatogrammit. Tulokset ovat osittain tulkinnanvaraisia, koska niiden tulkitseminen on osittain silmämääräistä. Taulukkoon 1 on koottu UV/Vis -detektoria käyttäen saadut avainyhdisteiden retentioajat.

Näyte	Retentioaika (min)		Viite
	Hyaluronihappo	Trehaloosi	
Trehaloosistandardi	-	10,3	Kuvaaja 1
Hyaluronihappostandardi (P100)	5,6	-	Kuvaaja 2
Hyaluronihappostandardi (E2.0)	5,5	-	Kuvaaja 3
BioDrop MD	5,6	-	Kuvaaja 4
BioTwin	5,2	-	Kuvaaja 6
BioDrop MD Spray	5,2	-	Kuvaaja 7
BioDrop MD Plus	5,5	10,6	Kuvaaja 5

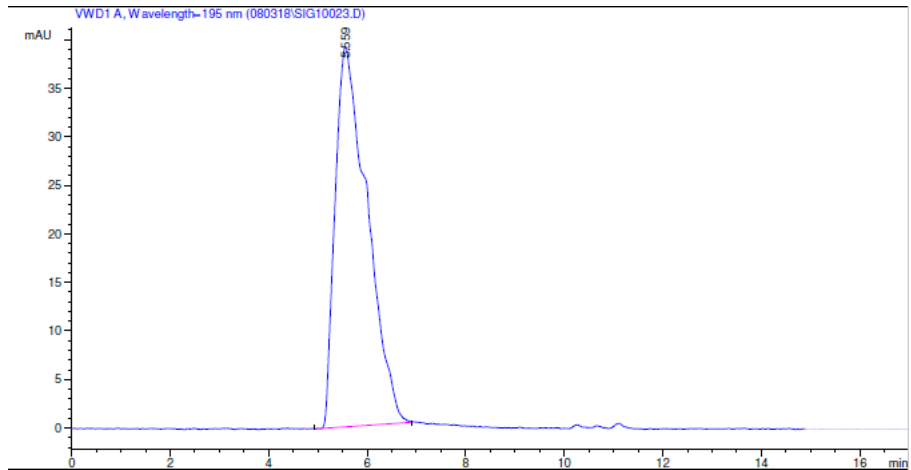
Taulukko 1. UV/Vis -detektorilla saadut avainyhdisteiden retentioajat.

Trehaloosin retentioaika standardinäytteessä oli noin 10,3 min (Kuvaaja 1). Piikin korkeus oli 1,79 mAU ja leveys 0,22 min. Trehaloosin pitoisuus näytteessä oli 20 g/l.



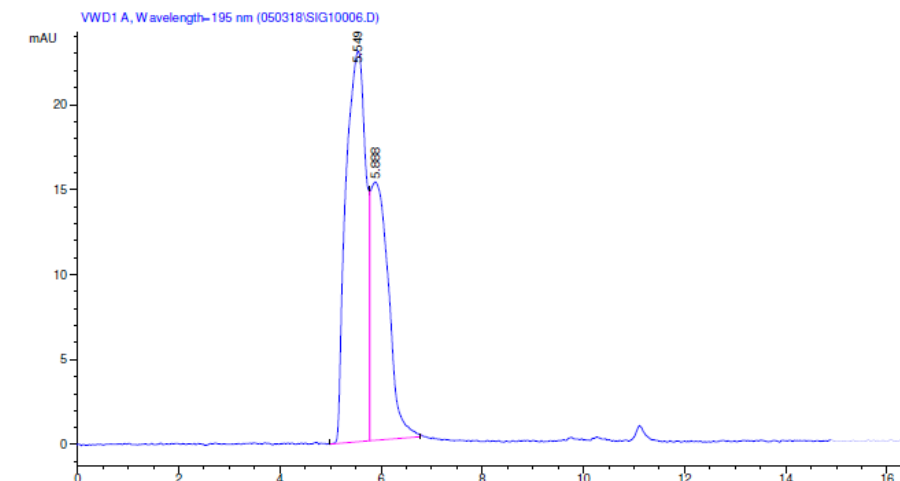
Kuvaaja 1. Trehaloosistandardin kromatogrammi.

Hyaluronihappo P100 valmistetun standardinäytteen retentioaika oli 5,6 min (Kuvaaja 2). Piikin korkeus oli 39,14 mAU ja leveys 0,61 min. Hyaluronihapon pitoisuus näytteessä oli 2 g/l. Ajassa 10 – 12 min havaitaan myös pieniä muutoksia pohjaviivassa.



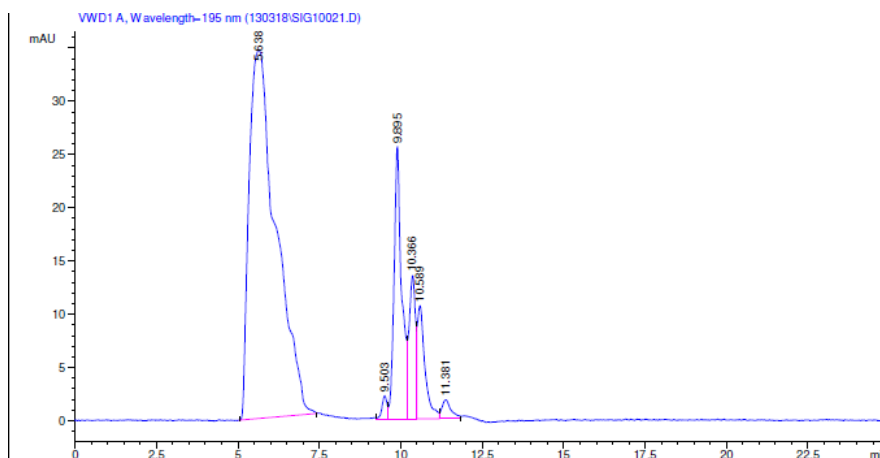
Kuvaaja 2. Hyaluronihappostandardin (P100) kromatogrammi.

Hyaluronihappo E2.0 valmistetun standardinäytteen retentioaika oli 5,5 min (Kuvaaja 3). HPLC oli jakanut piikin kahteen osaan automaattisella integroinnilla. Piikkien yhteenlaskettu leveys oli 0,7 min ja korkeus 22,97 mAU. Hyaluronihapon pitoisuus näytteessä oli 2 g/l. Ajassa 10 – 12 min havaitaan muutoksia pohjaviivassa, joista suurin noin 11 min kohdalla.



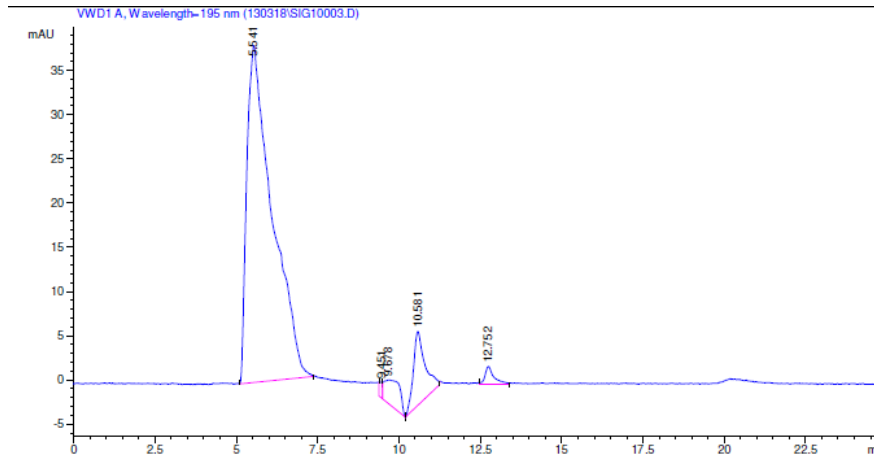
Kuvaaja 3. Hyaluronihappostandardin (E2.0) kromatogrammi.

BioDrop MD näytteessä oleva hyaluronihappo on retentoitunut ajassa 5,6 min (Kuvaaja 4). Piikin korkeus 34,61 mAU ja leveys 0,73 min. Näytteessä ei ollut muita analysoitavia komponentteja.



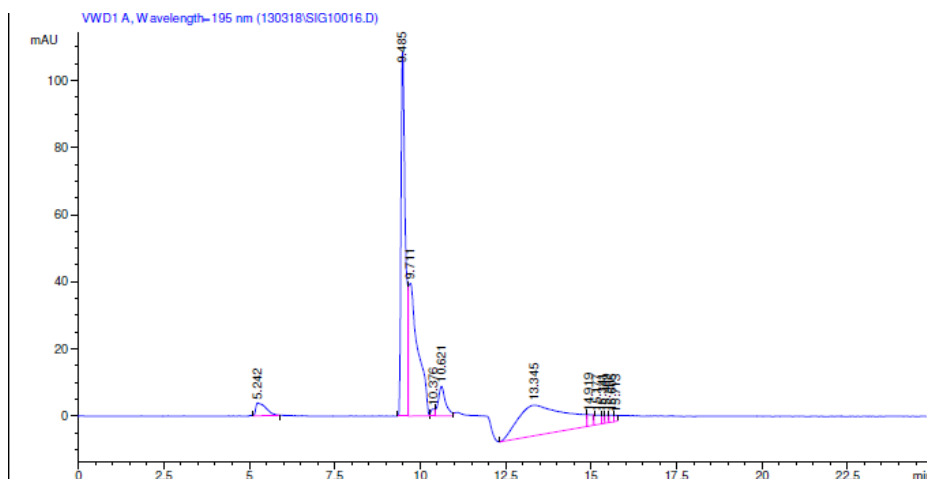
Kuvaaja 4. BioDrop MD -näytteen kromatogrammi.

