

Lääkevalmisteen HPLC- analyysimenetelmän kehitys ja validointi

Veera Vallius

OPINNÄYTETYÖ
Helmikuu 2024

Laboratoriotekniikan tutkinto-ohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratoriotekniikan tutkinto-ohjelma

VALLIUS, VEERA:

Lääkevalmisteen HPLC-analyysimenetelmän kehitys ja validointi

Opinnäytetyö 57 sivua, joista liitteitä 2 sivua
Helmikuu 2024

Opinnäytetyö tehtiin Hämeenlinnassa sijaitsevan Vitabalans Oy:n laboratoriossa. Vitabalans Oy on suomalainen lääkkeitä, lisäravinteita, lääkinnällisiä laitteita sekä eläinten täydennysrehuja ja hoitotarvikkeita valmistava yritys. Laboratoriossa tehdään laadunvalvonta-analyyskejä sekä tuotekehitystä.

Vaikuttavan lääkeaineen pitoisuus lääkevalmisteista määritetään usein korkean erotuskyvyn nestekromatografialla. HPLC-laitteet ja kolonnit kehittyvät koko ajan, minkä vuoksi myös analyysimenetelmiä kehitetään, jotta ne olisivat mahdollisimman nopeita ja tulokset luotettavia.

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää lääkevalmisteen vaikuttavan lääkeaineen pitoisuuden analysointimenetelmää luotettavammaksi ja nopeammaksi sekä validoida se. Vanhassa menetelmässä vaikuttavan lääkeaineen pitoisuuden analysointi perustui piikin korkeuteen, ja nyt tarkoituksena oli muuttaa kvantitointi perustumaan piikin pinta-alaan. Tarkoituksena oli myös muuttaa ajoliuosta, jotta sen valmistaminen olisi mahdollisimman nopeaa ja ympäristön kuormitus mahdollisimman vähäistä. Ajoliuoksesta oli tarkoitus myös poistaa ioniparireagenssin käyttö. Tarkoituksena oli validoida uusi kehitetty menetelmä hyödyntäen ICH:n Validation of Analytical Procedures Q2(R2) -ohjetta. Validoinnissa määritettiin ohjeen mukaan häiriöalttius, lineaarisuus, oikeellisuus, spesifisyys, toistettavuus ja uusittavuus.

Opinnäytetyössä onnistuttiin kehittämään menetelmä vaikuttavan lääkeaineen pitoisuuden määrittämiseen, missä kvantitointi vaihdettiin perustumaan piikin pinta-alaan. Ajoliuokseksi löydettiin kaliumdivetyfosfaatista valmistettu puskuri, joka on taloudellinen, ympäristöä vähemmän kuormittava sekä nopea valmistaa. Kaikki validoitavat parametrit täyttivät hyväksymiskriteerit. Opinnäytetyö sisältää salassa pidettävää tietoa, jota ei ole sisällytetty julkiseen versioon. Opinnäytetyön julkisessa versiossa ei kerrota lääkevalmisteen vaikuttavaa lääkeainetta eikä kehitetyn menetelmän ajoliuoksen tarkkaa koostumusta tai menetelmän parametrejä.

Asiasanat: HPLC, menetelmäkehitys, validointi, lääkevalmisteet

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Engineering

VALLIUS VEERA:

Development And Validation of an HPLC Analysis Method of a Medicinal Product

Bachelor's thesis 57 pages, appendices 2 pages
February 2024

High performance liquid chromatography is a commonly used method in pharmaceutical industry. It can be used to determine the concentration or the degradation products of the active medicinal substance.

The purpose of this thesis was to develop a HPLC analysis method for determining concentration of the active substance of medicinal product and validating the new developed method. The aim was to change the quantification of the concentration to be based on the area of the peaks instead of the height and find the simplest possible solutions for the analysis. Finding new mobile phase that does not contain an ion pair reagent was one of the main purposes. The aim was also to validate the new developed method using the ICH's guide Validation of Analytical Procedures Q2(R2). The parameters to be validated were robustness, linearity, accuracy, specificity, repeatability, and intermediate precision.

The method for determining the concentration of the active substance was successfully developed. The quantification was changed to be based on the peak area instead of the height. A buffer made of potassium dihydrogen phosphate was found to be a good mobile phase, which is economical, less burdensome on the environment and quick to make. All the validated parameters met the acceptance criteria.

The thesis contains confidential matters. The investigated medicinal product, the active substance, the exact composition of the mobile phase and the parameters of the developed method are not discussed in the public version.

Key words: hplc, method development, validation, medicinal product

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	KORKEAN EROTUSKYVYN NESTEKROMATOGRAFIA	7
	2.1 Menetelmän avainkäsitteet	9
	2.2 HPLC-analytiikka lääketeollisuudessa	11
3	VALIDOINTI	13
	3.1 Häiriöalttius	13
	3.2 Lineaarisuus	14
	3.3 Oikeellisuus	14
	3.4 Spesifisyys	15
	3.5 Toistettavuus	16
	3.6 Uusittavuus	17
4	TYÖN SUORITUS	18
	4.1 Menetelmäkehityksen suoritus	19
	4.2 Validoinnin suoritus	21
	4.2.1 Validoitava menetelmä	21
	4.2.2 Häiriöalttiuden validointi	22
	4.2.3 Lineaarisuuden validointi	24
	4.2.4 Oikeellisuuden validointi	24
	4.2.5 Spesifisyyden validointi	25
	4.2.6 Toistettavuuden validointi	27
	4.2.7 Uusittavuuden validointi	27
5	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	28
	5.1 Menetelmäkehityksen tulokset	28
	5.2 Validoinnin tulokset	36
	5.2.1 Häiriöalttiuden tulokset	37
	5.2.2 Lineaarisuuden tulokset	42
	5.2.3 Oikeellisuuden tulokset	45
	5.2.4 Spesifisyyden tulokset	46
	5.2.5 Toistettavuuden tulokset	48
	5.2.6 Uusittavuuden tulokset	48
6	POHDINTA	51
	LÄHTEET	54
	LIITTEET	56
	Liite 1. Vaikuttavan lääkeaineen referenssin ja tunnettujen epäpuhtauksien kromatogrammi	56