BioDrop MD Plus -näytteen kromatogrammista tarkasteltiin sekä hyaluronihappoa että trehaloosia (Kuvaaja 5). Hyaluronihappo retentoituu ajassa 5,5 min ja sen piikin leveys on 0,67 min ja korkeus 38,10 mAU. Ajassa 10,6 min retentoituu piikki, joka on samassa kohdassa, kuin trehaloosin retentoituminen. Piikki on kuitenkin huomattavasti suurempi kuin trehaloosin standardinäytteessä oleva piikki.



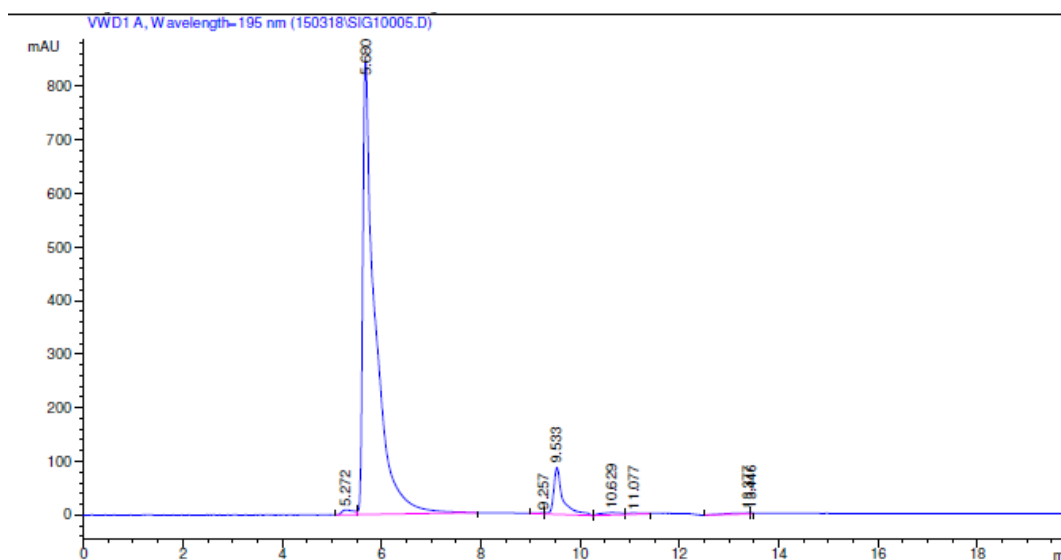
Kuvaaja 5. BioDrop MD Plus -näytteen kromatogrammi.

Hyaluronihapon retentoituminen nähdään ajassa 5,2 min BioTwin -näytteessä (Kuvaaja 6). Sen korkeus on 3,85 mAU ja leveys 0,27 min. Tuotteessa oli tunnistettavana ainoastaan hyaluronihappo.



Kuvaaja 6. BioTwin -näytteen kromatogrammi.

Hyaluronihapon retentoituminen alkaa ajassa 5,3 min (Kuvaaja 7). Piikki kasvaa kuitenkin jyrkästi ajassa 5,7 min. Ajassa 5,2 min piikin korkeus oli 8,64 mAU ja ajassa 5,7 min retentoituvan 845,43 mAU. Ensiksi retentoituvan piikin leveys oli 0,25 min ja jälkimmäisen 0,23 min. Spray -näytteessä oli tunnistettavana ainoastaan hyaluronihappo.



Kuvaaja 7. BioDrop MD Spray -näytteen kromatogrammi.

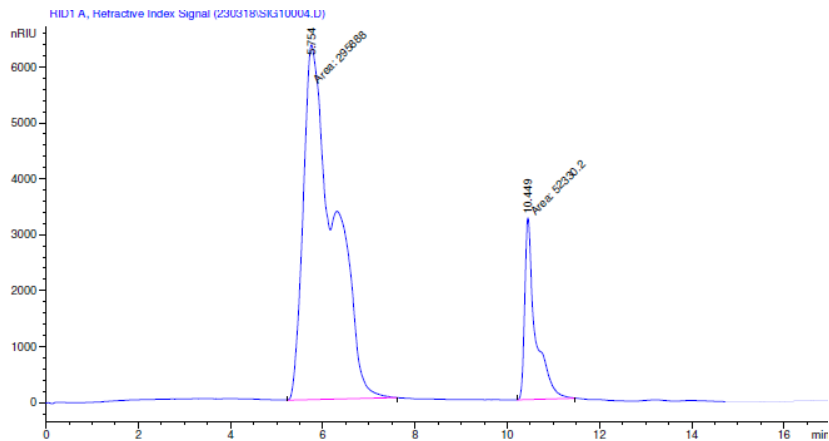
5.1 Tulokset käyttäen taitekerroindetektoria

Näytteet analysoitiin myös taitekerroindetektorilla ja niistä saadut tulokset tässä kappalessa. Taulukosta 2 ilmenee avainyhdisteiden retentioajat.

Näyte	Retentioaika (min)		Viite
	Hyaluronihappo	Trehaloosi	
Trehaloosistandardi	-	10,4	Kuvaaja 9
Hyaluronihappostandardi (P100)	5,8 ja 10,4	-	Kuvaaja 8
BioDrop MD	5,9	-	Kuvaaja 10
BioTwin	5,5	-	Kuvaaja 11
BioDrop MD Spray	5,9	-	Kuvaaja 12
BioDrop MD Plus	5,7	10,2/10,6	Kuvaaja 13

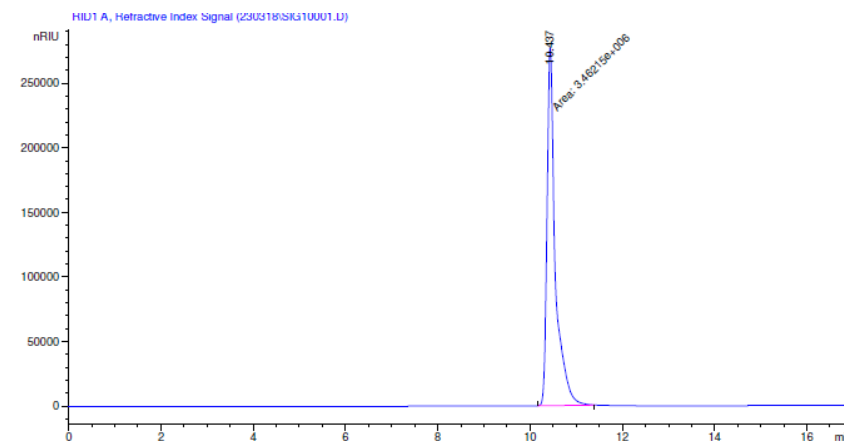
Taulukko 2. taitekerroindetektorilla saadut avainyhdisteiden retentioajat.

Hyaluronihapon standardinäytteessä nähdään retentoituvan kaksi piikkiä (Kuvaaja 8). Toinen ajassa 5,8 min ja toinen 10,4 min. Ensimmäisen piikin korkeus on 6300 nRIU ja leveys 0,78 min. Toisen piikin korkeus on 3300 nRIU ja leveys 0,27 min. Piikkien pinta-
alat jakautuvat siten, että ensimmäinen piikki sisältää 85 % molempien piikkien pinta-
alasta ja jälkimmäinen piikki sisältää vain 15 %. Hyaluronihapon pitoisuus näytteessä
oli 2 g/l. Näytteen injektioilavuus oli 20 µl.



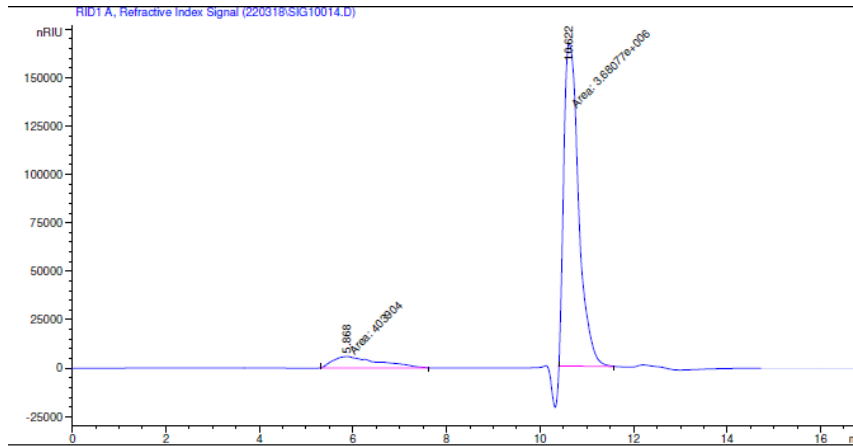
Kuvaaja 8. Hyaluronihappostandardin (P100) kromatogrammi.

Trehaloosinstandardissa trehaloosin retentoituminen tapahtuu ajassa 10,4 min (Kuvaaja 9). Piikin korkeus on 277 000 nRIU ja leveys 0,21 min. Trehaloosin pitoisuus näytteessä oli 20 g/l. Näytteen injektioilavuus oli 20 µl.