Liite 2. Lääkevalmisteiden ja tunnettujen epäpuhtauksien kromatogrammi
57

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Vitabalans Oy:n laboratoriossa syksyn 2023 aikana. Vitabalans Oy on Hämeenlinnassa sijaitseva suomalainen yksityisomistuksessa oleva lääketehdas, jonka tuotevalikoimaan sisältyy resepti- ja itsehoitolääkkeitä, ravintolisiä sekä eläinten täydennysrehuja ja hoitotuotteita. (Vitabalans Oy – suomalainen lääketehdas n.d.)

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää lääkevalmisteen pitoisuusmenetelmää HPLC-laitteelle luotettavammaksi ja nopeammaksi sekä validoida kehitetty menetelmä. Tarkoituksena oli muuttaa pitoisuusmenetelmä perustumaan piikkien pinta-alaan korkeuden sijasta, jolloin tulokset ovat luotettavampia (Ahuja & Dong 2005, 22). Menetelmäkehityksessä tarkasteltiin myös analyysimenetelmässä käytettäviä reagensseja ja liuoksia, jotta käytössä olisi mahdollisimman yksinkertaiset liuokset ja näin ollen analyysin suorittaminen nopeutuisi laadunvalvontalaboratoriossa. Myös analyysin ympäristönkuormittavuus vähenisi. Vanhan menetelmän ajoliuoksessa käytettiin ioniparireagenssia, joka haluttiin poistaa. Validoinnin tarkoituksena oli varmistaa menetelmän soveltuvuus käyttötarkoitukseensa. Validoinnissa määritettiin menetelmän häiriöalttius, lineaarisuus, oikeellisuus, spesifisyys, toistettavuus sekä uusittavuus.

Korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa käytetään yleisesti lääketeollisuuden tuotekehityksessä ja laadunvalvonnassa. Sillä voidaan analysoida lääkkeiden puhtautta sekä lääkkeiden koostumusta. Laadunvalvonnassa menetelmää hyödynnetään liukenemistutkimuksissa sekä stabiilisuuden ja hajoamistuotteiden määrittämisessä. (Ahuja & Dong 2005, 2; Kazakevich & LoBrutto 2007, 3; Nikolin, Imamovic, Medanhodzic-Vuk & Sober 2004.)

Opinnäytetyö sisältää luottamuksellisia asioita, jotka on poistettu julkisesta versiosta. Opinnäytetyössä ei kerrota lääkevalmisteen vaikuttavaa lääkeainetta, kehitetyn menetelmän tarkkaa ajoliuoksen koostumusta, eikä menetelmän parametrejä.

2 KORKEAN EROTUSKYVYN NESTEKROMATOGRAFIA

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia eli HPLC (High Performance Liquid Chromatography) on herkkä ja tarkka analyysimenetelmä yhdisteiden erottamiseen, tunnistamiseen ja kvantitointiin. Menetelmä perustuu analyyttien molekyyliarakenteeseen ja koostumukseen sekä niiden vuorovaikutuksiin liikkuvan ja pysyvän faasin välillä. (Ahuja & Dong 2005, 20–21; High Performance Liquid Chromatography... 2022.)

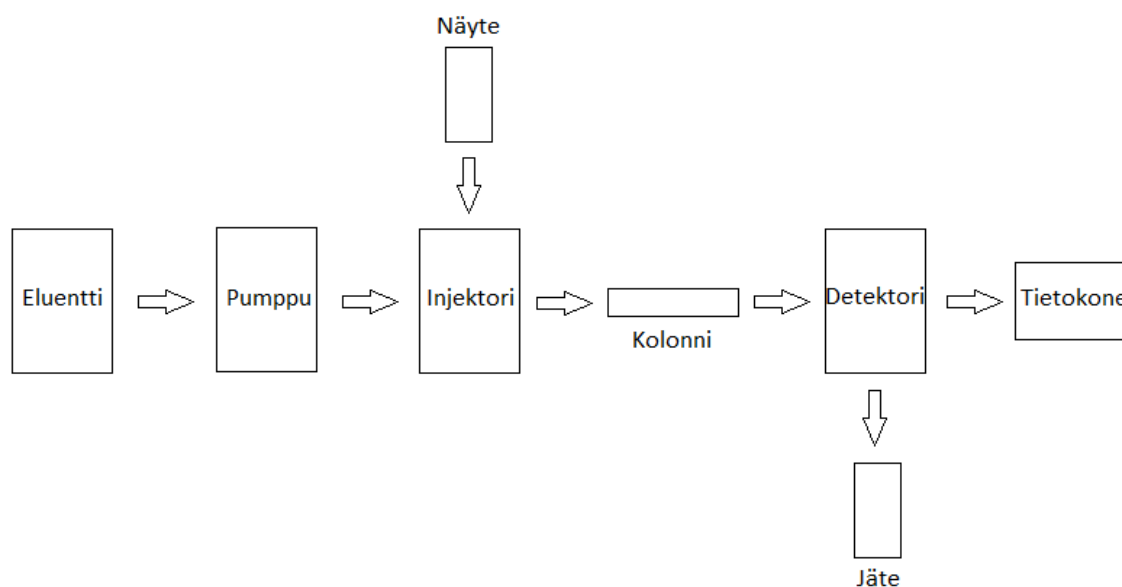
Korkean erotuskyvyn nestekromatografia on paranneltu versio pylväskromatografiasta. Pumppu pakottaa liikkuvan faasin kolonnin läpi korkeassa paineessa, mikä tekee tekniikasta nopeamman verrattuna tavalliseen pylväskromatografiaan. Pumpun tuottama paine mahdollistaa myös paremman komponenttien erottuvuuden, sillä pysyvän faasin materiaalina voidaan käyttää pienempiä partikkeleja. Pienempien partikkeleiden käyttö lisää pysyvän faasin pinta-alaa, jonka vuoksi vuorovaikutuksia muodostuu enemmän liikkuvan faasin mukana virtaavien komponenttien kanssa. (Koester 2016.)

Normaalifaasi-HPLC:ssä kolonni on täytetty yleensä piidioksidia sisältävällä silikalla ja liikkuvana faasina käytetään poolitonta liuotinta, kuten heksaania, kloroformia tai dietyylieetteriä. Kolonnin läpi ajettavassa seoksessa polaariset molekyylit kulkevat hitaammin, koska polaarisisillä yhdisteillä on suurempi vuorovaikutus polaarisen piidioksidin kanssa. Menetelmää voidaan käyttää vesierkille yhdisteille, cis-trans-isomeereille, geometrisille isomeereille ja kiraalisille yhdisteille. (High Performance Liquid Chromatography... 2022; Koester 2016.)

Käänteisfaasi-HPLC on yleisimmin käytetty HPLC:n muoto, koska sitä voidaan käyttää polaarisisille, poolittomille ja ionisoituville yhdisteille. Kolonnissa piidioksidia sisältävän silikan pintaan on kiinnitetty 8–18 atomin hiilivetyketjuja, jolloin pysyvä faasi on pooliton. Liikkuvana faasina käytetään polaarista liuotinta, kuten metanolin sisältämää seosta. Poolittomat yhdisteet liikkuvat kolonnin läpi hitaammin, koska ne muodostavat enemmän vuorovaikutuksia poolittoman

pysyvän faasin kanssa. (High Performance Liquid Chromatography... 2022; Koester 2016.)

HPLC-laitteisto koostuu liuotinsäiliöstä, pumpusta, injektorista, kolonnista, detektorista sekä tiedonhankinta- ja ohjausjärjestelmästä (Kazakevich & LoBrutto 2007, 9–10). HPLC-laitteisto on esitetty kuviossa 1.



KUVIO 1. HPLC-laitteisto (High Performance Liquid Chromatography... 2022.)

HPLC-laitteiston pumppu mahdollistaa liikkuvan faasin virtauksen liuotinsäiliöstä laitteistoon. Pumpun avulla voidaan vaihdella liikkuvan faasin koostumusta ajon aikana valitsemalla eri liuoksia liuotinsäiliöistä. Näytteen injektoinnissa käytetään yleensä automatisoitua näytteenottoa, joka annostelee halutun määrän näytettä analyysiin. Näyte injektoidaan liikkuvan faasin virtaukseen mukaan, joka kuljettaa näytteen kolonniin. Kolonnissa liikkuva faasi ja näyte kohtaavat pysyvän faasin, jolloin näytteen komponentit erottuvat. Detektori havaitsee analyytin ja muodostaa signaalin, jonka tiedot saadaan tiedonhankinta- ja ohjausjärjestelmästä. Tiedonhankinta- ja ohjausjärjestelmällä voidaan ohjata kaikkia HPLC-analyysin parametrejä. (Kazakevich & LoBrutto 2007, 9–10.)

Detektorin valinta HPLC-analyysiin on tärkeää, sillä sen tulee havaita analyytti alhaisissa pitoisuuksissa, tuottaa lineaarinen vaste sekä ehkäistä kromatogrammin piikkien levenemistä. Yleisimmin HPLC-analyyseissä käytössä on UV-Vis-detektori, joka kattaa aallonpituusalueen 190–600 nm. UV-Vis-

detektorissa on käytössä deuterium- xenon- tai volframilamppu sekä monokromaattori, jolla voidaan valita mittausaallonpituus. UV-Vis-detektori mittaa transmittanssia ja muuttaa sen Beerin lain avulla absorbanssiksi A . Beerin laki on esitetty kaavassa 1

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon lc, \quad (1)$$

jossa I_0 on valon intensiteetti, I on transmittoituneen valon intensiteetti, ε on absorptiokerroin, l on valon kulkema matka ja c on analyytin pitoisuus. (Harris 2007, 571–572; Swartz 2010, 1133.) UV-detektori on hyvä valinta kvantitatiivisiin määrittäksi, koska se tuottaa hyvän lineaarisuuden ja analyytin pitoisuus voidaan määrittää nopeasti standardeja vasten (Nikolin, Imamovic, Medanhodzic-Vuk & Sober 2004).

2.1 Menetelmän avainkäsitteet

Korkean erotuskyvyn nestekromatografiassa komponentit havaitaan niiden muodostamina piikkeinä kromatogrammissa (Kazakevich & LoBrutto 2007, 15). Kvantitatiivisessa määrittäksessä voidaan käyttää joko piikin pinta-alaa tai korkeutta. Pinta-alaa käytetään yleisemmin sen tuottamien luotettavampien tuloksien takia. (Ahuja & Dong 2005, 22.)

Retentioaika on mahdollisesti helpoin mitattava parametri nestekromatografiassa. Se kuvaa aikaa, joka kuluu analyytin injektointihetkestä kromatogrammiin muodostuvan piikin korkeimpaan kohtaan. Retentioaikaa voidaan säädellä esimerkiksi menetelmän virtausnopeudella. Jos retentioaikaa halutaan lyhentää, virtausnopeutta kasvatetaan. (Kazakevich & LoBrutto 2007, 15.)

Selektiivisyys tarkoittaa menetelmän kykyä erottaa eri komponentteja. Erottuminen on mahdollista vain, jos komponentit kulkeutuvat kolonnin läpi eri nopeuksilla. Selektiivisyys on riippuvainen näytteen laadusta ja sen vuorovaikutuksesta pysyvän faasin kanssa, pysyvän faasin materiaalista sekä

liikkuvan faasin koostumuksesta. (Ahuja & Dong 2005, 26; Kazakevich & LoBrutto 2007, 18–19.)