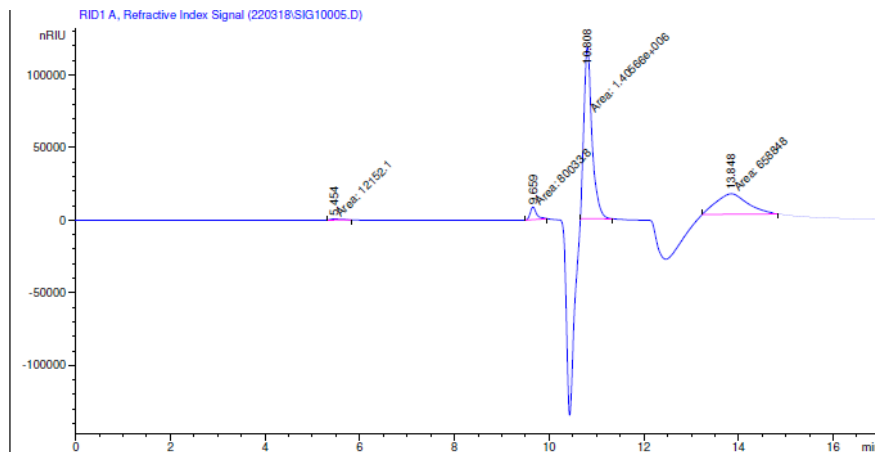
Kuvaaja 9. Trehaloosistandardin kromatogrammi.

BioDrop MD -näytteen kromatogrammissa nähdään hyaluronihapon retentoituneen ajassa 5,9 min (Kuvaaja 10). Piikin leveys on 1,14 min ja korkeus 5900 nRIU. Näytteen injektioilavuus oli 20 µl.



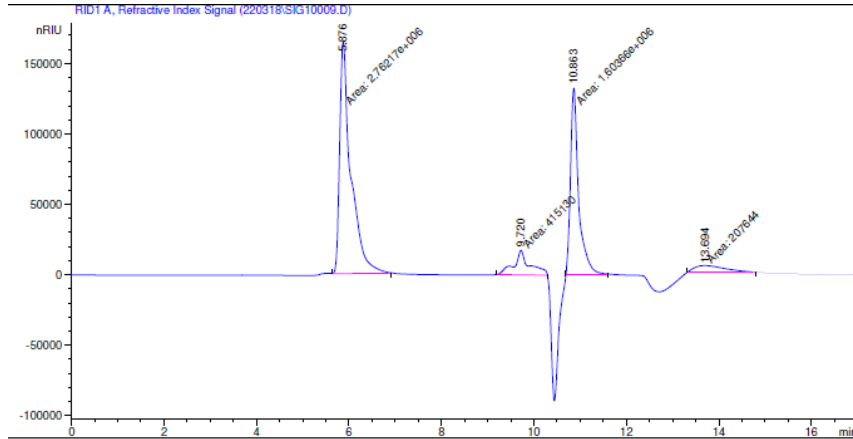
Kuvaaja 10. BioDrop MD -näytteen kromatogrammi.

Hyaluronihapon retentoituminen havaitaan BioTwin -näytteestä ajassa 5,5 min (Kuvaaja 11). Hyaluronihappopiikin korkeus oli 631 nRIU ja leveys 0,32 min. Näytteen injektioilavuus oli 20 µl.



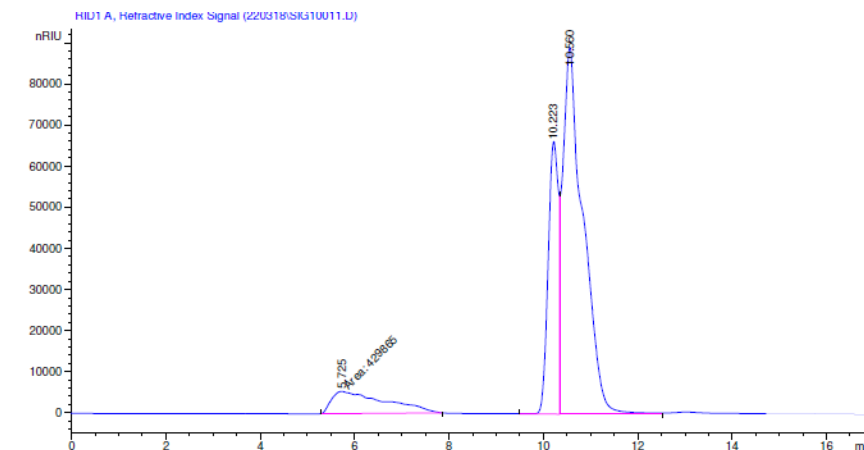
Kuvaaja 11. BioTwin -näytteen kromatogrammi.

BioDrop MD Spray -näytteen kromatogrammissa nähdään ajassa 5,9 min retentoituva hyaluronihappopiikki, jonka korkeus on 165 000 nRIU ja leveys 0,28 min (Kuvaaja 12). Näytteen injektio-tilavuus oli 20 µl.



Kuvaaja 12. Biodrop MD Spray -näytteen kromatogrammi.

BioDrop MD Plus -näytteestä oli tarkoitus tunnistaa sekä hyaluronihappo että trehaloosi (Kuvaaja 13). Hyaluronihappopiikki nähdään ajassa 5,7 min ja se on 5400 nRIU korkea sekä 1,32 min leveä. Trehaloosin retentoitumisajassa retentoitui kaksi piikkiä aikoina 10,2 min ja 10,6 min. Piikit olivat osittain päällekkäin. Näytteen injektio-tilavuus oli 20 µl.

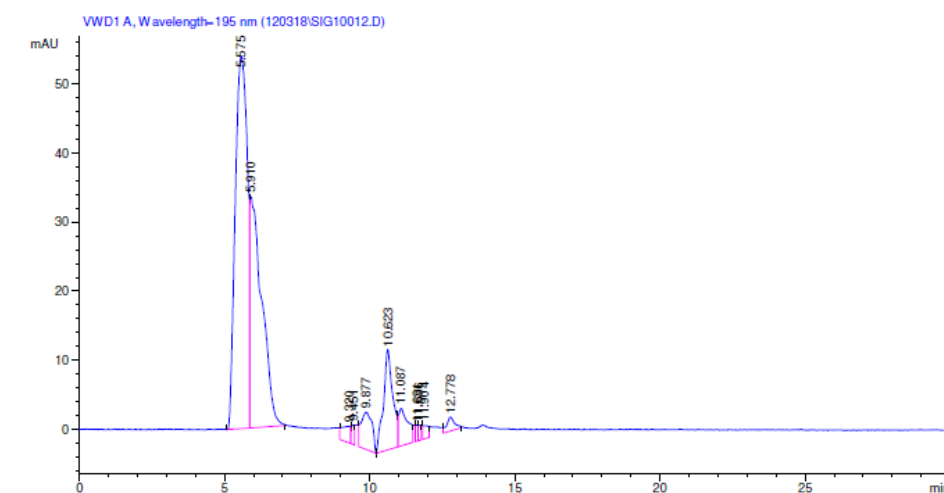


Kuvaaja 13. BioDrop MD Plus -näytteen kromatogrammi.

5.2 Mahdollisesti pilaantuneet näytteet

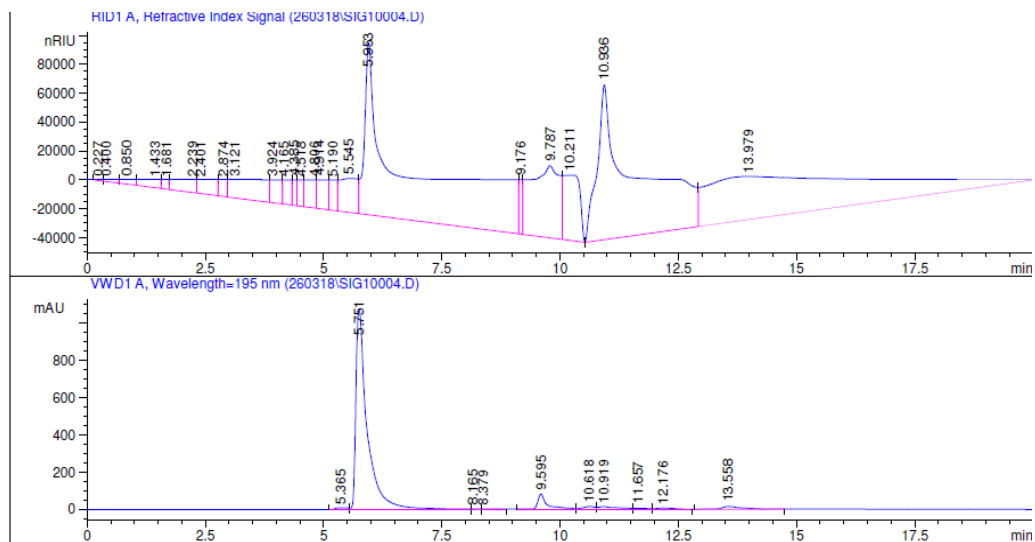
Mahdollisesti pilaantuneiden näytteiden analysoinnissa oli tarkoitus selvittää, tapahtuuko hyaluronihappopiikin muodossa muutoksia, kun näytteitä on säilytetty pitkään. Näytteet A116 ja A117, jotka olivat BioDrop MD Plus -tuotetta, analysoitiin pelkästään UV/Vis -detektorilla. Näytteet W255 ja W256, jotka olivat BioDrop MD Spray -tuotetta, analysoitiin UV/Vis -ja taitekerroindetektorilla.