Resoluutio on kahden vierekkäisen piikin erotteluaste. Resoluutio R lasketaan kaavalla 2

$$R = \frac{\Delta t_R}{w_b}, \quad (2)$$

jossa Δt_R on retentioaikojen erotus ja w_b on piikkien leveyden keskiarvo. Resoluution tavoitearvo on monesti suurempi kuin kaksi, koska silloin erottuminen on tapahtunut tarpeeksi hyvin pohjaviivan kautta, jotta analyyttien kvantitoiminen on luotettavaa. Alle 1,5 resoluutio tarkoittaa, etteivät piikit ole erottuneet toisistaan. (Ahuja & Dong 2005, 28–29.)

Vaikka analyyttien muodostamien piikkien haluttaisiin olevan symmetrisiä, näin ei aina kuitenkaan ole. Monesti piikkien eturintama on loiva tai piikit häntivät. Piikin häntimistekijä T_f voidaan laskea kaavalla 3

$$T_f = \frac{W_{0,05}}{2f}, \quad (3)$$

jossa $w_{0,05}$ on 5 % piikin korkeudesta ja $2f$ on piikin leveys. Yleensä tähdätään häntimistekijän arvoväliin 0,9–1,4. Häntimistekijän arvon ollessa 1,0, piikki on symmetrinen. Jos häntimistekijän arvo on alle 1,0, piikin eturintama on loiva, ja arvon ollessa yli 1,0, piikki häntii. Piikin loivaa eturintamaa voi aiheuttaa liian suuri näytemäärä, kemiallinen reaktio tai komponentin isomerisoituminen. Häntimistä yleensä aiheuttaa analyytin muut vuorovaikutukset kiinteän faasin kanssa, kuten emäksisten analyyttien vuorovaikutukset silikageelin happamien silanoliryhmien kanssa. (Ahuja & Dong 2005, 29–30.)

Liikkuvan faasin koostumuksella on suuri vaikutus analyyttien erottumiseen ja retentioaikaan. Jos liikkuvassa faasissa käytetään orgaanista liuotinta, sen prosenttiosuuden kasvattaminen lyhentää retentioaikaa. Käytettävän orgaanisen liuottimen valinta vaikuttaa myös menetelmän selektiivisyyteen. Analyytin

emäksisten ja happamien funktionaalisten ryhmien parempaan erottumiseen voidaan käyttää puskureita muuttamaan liikkuvan faasin pH:ta. Puskurin valinnassa tulee huomioida sen pKa-arvo, sillä se toimii vain ± 1 pH-yksikköä sen omasta pKa-arvosta. Liikkuvaa faasia voidaan myös happamoittaa yleisimmin käytetyillä fosfori-, metaani- ja etikkahapoilla. Hapan liikkuva faasi, pH-arvoiltaan 2,5–3, vähentää happamien analyyttien ionisaatiota ja minimoi emäksisten analyyttien vuorovaikutusta silikageelin kanssa. (Ahuja & Dong 2005, 25, 35–37.)

Liikkuvaan faasiin voidaan lisätä ioniparireagenssia, joka toimii käänteisfaasimenetelmässä pysyvässä faasissa ioniparireagenssin imeytyessä kolonnin partikkeleihin. Tämä mahdollistaa pysyvän faasin ioninvaihtokyvyn, joka vahvistaa näytteen retentiota, jolla on vastakkainen sähköinen varaus. (Q&A for Ion-Pairing Reagent 2021.)

2.2 HPLC-analytiikka lääketeollisuudessa

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia on tärkeä menetelmä uusien lääkkeiden löytämisessä sekä lääkkeiden kehityksessä ja valmistuksessa. Menetelmää voidaan käyttää kvantitatiivisiin ja kvalitatiivisiin määrittäksiin. Sillä voidaan analysoida lääkkeiden puhtautta, seurata synteettisten valmistusmenetelmien muutoksia, tarkkailla uutta kehitettävää koostumusta sekä käyttää valmiin tuotteen laadunvalvonnassa, kuten lääkevalmisteiden liukenemistutkimuksissa sekä stabiilisuuden ja hajoamistuotteiden määrittämissä. (Ahuja & Dong 2005, 2; Kazakevich & LoBrutto 2007, 3; Nikolin, Imamovic, Medanhodzic-Vuk & Sober 2004.)

HPLC on syrjäyttänyt kaasukromatografian lähes kokonaan farmaseuttisissa analyyseissä ja se on korvannut monia spektroskooppisia menetelmiä. Suurin etu HPLC:ssä muihin menetelmiin verrattuna on liikkuvan faasin helppo muokattavuus näytteen ominaisuuksien mukaan (Nikolin, Imamovic, Medanhodzic-Vuk & Sober 2004). HPLC mahdollistaa haihtumattomien yhdisteiden analysoinnin, mikä ei ole mahdollista kaasukromatografialla (Why The Pharmaceutical Industry Uses HPLC 2020). Haihtumattomien yhdisteiden lisäksi sillä voidaan analysoida aineita, joilla on suuri molekyyliainepaino tai jotka ovat

termisesti epävakaita. Näiden ominaisuuksien vuoksi HPLC:llä voidaan analysoida niin puhtaita lääkeaineita kuin lääkevalmisteita niiden annosmuodossa. (Bavage N, Bavage S, Dalal & Deshmukh 2021, 506.)

HPLC:tä käytetään epäpuhtauksien määrittämisessä, koska sillä on erityinen kyky erottaa komponentit toisistaan tehokkaasti ja tarkasti (Why The Pharmaceutical Industry Uses HPLC 2020). Puhtauden varmistamisessa käytettiin ennen monikiteytysmenetelmää, joka vaati suuria lääkemääriä verrattuna HPLC-menetelmään. Tämän vuoksi HPLC minimoi lääkevalmistajien tappioita. (Bavage N, Bavage S, Dalal & Deshmukh 2021, 508.)