Kuvaajassa 14 on esitetty kromatogrammi näytteelle A116. Näytettä oli säilytetty samanlaisessa pullossa, mihin kaupallinen tuote myös pakataan. Sitä on säilytetty 45 °C lämmössä noin 16 kk. Toisesta erästä A117, jota on säilytetty samoilla parametreilla, saatiin identtinen kromatogrammi. Kromatogrammeissa hyaluronihappopiikki retentoituu ajassa 5,6 min. Piikin korkeus oli 53,91 mAU ja leveys 0,80 min. Näytteen injektiovolumi oli 10 µl.



Kuvaaja 14. A116 kromatogrammi.

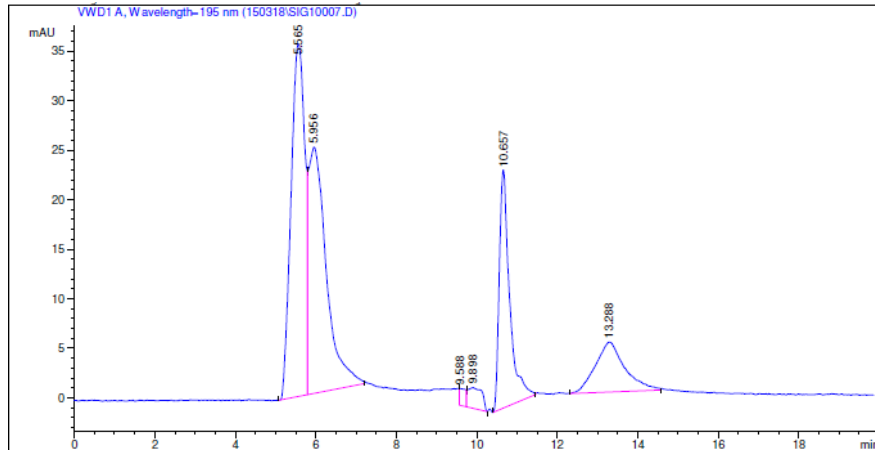
BioDrop MD Spray -tuotteiden pitkään säilytettyinä näytteinä olivat näytteet W255 ja W256. Näytteitä oli säilytetty samanlaisessa pullossa mihin kaupallinen tuote pakataan noin 16 kk ajan 22 °C lämpötilassa. Kuvaajassa 15 nähdään W256 -näytteen kromatogrammi, jossa alapuolella on UV/Vis -detektorin kromatogrammi ja yläpuolella taitekerroindetektorin kromatogrammi. Näytteen injektioilavuus oli 10 µl, jotta UV/Vis -detektorin tuloksia pystyttiin vertaamaan keskenään. Toisesta erästä W255, jota on säilytetty samoilla parametreilla, saatiin identtiset kromatogrammit.



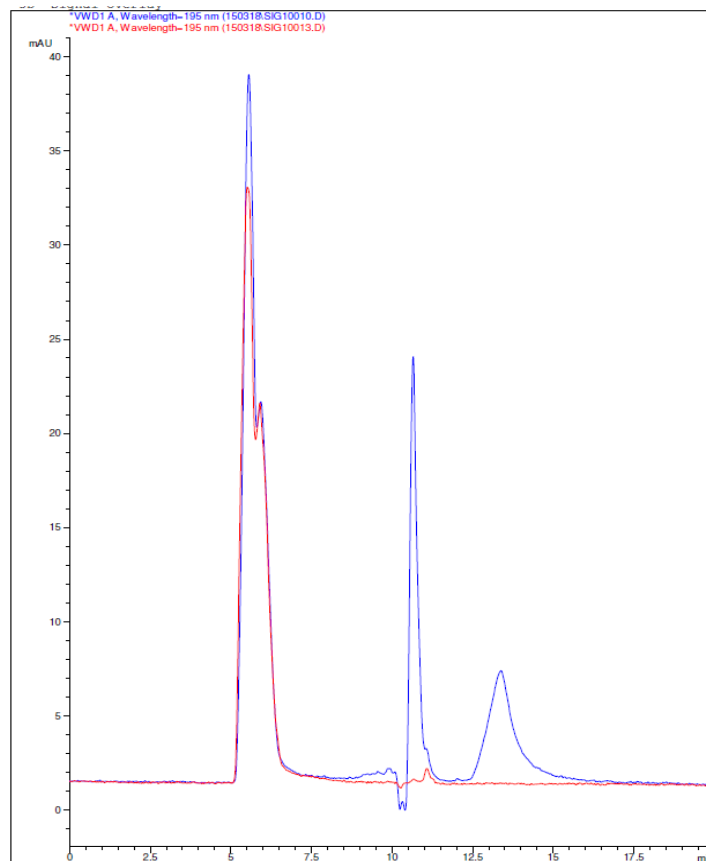
Kuvaaja 15. W256 kromatogrammi.

5.3 Pakotettu hajotus-testin tulokset

Pakotettu hajotus-testissä näytteet ovat mitattu UV/Vis-detektorilla käyttäen aallonpituutta 195 nm. Testien tarkoitus oli osoittaa muutoksia, joita näytteissä tapahtuisi, mikäli hyaluronihappo hajoaisi hydrolyyttisesti näytteissä. Kuvaajassa 16 olevan hyaluronihappostandardin kromatogrammissa aikana 10 – 15 min olevat piikit ovat kasvaneet verrattuna kuvassa 2 nähtävään hyaluronihapon standardinäytteeseen. Kuvaajassa 17 nähdään vertailukuva näiden kahden kromatogrammin välillä.

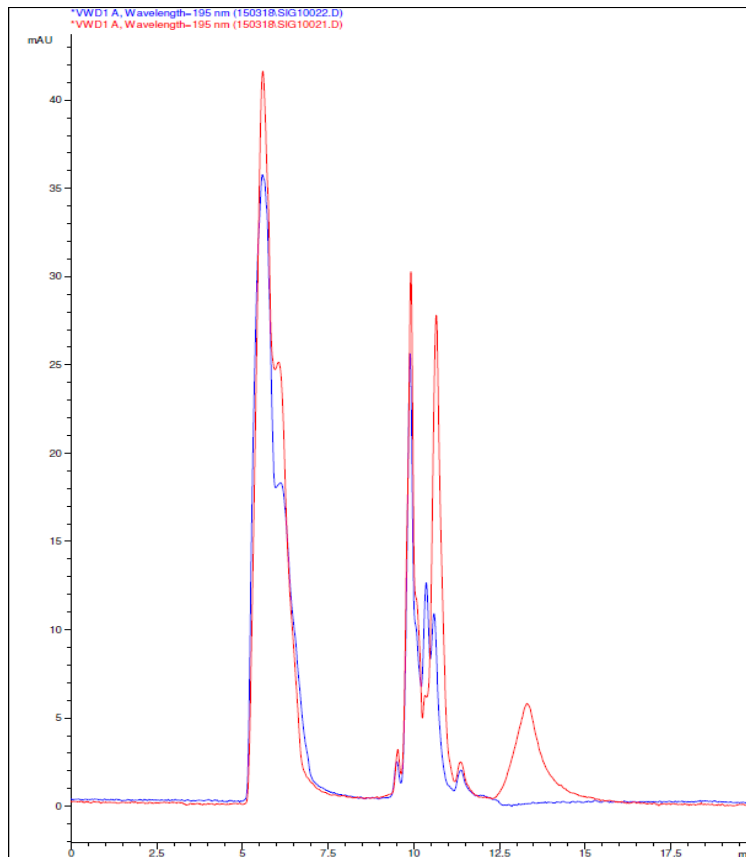


Kuvaaja 16. Hajotetun hyaluronihapon (P100) standardinäytteen kromatogrammi.



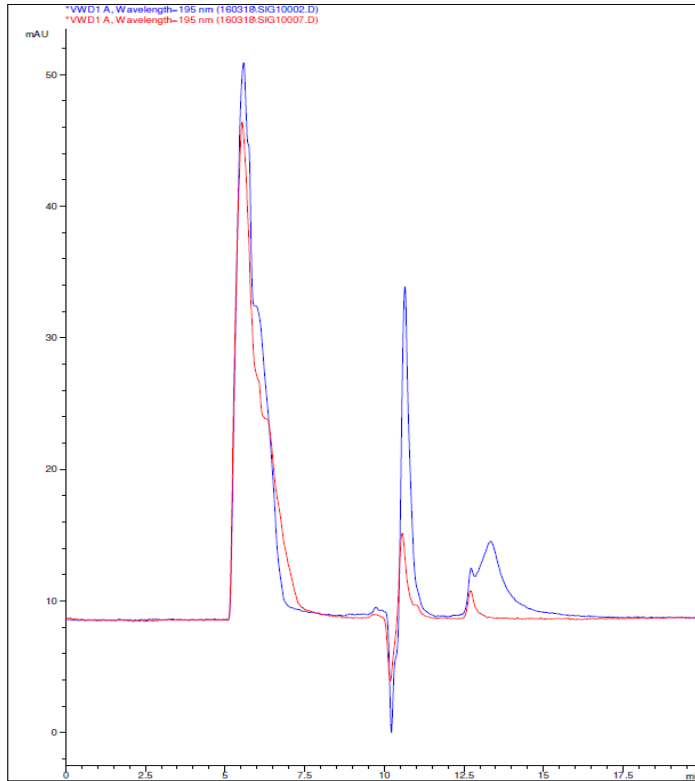
Kuvaaja 17. Hyaluronihappostandardi punaisella ja hajotettu hyaluronihappostandardi sinisellä.