3 VALIDOINTI

Validointi eli varmentaminen tulee tehdä uusille kehitetyille menetelmille tarvittavassa laajuudessa. Validoinnille asetetaan seuraavia vaatimuksia: tulosten tulee täyttää mahdolliset lakien ja säännösten vaatimukset, olla loogisesti oikeita sekä käyttötarkoitukseensa sopivia. Vaatimukset menetelmälle voivat tulla asiakkailta tai viranomaisilta tai ne voivat olla laboratorion itsensä asettamia. Hyväksymiskriteerit validoinnille määrää kuitenkin validoinnin suorittaja. (Hägg 2016, 6–7.)

Validoinnissa mitataan ja lasketaan arvoja validointiparametreille, joilla arvioidaan menetelmän soveltuvuutta. Validointiparametrejä valittaessa tulee miettiä, mitkä ovat kriittisiä tekijöitä ja kuvaavat menetelmän luotettavuutta. Ennen validointia tulee tehdä validointisuunnitelma, jossa tulee kertoa menetelmän käyttötarkoitus, suorituskäytännöt sekä validoitavat parametrit sekä niiden kriteerit. Validoinnin tuloksista kootaan yhteenveto validointiraporttiin. Menetelmän käyttöönotto voidaan aloittaa vasta, kun validointi ja sen tulokset ovat hyväksytyt. Validointi pätee vain testatulle näytematriisille, laitteelle ja parametreille. Jos käyttöä halutaan myöhemmin laajentaa, tulee tehdä uudelleenvalidointi tietyiltä osin. (Hägg 2016, 6–7, 10; Validation of Analytical Procedures Q2(R2) 2022, 4.)

3.1 Häiriöalttius

Häiriöalttius eli robustisuus tarkoittaa menetelmän toimivuutta pienistä muutoksista huolimatta ja se mittaa menetelmän kykyä täyttää vaatimukset normaalikäytössä. Uuden menetelmän kehitysvaiheessa tulee arvioida menetelmän toimintaympäristön muutosalttiit tekijät, kuten pH ja lämpötila. Häiriöalttiuden validoinnissa muutetaan muutosalttiita tekijöitä ja testataan menetelmän toimintaa eri olosuhteissa. Häiriöalttiuden yhteydessä voidaan testata liuosten säilyvyyttä. Liuosten säilyvyyttä testausprosessin aikana voidaan määrittää huoneenlämmön vaikutuksella näytematriisiin. (Hägg 2016, 22, 35; Validation of Analytical Procedures Q2(R1) 1995, 14.) Häiriöalttiuden

validoinnissa ollaan yleensä kiinnostuneita piikkien resoluutiosta, tehokkuudesta, retentioajasta, häntimistekijästä, pinta-alasta, korkeudesta ja kvantitatiivisista tuloksista (Krull & Swartz 2006).

3.2 Lineaarisuus

Lineaarisuus kuvaa, kuinka hyvin laitteelta saatu vaste korreloi tutkittavaa pitoisuutta. Lineaarisuutta mitataan vähintään viidellä eri pitoisuudella, jotka mitataan vähintään kolmeen kertaan. (Hägg 2016, 23.) Lineaarisuus tulee osoittaa koko menetelmän käyttöalueella, jotta voidaan osoittaa menetelmän soveltuvan käyttöön (Validation of Analytical Procedures Q2(R2) 2022, 9).

Lineaarisuus voidaan arvioida standardiliuosten signaalien ja pitoisuuksien funktiona. Tuloksia tulee arvioida sopivilla tilastollisilla menetelmillä, joita ovat korrelaatiokerroin, y-leikkauspiste, regressiosuoran kaltevuus ja datapisteiden poikkeavuus regressiosuorasta. (Validation of Analytical Procedures Q2(R2) 2022, 9.)

3.3 Oikeellisuus

Oikeellisuus tarkoittaa mitattujen tulosten yhtäpitävyyttä analyysin todellisen pitoisuuden kanssa, joten määritettävän analyysin todellinen pitoisuus tulee olla tiedossa. Oikeellisuus tulisi suorittaa pitkällä aikavälillä, jotta saadaan tietoa mahdollisista muuttujien vaikutuksista. (Hägg 2016, 27.) Oikeellisuus on määritettävä koko menetelmän käyttöalueella. Mittauksia olisi hyvä suorittaa kolmella pitoisuustasolla, joista kaikilla suoritetaan kolme toistoa. (Validation of Analytical Procedures Q2(R2) 2022, 12–13.)

Oikeellisuutta määritettäessä tulisi käyttää vertailumateriaalia tai osallistua vertailumittauksiin (Hägg 2016, 27). Oikeellisuus voidaan myös määrittää vertailemalla validoitavan menetelmän tuloksia hyvin karakterisoidun menetelmän tuloksiin, jonka oikeellisuus on raportoitava. (Validation of Analytical Procedures Q2(R2) 2022, 12–13.)

Jos vertailumateriaalien käyttö ei ole mahdollista, oikeellisuus voidaan osoittaa saantokokeilla (Hägg 2016, 27). Oikeellisuutta määritettäessä voidaan käyttää näytteitä, joissa on tutkittavan yhdisteen kaikki komponentit ja lisätty tunnettu määrä tutkittavaa analyyyttiä. Lisäksi on analysoitava näyte, josta löytyy yhdisteen kaikki muut komponentit ilman tutkittavaa analyyyttiä. Oikeellisuus ilmoitetaan näytteisiin lisätyn tunnetun analyytin määrän keksimääräisenä saantoprosenttina. (Validation of Analytical Procedures Q2(R2) 2022, 12–13.)

3.4 Spesifisyys

Spesifisyys tarkoittaa, että menetelmä antaa vasteen vain tutkittavalle analyylille. Menetelmän spesifisyydellä voidaan osoittaa, etteivät muut komponentit vaikuta tutkittavan analyytin tunnistamiseen ja kvantitointiin. Häiritseviä komponentteja voivat olla esimerkiksi tutkittavan analyytin epäpuhtaudet ja hajoamistuotteet. Tärkeintä on, että spesifisyys on riittävä menetelmän käyttötarkoituksessa, mutta joskus spesifisyyden kriteerit on esitetty lainsäädännössä. (Hägg 2016, 30–31; Validation of Analytical Procedures Q2(R2) 2022, 7.)

Tunnistustesteillä varmistetaan, että menetelmä pystyy tunnistamaan tutkittavan analyytin sen molekyyli­rakenteen tai muun erityisominaisuuden perusteella. Tätä testataan mittaamalla näytteitä, joissa osassa on tutkittavaa analyyyttiä ja osassa ei. Lisäksi voidaan käyttää yhdisteitä, jotka ovat samankaltaisia tutkittavan analyytin kanssa ja varmistaa, ettei menetelmä anna vastetta niille. (Validation of Analytical Procedures Q2(R2) 2022, 7–8.)

Analyytin erottuminen epäpuhtauksista voidaan osoittaa lisäämällä näytteeseen tunnettuja epäpuhtauksia ja todistaa, ettei niiden läsnäolo vaikuta tuloksiin. Näytettä ja tuloksia vertaillaan näytteeseen, jossa ei ole epäpuhtauksia. Jos kromatogrammiin tulee useita piikkejä, lasketaan kahden lähimpänä eluoituvan piikin erotteluaste eli resoluutio. (Validation of Analytical Procedures Q2(R2) 2022, 8.)

Spesifisyyden yhteydessä voidaan koittaa tarkoituksenmukaisesti hajottaa tutkittavaa analyyttiä erilaisissa olosuhteissa. Tarkoituksenmukainen analyytin hajottaminen voidaan suorittaa lämmöllä, kosteudella, valolla tai pH-arvojen muuttamisella. Hajotuskokeissa analyyttiä voidaan hajottaa happo- ja emäshydrolyyseillä sekä hapettamalla. Hajotuskokeiden jälkeen lasketaan massatasapaino, jonka laskukaava on esitetty kaavassa 4

$$\text{massatasapaino} = \frac{\text{pit-\% (jälkeen)} + \text{ep pit-\%}}{\text{pit-\% (ennen)}}, \quad (4)$$

jossa pit-% (jälkeen) on tutkittavan analyytin piikin pitoisuusprosentti hajotuskokeiden jälkeen, ep pit-% on epäpuhtauksien pitoisuusprosentti hajotuskokeiden jälkeen ja pit-% (ennen) on tutkittavan analyytin pitoisuusprosentti ennen hajotuskokeita. (Hotha ym. 2013, 78–81.)

Massatasapainon lisäksi piikin puhtautta arvioidaan purity angle ja purity treshold -arvoilla. Kun purity angle -arvo on pienempi kuin purity treshold -arvo, piikki luokitellaan puhtaaksi. (Hotha ym. 2013, 81.)

3.5 Toistettavuus

Toistettavuudella tarkoitetaan mitattujen tulosten välistä yhtäpitävyyttä. Toistettavuuden mittaukset tulisi tehdä lyhyellä aikavälillä toistettavissa olosuhteissa saman tekijän toimesta. Mittauksessa tulee olla myös sama näyte ja laite. (Hägg 2016, 31.)

Toistettavuus voidaan validoida kahdella eri tavalla. Joko mitataan yhdeksän näytettä kattaen koko menetelmän käyttöalue: kolme pitoisuustasoa ja kolme toistoa. Toinen mahdollisuus on tehdä kuusi toistoa 100 % testikonsentraatiolla. (Validation of Analytical Procedures Q2(R2) 2022, 13–14.) Tuloksista lasketaan keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta (Hägg 2016, 32). Keskiarvo \bar{x} lasketaan kaavalla 5

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (5)$$

jossa x_i on yksittäinen mittaustulos ja n on mittaustulosten lukumäärä. Keskihajonta σ lasketaan kaavalla 6

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}, \quad (6)$$

jossa x_i on yksittäinen mittaustulos, \bar{x} on mittaustulosten keskiarvo ja n on mittaustulosten lukumäärä (Mäkelä, Soininen, Tuomola & Öistämö 2019, 85–86.) Suhteellinen keskihajonta $\%RSD$ lasketaan kaavalla 7