Kuvaajassa 18 nähdään vertailu tuotteen BioDrop MD hajotetun näytteen ja hajottamattoman välillä. Hajotetun näytteen kromatogrammissa kaikkien piikkien korkeudet ovat kasvaneet ja lisäksi aikaan 12,5 min – 15 min on ilmestynyt kokonaan uusi piikki.



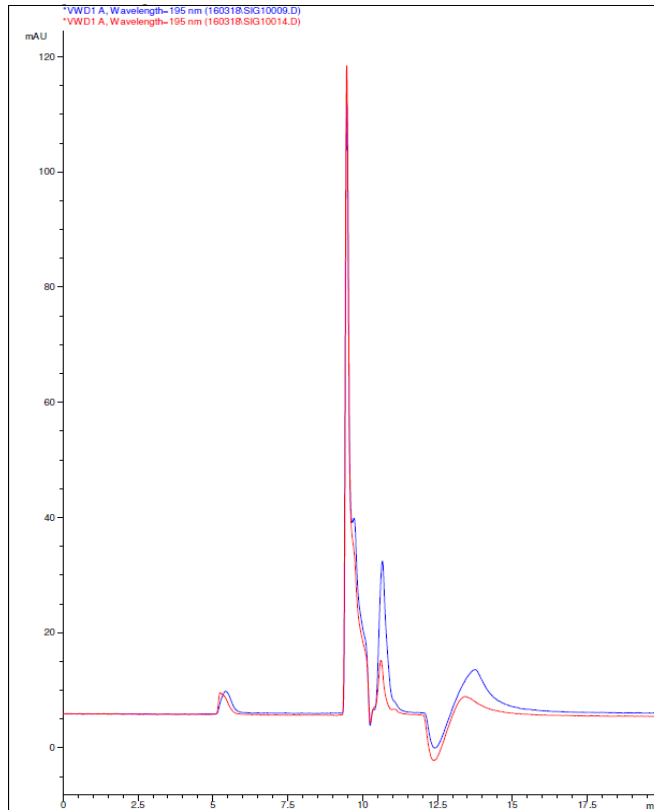
Kuvaaja 18. BioDrop MD -näyte sinisellä ja punaisella hajotettu BioDrop MD -näyte.

Kuvaajassa 19 BioDrop MD Plus -tuotteen hajotetun ja hajottamattoman näytteen kromatogrammien vertailu. Hajotetun näytteen kaikkien piikkien korkeudet olivat kasvaneet.



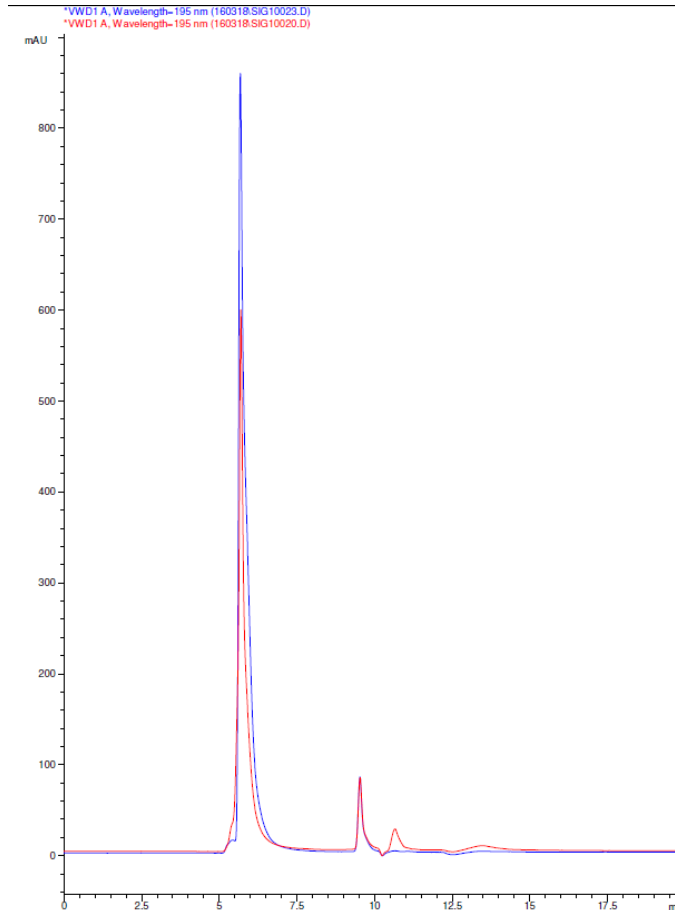
Kuvaaja 19. BioDrop MD Plus -näyte punaisella ja sinisellä hajotettu BioDrop MD Plus -näyte.

Hajotetun BioTwin -näytteen hyaluronihappopiikin muoto on hieman erilainen kuin hajottamattomalla kromatogrammien vertailussa (Kuvaaja 20). Lisäksi ajassa 10 min – 15 min ajassa retentoituvien piikkien korkeudet olivat kasvaneet.



Kuvaaja 20. BioTwin -näyte punaisella ja hajotettu BioTwin -näyte sinisellä.

BioDrop MD Spray -näytteen kromatogrammien vertailussa kuvaajassa 21 nähdään 5,7 min kohdassa olleen piikin kasvaneen suuresti hajotetussa näytteessä. Lisäksi ajassa 11 min retentoituu piikki, jota ei nähdä hajottamattoman näytteen kromatogrammissa ollenkaan.



Kuvaaja 21. BioDrop MD Spray -näyte kuvattu sinisellä ja hajotettu BioDrop MD Spray -näyte punaisella.

6 POHDINTA

Kuvaajassa 1 nähdään trehaloosistandardin UV/Vis -detektorin kromatogrammi. Siinä piikki on hyvin pieni ja kaksihaarainen. Trehaloosistandardi on pitoisuudeltaan 2 %, eli 20 g/l, joten sen pitäisi erottua kromatogrammissa. Opinnäytetyön loppupuolella käytetty taitekerroindetektorin sijaan antoi trehaloosistandardille erinomaisen vasteen, kuten kuvasta 10 nähdään. Tästä voidaankin päätellä, että trehaloosin analysoimiseen taitekerroindetektorin on selvästi parempi kuin UV/Vis -detektorin. Trehaloosin retentioajaksi tällä menetelmällä saatiin 10,4 min.

UV/Vis -detektorin käyttämällä saatu hyaluronihappostandardin kromatogrammi nähdään kuvaajassa 2. Siinä hyaluronihapon retentioajaksi saadaan 5,6 min tällä menetelmällä. Myös ajassa 10 – 12 min nähdään myös pohjaviivan kohinaa. Kuvaajassa 3 nähdään eri laatua oleva hyaluronihappostandardi E2.0, jonka kromatogrammi on hyvin samankaltainen kuin hyaluronihappostandardi P100. Kun myöhemmin hyaluronihappostandardi P100 ajettiin taitekerroindetektorilla, kuvaajasta 8 nähdään, että ajassa 10,4 min retentoituu toinen piikki. Koska tämä piikki on pelkässä hyaluronihappostandardissa, on oletettavaa, että se on standardista peräisin. Se voi olla mahdollisesti epäpuhtauksia näytteessä, tai dimeerejä, jotka ovat irronneet hyaluronihappoketjuista.

Kaikilla UV/Vis-detektorilla ajetuissa näytteissä nähdään hyaluronihappopiikki suunnitteen oikeassa kohdassa 5,5 min. Piikin koko ja retentioaika voi hieman vaihdella, joka johtuu hyaluronihappomolekyylien koosta liuoksessa. K.Ruckmanin tutkimuksissa todettiin hyaluronihapon retentoituvan ajassa 5 min, joten tällä menetelmällä päästiin lähelle sitä. Erot menetelmien välillä voivat johtua esimerkiksi eri hyaluronihaposta, jonka molekyylimassa on eri.

BioDrop MD Plus -näytteessä, josta piti tunnistaa myös trehaloosi, ei sitä UV/Vis -detektorilla pystytty tekemään. Trehaloosistandardin pienen vasteen vuoksi UV/Vis -detektorilla saatuihin tuloksiin ei voida luottaa. Tämä johtaa siihen, että kuvaajassa 5 ja ajassa 10,6 min retentoituva piikki ei välttämättä ole kokonaan trehaloosia. Tuossa piikin korkeus on yli 8 mAU ja trehaloosistandardissa korkeus oli vain 1,7 mAU. Trehaloosistandardin pitoisuus oli sama kuin näytteessä. Taitekerroindetektorin käyttäessä nähtiin myös, että hyaluronihapon disakkaridit retentoituvat samaan aikaan. Tästä voidaankin vetää johtopäätös, että tällä menetelmällä ei pystytä erottamaan trehaloosia kyllin

hyvin, jotta se voitaisiin tunnistaa. Trehaloosin tunnistamiseen tarvittaisi eri kolonni, jotta se saadaan eroteltua näytteen muista komponenteista.