$$\%RSD = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100, \quad (7)$$

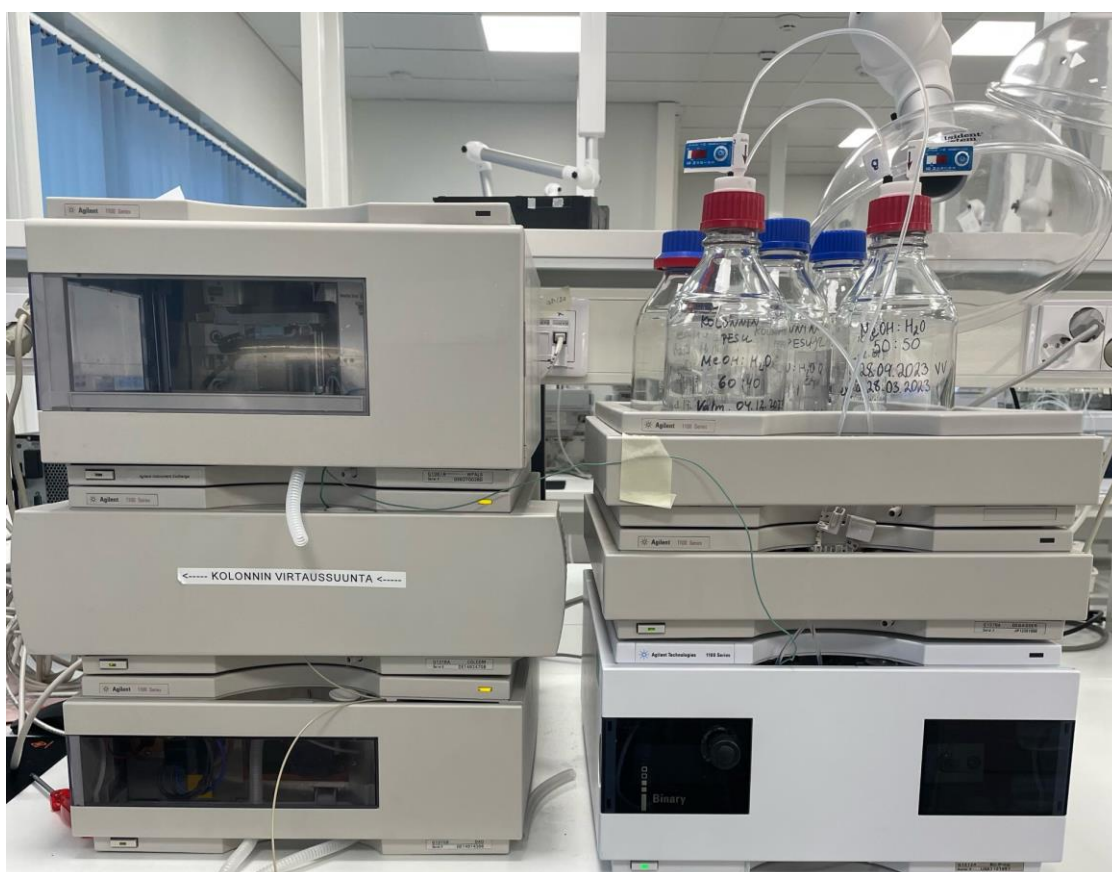
jossa σ on keskihajonta ja \bar{x} on keskiarvo (Torbeck 2010).

3.6 Uusittavuus

Uusittavuus tarkoittaa tulosten yhtäpitävyyttä, kun analyysi suoritetaan samalla menetelmällä, mutta muutetaan oleellisia tekijöitä, jotka voivat vaikuttaa tulosten täsmällisyyteen. Uusittavuuden validoinnin suunnittelussa tulee arvioida satunnaisten tapahtumien vaikutukset menetelmän tarkkuuteen. Uusittavuudessa voidaan muuttaa analyysin suorittamisen päivää, tekijää tai laitetta. Uusittavuutta arvioidaan tulosten kokonaishajonnalla. (Hägg 2016, 32; Validation of Analytical Procedures Q2(R2) 2022, 14.)

4 TYÖN SUORITUS

Menetelmäkehitys ja validointi tehtiin lääkevalmisteelle, jossa vaikuttavaa lääkeainetta on 200 mg tabletissa. Työssä käytettiin Agilentin 1100 Series -mallista HPLC-laitteistoa, jossa oli käytössä Watersin Empower-ohjelmisto. Käytetty HPLC-laitteisto on esitetty kuvassa 1. Laitteistossa oli käytössä diodirividetktori, jolla voidaan mitata käytetyn valonlähteen koko aallonpituusalueen spektriä (Papadoyannis & Gika 2004, 1084–1085). Kolonnina käytettiin InertSustainin C-18 (150 mm x 4,6 mm) kolonnina, jonka partikkelikoko oli 5 µm.



KUVA 1. Menetelmäkehityksessä ja validoinnissa käytetty HPLC-laitteisto

4.1 Menetelmäkehityksen suoritus

Menetelmäkehityksen tavoitteena oli kehittää vanha menetelmä vastaamaan yrityksen nykyisiä tarpeita. Tarkoituksena oli muuttaa pitoisuusmenetelmän kvantitointi perustumaan pinta-alaan korkeuden sijasta. Vanhan analyysimenetelmän ajoliuokselle haluttiin löytää yksinkertaisempi vaihtoehto, joka valmistettaisiin vain muutamasta reagenssista. Tämä nopeuttaisi analyysiä laadunvalvontalaboratoriossa, koska liuosten valmistamiseen menisi mahdollisimman vähän aikaa. Yksinkertaiset liuokset vähentävät myös virhemarginaalia analyysissä. Vanhassa analyysimenetelmässä käytettiin myös ioniparireagenssia, joka haluttiin poistaa uudesta menetelmästä, koska ioniparireagenssin käyttö vaatii oman kolonnin analyysiin. Uuteen menetelmään standardien määrää haluttiin nostaa neljästä standardista viiteen, sillä laboratorion nykyinen tapa on käyttää viittä standardia pitoisuusmenetelmissä.

Vanhassa menetelmässä kantaliuos, standardit sekä näytteet tehtiin ja laimennettiin veteen, mikä haluttiin säilyttää uudessa menetelmässä mahdollisuuksien mukaan. Liuosten valmistaminen veteen nopeuttaa analyysiä, on taloudellisempaa, eikä kuormita ympäristöä verrattuna muihin liuottimiin.

Menetelmäkehitys perustui aikaisemmin tehtyihin tutkimuksiin, joita aiheesta oli julkaistu. Monissa löydettyissä tutkimuksissa ja niiden menetelmissä ajoliuoksena käytettiin fosfaattipuskurin ja orgaanisen liuottimen, lähinnä metanolin, seosta. Ensimmäisenä testattiin ajoliuosta, joka valmistettiin fosfaattipuskurista sekä metanolista suhteessa 70:30. Menetelmäkehityksen alkutilanteen muut käytetyt ajoparametrit on poimittu löydettyistä tutkimuksista ja ne on listattu taulukkoon 1.