Tuotteiden hyaluronihappopiikit ovat toisiinsa nähden varsin erilaisia ja tämä selittyy sillä, että eri tuotteiden valmistuksessa on käytetty eri molekyylikoon hyaluronihappoa. Esimerkiksi BioDrop MD ei ole valmistettu samasta hyaluronihaposta, josta standardi on valmistettu. Tämä vaikuttaa hieman retentioaikoihin ja piikkien muotoon, mikä pitää huomioida visuaalista tarkastelua tehtäessä. MD Spray -näytteen hyaluronihappopiikin kohdalla esiintyvä iso piikki ei ole kokonaan hyaluronihappoa. Tuote on tyrniöljyemulsio ja sisältää emulgointiaineita. Komponenttien aggregoituessa keskenään ja öljyn pitkäketjuisten rasvahappojen kanssa muodostuu mahdollisesti isoja molekyylikokonaisuuksia, jotka voivat retentoitua samaan aikaan hyaluronihapon kanssa.

Pilaantuneiden näytteiden analyysissä nähtiin, että vaikka näytteitä oli säilytetty väärin, ei se vaikuttanut kromatogrammeihin. Kromatogrammit olivat identtisiä tuoreiden ja vanhojen näytteiden välillä. Pakotettu hajotus -testeissä saatiin tuloksia siitä, miltä näytteet näyttäisivät, mikäli hyaluronihappo olisi lähtenyt pitkän säilytyksen vuoksi lähtenyt hajoamaan. Siellä nähtiin, että jokaisen näytteen kromatogrammissa oli tapahtunut piikkien kasvu 10,5 min ja 13 min kohdalla. Tämä viittaisi siihen, että hyaluronihappo hajotessaan retentoituisi näissä ajoissa. Mahdollista on myös, että ajassa 13 min retentoituneet molekyylit ovat pääasiassa suoloja, jotka ovat peräisin suolahaposta ja lipeästä, joilla näytteen pH-arvoa säädettiin. Kirjallisuuden mukaan kuitenkin hyaluronihapon hydrolyysistä johtuvaa hajotusta ei voida ennustaa, sillä sidokset katkeavat sattumanvaraisista kohdista. Tämä tarkoittaa, että mikäli testi toistettaisiin, olisi tulos ehkä erinäköinen. Isomman huokoiskoon kolonnilla olisi ollut ehkä mahdollista erotella hyaluronihappo molekyylit kokojen mukaan tehokkaammin, mikäli olisi haluttu siihen kiinnittää huomiota.

Mikäli tällä menetelmällä analysoitaisiin oikea näyte, jonka hyaluronihappo on hajonnut, ei voida ennustaa tarkkaan miltä näytteen kromatogrammi näyttäisi. Tulosten mukaan näyttää kuitenkin selvältä, että ajan 10 min jälkeen retentoituvien piikkien kasvua tulisi odottaa, mikäli hyaluronihappo on hajonnut.

7 YHTEENVETO JA KEHITTÄMISEHDOTUKSET

Työn päätavoitteina olivat hyaluronihapon ja trehaloosin tunnistaminen tuotenäytteistä. Kaikista neljästä tuotenäytteestä ajettiin kromatogrammit, joista pystytään tunnistamaan hyaluronihappo. Hyaluronihappopiikin leveys johtunee osittain siitä, että tuotteissa käytettävät hyaluronihappolaadut sisältävät aina eri kokoisia molekyyliketjuja tietyllä vaihteluvälillä ja siksi retentoituvat hieman eri aikaan. Trehaloosin tunnistaminen Biodrop MD Plus -näytteestä ei täysin onnistunut, sillä hyaluronihappostandardissa nähtiin toinen piikki samaan aikaan, kuin trehaloosi retentoituu. Tämä johtunee siitä, että hyaluronihappomolekyylin hajotessa siitä irtoaa yksittäisiä disakkarideja, jotka ovat saman kokoisia kuin trehaloosi. Tällainen hajoaminen nähtiin, kun hyaluronihappostandardille tehtiin pakotettu hajotus -testi, jolloin 10,5 min kohdassa oleva piikki kasvaa huomattavasti. Tässä samassa ajassa retentoituvat trehaloosi ja hyaluronihapon hajoamistuote. Tällä menetelmällä niitä ei pystytä erottamaan toisistaan.

Taitekerroindetektorin osoittautui paremmaksi detektoriksi hyaluronihapon ja trehaloosin analysoinnissa, sillä toisin kuin UV/Vis -detektorin, taitekerroindetektorin avulla saadaan näytteen absorbanssiominaisuudet. Taitekerroindetektorin avulla saadaan trehaloosistandardistakin huomattavasti parempi ja piikki erottuu siinä selkeästi. Myös hyaluronihappostandardissa nähdään toinen piikki ajassa 10,5 min, mikä ei kunnolla erotu UV/Vis -detektorilla.

Mahdollisesti pilaantuneiden näytteiden ajoissa saatiin selville, että vaikka tuotetta on säilytetty väärin, se ei näy kromatogrammeissa. Pakotettu hajotus-testeissä nähtiin, minkälaisia muutoksia kromatogrammiin tulee, kun hyaluronihappo alkaa hajoamaan. Ajassa 10.5 min retentoituu enemmän komponentteja ja tämä on mitä luultavimmin hyaluronihaposta irronneita dimeerejä.

Menetelmä oli päätavoitteen kannalta riittävä, mutta sitä oltaisiin voitu kehittää vielä enemmän. Hyaluronihapon piikki on todella leveä ja sitä olisi voitu saada kapeammaksi esimerkiksi laskemalla eluentin pH-arvoa. Testaamalla alhaisempaa pH-arvoa 6 -7 väliltä, olisi voitu todeta, oliko ajoissa käytetty pH-arvo 7,0 paras. Liiallinen pH-arvon lasku olisi voinut aiheuttaa hyaluronihappo molekyylin hajoamisen. Mikäli hyaluronihapon koostumusta näytteessä olisi haluttu tutkia tarkemmin näytteessä, olisi isomman huokoskoon kolonni ollut parempi valinta. Sillä olisi pystynyt erottelemaan hyaluroni-

happoa tehokkaammin, mikä olisi antanut myös paremman kuvan hyaluronihapon ti-
lasta näytteessä. Myös eluentin suolapitoisuutta olisi ollut mahdollista muuttaa ja selvit-
tää sen vaikutus. Kolonnin valmistajan esitteessä on mainittu erilaisia analyysijä, jotka
on tehty eri fosfaattipitoisuuksilla välillä 20 – 100 mmol/l. K. Ruckmanin julkaisu, josta
lähtötiedot tähän työhön on saatu, kertoo, että optimaalinen suolapitoisuus olisi 50
mmol/l ja eluentin pH-arvo 7,0. Nämä asiat olisi kuitenkin voitu testata uudestaan.

Lisäksi näytteistä olisi voitu tehdä toistettavuuskokeita näytteistä testaamalla eri pul-
loista otettuja näytteitä. Nyt kaikki näytteet olivat yksistä samoista pulloista, joten tuote-
erien välisiä eroja ei päästy testaamaan. Eri tuotantoerien välillä voi olla eroja tuotteiden
kromatogrammeissa.

8 LÄHDELUETTELO

Agilent Technologies, 2003. *Agilent 1100-series Refractive Index Detector Reference Manual*. Waldbron: s.n.

Blessy, M., Ruchi, P. D., Prajesh, P. N. & Agrawal, Y., 2014. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - a review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4(3), pp. 159-165.

Braithwaite, A. & Smith, F., 1996. *Chromatographic methods*. Viides painos toim. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Choy, E., Cho, P., Benzie, I. & Choy, C., 2006. Investigation of corneal effect of different types of artificial tears in a simulated dry eye condition using a novel porcine dry eye model (pDEM).. *Cornea*, 25(10), pp. 1200-1204.

Dong, Q. ym., 2014. Rapid determination of hyaluronic acid concentration in fermentation broth with near-infrared spectroscopy. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 7(6), p. 7.

Greene, R. ym., 1992. Unpreserved carboxymethylcellulose artificial tears evaluated in patients with keratoconjunctivitis sicca.. *Cornea*, 11(4), pp. 294-301.

Harris, D. C., 2010. *Quantitative chemical analysis*. New York: W.H. Freeman and Company.

Higashiyama, T., 2002. Novel functions and applications of trehalose. *Pure and applied chemistry*, pp. 1263 - 1269.

Jaarinen, S. & Niiranen, J., 1995. *Laboratorion analyysitekniikka*. Helsinki: AEL.

Kenkel, J., 2003. *Analytical Chemistry for Technicians*. Kolmas painos toim. Boca Raton: CRC Press Company.

Lindqvist, U. ym., 1992. Seven Different Assays of Hyaluronan Compared for Clinical Utility. *Clinical Chemistry*, 36(1), pp. 127 - 132.

Luyckx, J. & Baudouin, C., 2011. Trehalose: an intriguing disaccharide with potential for medical application in ophthalmology. *Clinical ophthalmol*, pp. 577 - 581.

Mendham, J., Denney, R., Barnes, J. & Thomas, M., 2000. *Vogel's Textbook of quantitative chemical analysis*. Kuudes painos toim. Lontoo: Pearson education.

Nakano, T., Nakano, K. & Sim, J. S., 1994. A Simple Rapid Method to Estimate Hyaluronic Acid Concentrations in Rooster Comb and Wattle Using Cellulose Acetate Electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Osa/vuosikerta 42, pp. 2766 - 2768.

Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P. & Kolar, J., 2008. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*, pp. 397 - 411.

Orobia, A. J. M. ym., 2017. Effects of 3% trehalose as an adjuvant treatment after LASIK. *Clinical Ophthalmology*, pp. 347 - 353.

Patterson, J. ym., 2010. Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration. *Biomaterials*, 31(26), pp. 6772-6781.

Phenomenex, ei pvm *Phenomenex*. [Online]

Available at: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/7b9fe422-933e-48df-a189-373e2ef59503.pdf>

[Haettu 17 5 2018].

Powar, C. & Chatwal, G., 2007. *Biochemistry*. s.l.:Global Media.

Reich, G., 2005. Near-infrared spectroscopy and imaging; basic principles and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(8), pp. 1109-1143.

Ruckmani, K. ym., 2013. Determination of sodium hyaluronate in pharmaceutical formulations by HPLC-UV. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, pp. 324-329.

Safarzadeh, M., Azizzadeh, P. & Akbarshahi, P., 2017. Comparison of the clinical efficacy of preserved and preservative-free hydroxypropyl methylcellulose-dextran-containing eyedrops. *Journal of Optometry*, 10(4), pp. 258-264.

Sandberg-Lall, M., 2014. *Suomen Silmälääkäriyhdistys RY*. [Online]

Available at: www.silmalaakariyhdistys.fi/fin/silmataudit_ ja_nakeminen/kuivat_silmat/

[Haettu 16 05 2018].

Sigma-Aldrich, 2018. *Glycosaminoglycans and Proteoglycans; Glycobiology Analysis Manual 2nd edition*. [Online]

Available at: [https://www.sigmaaldrich.com/technical-](https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/glycobiology/glycosaminoglycans-and-proteoglycans.html)

[documents/articles/biology/glycobiology/glycosaminoglycans-and-proteoglycans.html](https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/glycobiology/glycosaminoglycans-and-proteoglycans.html)

[Haettu 6 4 2018].

Sigma-Aldrich, 2018. *What is hyaluronan; Learning center*. [Online]

Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/stem-cell-biology/3d-stem-cell-culture/learning-center/what-is-hyaluronan.html>

[Haettu 6 4 2018].

Sparshi, J., Sweta, S. & Anjali, N., 2017. Brief Communication: Dexpanthenol and Its Ophthalmic Uses. *Journal of Clinical & Experimental Ophthalmology*, 8(5).

Stern, R., 2004. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *European Journal of Cell Biology*, pp. 317 - 325.

Stoker, S. H., 2015. *Organic and Biological Chemistry*. 7 toim. s.l.:Cengage Learning.

Sze, J. H., Brownlie, J. C. & Love, C. A., 2016. Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *3 Biotech*.

Tokita, Y. & Okamoto, A., 1995. Hydrolytic degradation of hyaluronic acid. *Polymer Degradation and Stability*1995, 48(2), pp. 269-273.

Verma, S., 2018. *Sigma-Aldrich: technical documents*. [Online]

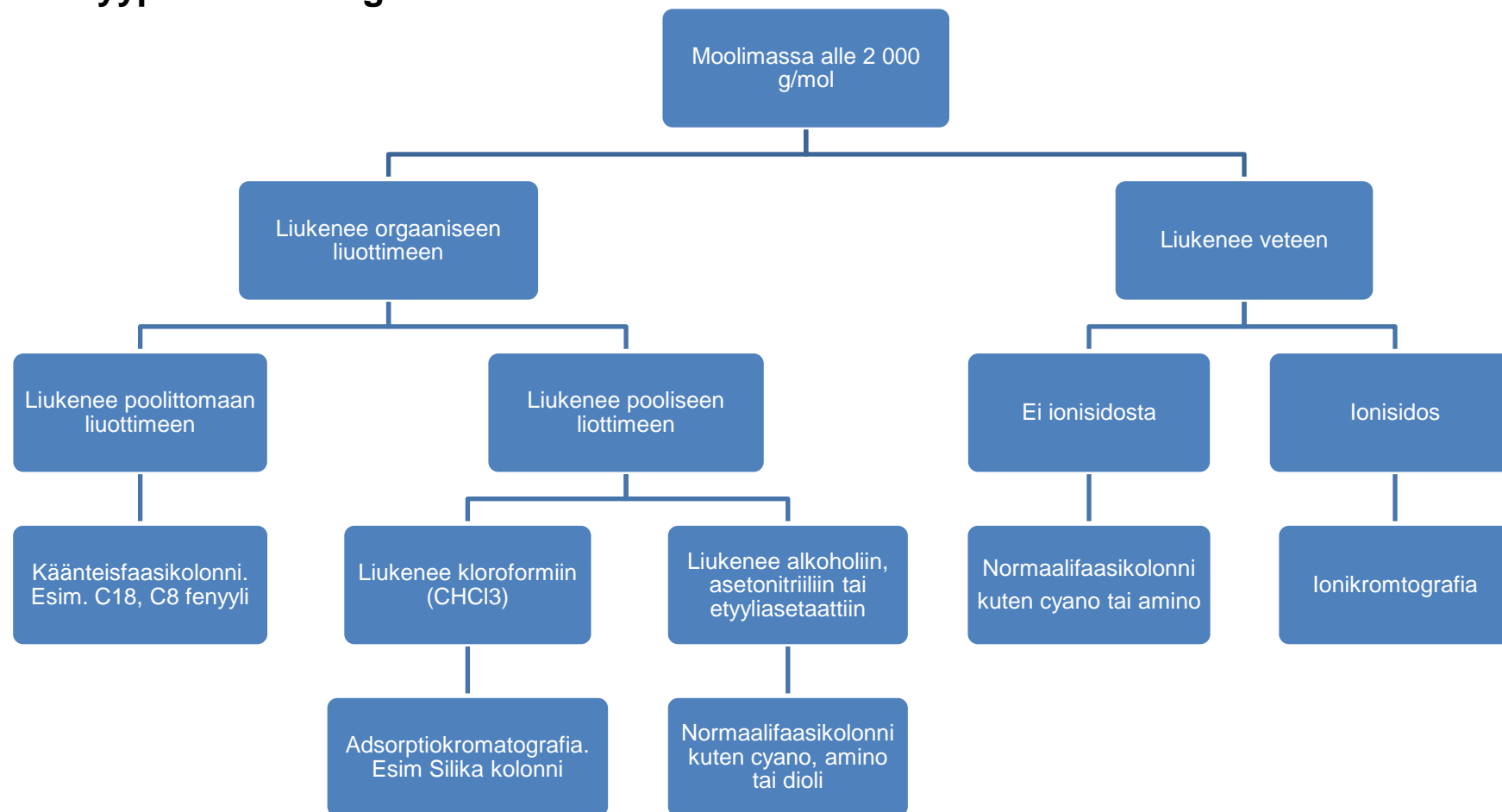
Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-us/reversed-phase-hplc.html>

[Haettu 1 5 2018].

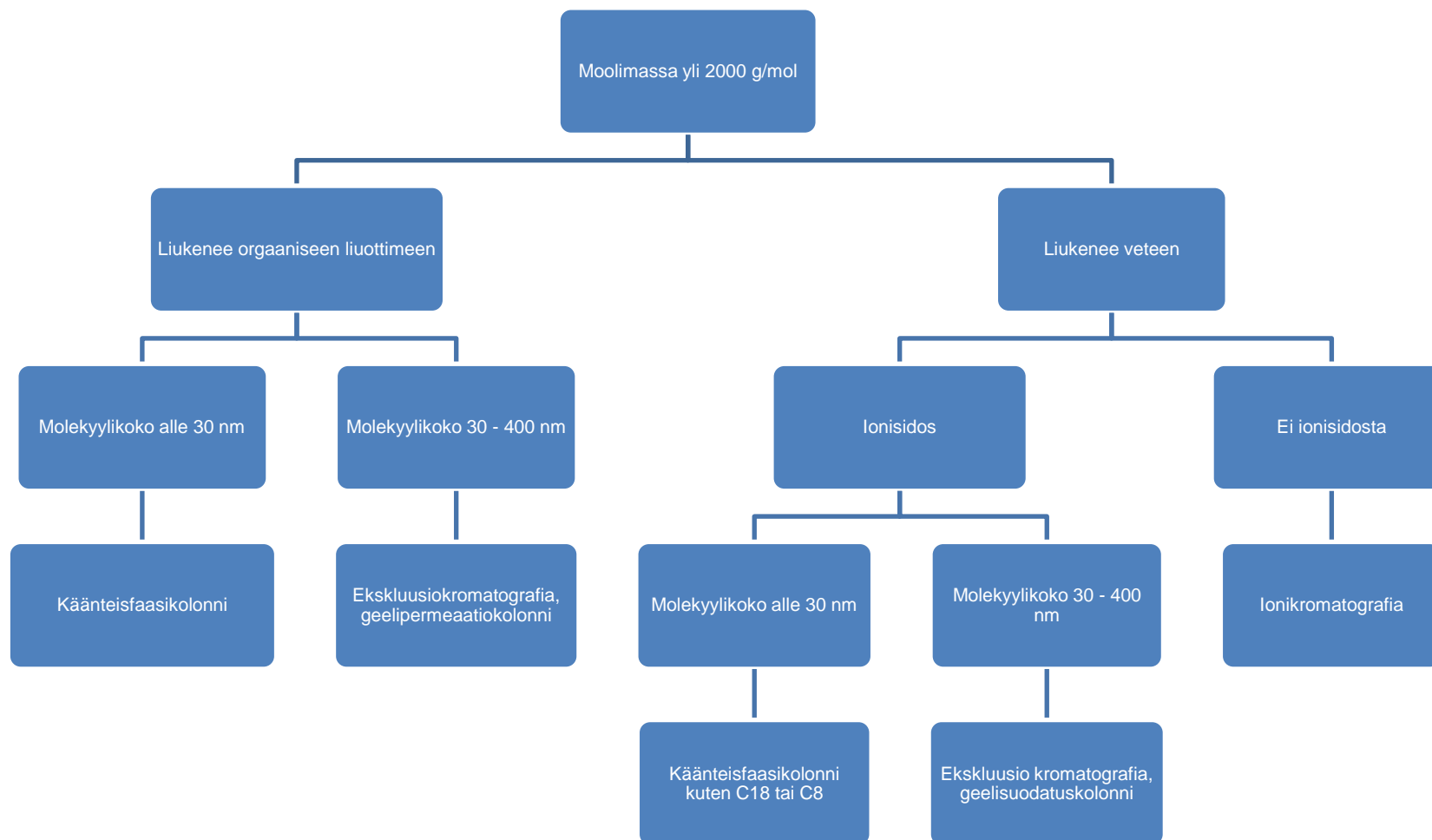
Yuan, H. ym., 2015. Determination of Hyaluronan Molecular Mass Distribution in Human Breast Milk. *Analytical Biochemistry*, 474(1), pp. 78 - 88.

Zheng, X., Goto, T. & Ohasi, Y., 2014. Comparison of in vivo efficacy of different ocular lubricants in dry eye animal models. *Investigative ophthalmology & Visual Science*, 29(55), pp. 3454-3460.

Kolonnityypin valinta-algoritmi

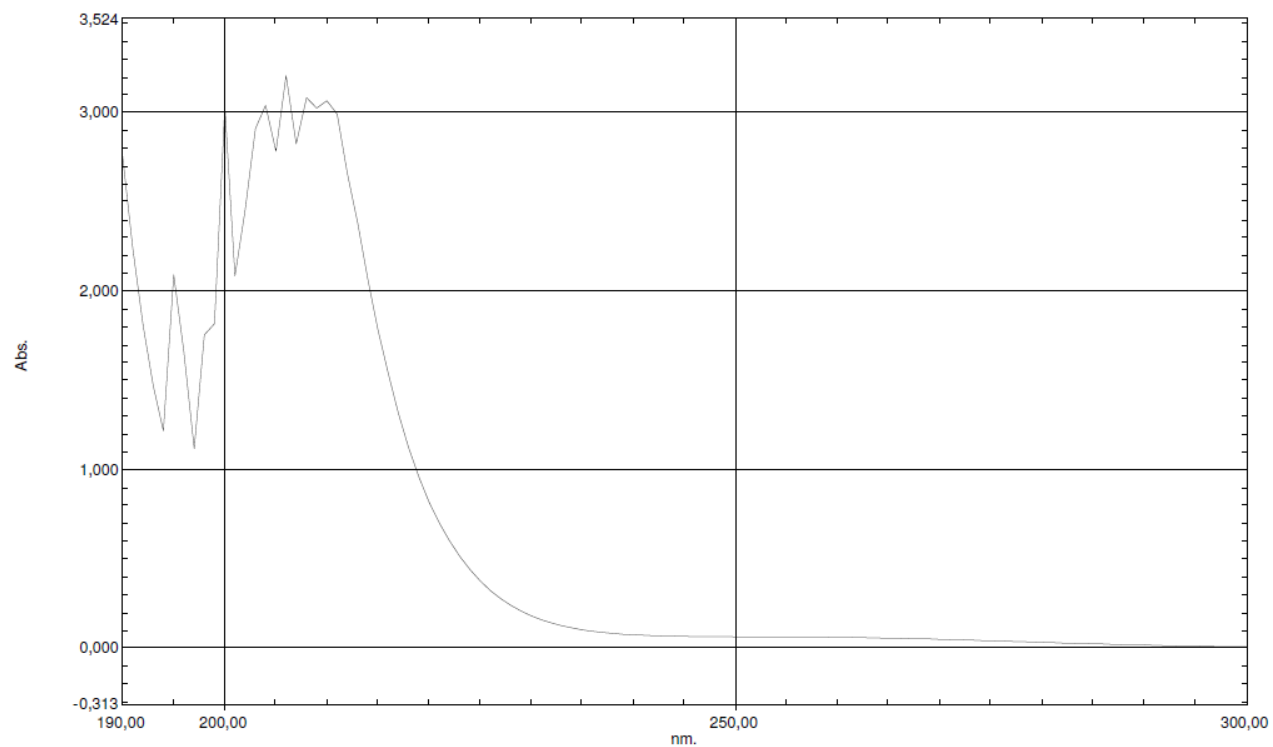


Kuvio 2. Kolonnityypin valintaa helpottava kaavio, kun eroteltavan molekyylin moolimassa on alle 2000 g/mol. (Harris, 2010)

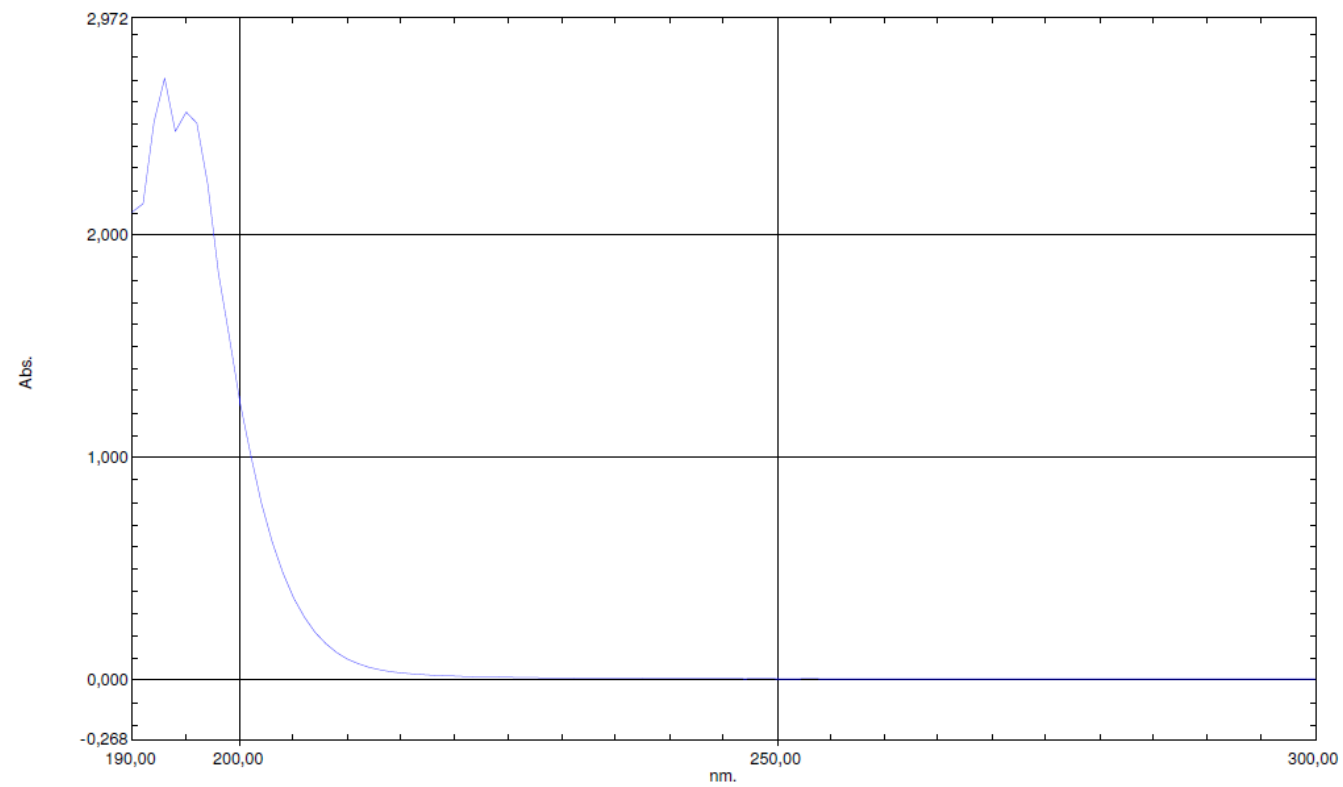


Kuvio 3. Kolonnityypin valintaa helpottava kaavio, kun eroteltavan molekyylin moolimassa on yli 2000 g/mol. (Harris, 2010)

Hyaluronihapon ja trehaloosin standardinäytteiden UV -absorptiospektrit.



Kuva 1. Hyaluronihappostandardin UV -absorbanssi.



Kuva 2. Trehaloosistandardin UV -absorbanssi.