TAULUKKO 1. Menetelmäkehityksen ajoparametrit alkutilanteessa

Mittausaallonpituus	254 nm
Kolonnin lämpötila	25 °C
Virtausnopeus	1,0 ml/min
Injektointitilavuus	30 µl

Ajoliuosta testattiin standardilla, jonka pitoisuus olisi sama kuin analyysimenetelmän laimennetulla näytteellä. Kantaliuos valmistettiin punnitsemalla tarkasti noin 100 mg vaikuttavan lääkeaineen referenssiä, joka liuotettiin ja laimennettiin 100 ml:ksi vedellä. Kantaliuosta pipetoitiin 4 ml ja laimennettiin 100 ml:ksi vedellä.

Fosfaattipuskuri valmistettiin liuottamalla kaliumdivetyfosfaattia litraan vettä, jonka pH säädettiin 10 % ortofosforihapolla. Ajoliuosta valmistettiin litra, johon mitattiin mittalasilla 700 ml fosfaattipuskuria ja 300 ml metanolia. Ajoliuosta pidettiin ultraäänihauteessa noin 20 minuuttia, jotta ajoliuoksesta poistuisi analyysiä häiritsevät ilmakuplat. Ajoliuos ja standardi suodatettiin 0,45 µm ruiskusuodattimen läpi. Standardi injektioitiin pohjaviivan tasaantumisen jälkeen.

Standardin liuotinta koitettiin saada ajoliuoksen kanssa samanlaiseksi, joten aikaisemmin veteen tehdystä kantaliuoksesta pipetoitiin 4 ml ja laimennettiin 100 ml:ksi ajoliuoksessa käytetyllä fosfaattipuskurilla.

Vaikuttavan lääkeaineen maksimiaallonpituutta tarkasteltiin Empower-ohjelmiston spektrin avulla, josta nähtiin, että vaikuttava lääkeaine absorboi parhaiten aallonpituudella 292 nm. Mittausaallonpituus vaihdettiin ja näytteenä käytettiin fosfaattipuskuriin laimennettua standardia.

Fosfaattipuskuria valmistettiin lisää, joka laitettiin HPLC-laitteiston liuossäiliöön erikseen. Toiseen liuossäiliöön laitettiin 100 % metanolia. Metanolin prosenttiosuutta kasvatettiin 40 prosenttiin ja näytteenä käytettiin fosfaattipuskuriin laimennettua standardia. Piikin käyttäytymistä testattiin pienemmillä injektioilavuuksilla. Injektioilavuutta pienennettiin ensin 20 µl:aan ja edelleen 10 µl:aan.

Häiritsevien piikkien käyttäytymistä testattiin vielä valmistamalla standardi mahdollisimman samanlaiseksi ajoliuoksen kanssa. Ajoliuoksena käytettiin fosfaattipuskurin ja metanolin seosta suhteessa 70:30. Kantaliuokseen punnittiin tarkasti noin 25 mg vaikuttavan lääkeaineen referenssiä, joka liuotettiin ja laimennettiin 25 ml:ksi ajoliuoksella. Kantaliuosta pipetoitiin 4 ml ja laimennettiin 100 ml:ksi ajoliuoksella.

HPLC-laitteiston toiseen liuossäiliöön vaihdettiin 100 % metanolin tilalle 100 % asetonitriliä. Ajoliuoksena käytettiin fosfaattipuskuria ja asetonitriliä suhteessa 70:30. Näytteenä käytettiin fosfaattipuskuriin laimennettua standardia.

Laitteeseen vaihdettiin pidempi C-18 kolonni (250 mm x 4,5 mm, partikkelikoko 5 µm). Ajoliuoksena käytettiin fosfaattipuskurin ja metanolin seosta suhteessa 70:30. Näytteenä käytettiin ajoliuokseen laimennettua standardia.

Laitteeseen vaihdettiin takaisin 15 cm pitkä kolonni ja kokeiltiin ajoliuoksena pelkkää fosfaattipuskuria. Näytteenä käytettiin veteen laimennettua standardia. Lopuksi nostettiin virtausnopeutta. Analyysimenetelmällä saatiin hyviä tuloksia ja menetelmä todettiin toimivaksi vaikuttavan lääkeaineen pitoisuuden kvantitointiin lääkevalmisteesta.

4.2 Validoinnin suoritus

Validoinnin pohjana käytettiin ohjetta Validation of Analytical Procedures Q2(R2), jonka on laatinut lääkealaa maailmanlaajuisesti harmonisoiva neuvosto ICH (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) (Harmonisation for Better Health n.d.). Validoinnissa määritettiin menetelmän häiriöalttius, lineaarisuus, oikeellisuus, spesifisyys, toistettavuus ja uusittavuus.

4.2.1 Validoitava menetelmä

Ajoliuoksena käytetty fosfaattipuskuri valmistettiin punnitsemalla kaliumdivetyfosfaattia, joka liuotettiin litraan vettä ja pH säädettiin 10 % ortofosforihapolla. Ajoliuos suodatettiin 0,45 µm suodattimen läpi ja pidettiin ultraäänihauteessa noin 20 minuuttia. Ajoliuoksen tarkka koostumus pidetään yrityksen sisäisenä tietona.

Kantaliuokseen punnittiin tarkasti noin 25 mg vaikuttavan lääkeaineen referenssiä, joka liuotettiin ja laimennettiin 25 ml:ksi vedellä. Kantaliuoksia

valmistettiin kolme rinnakkaista. Taulukossa 2 on esitetty standardien pitoisuudet, kantaliuosta pipetoitavat määrät sekä kantaliuos, jota pipetoitiin. Standardit laimennettiin veteen. Taulukossa 2 on myös esitetty mittapullojen koot, joihin standardit laimennettiin. Standardit suodatettiin 0,45 µm ruiskusuodattimen läpi.

TAULUKKO 2. Standardien valmistus

Standardi	Pitoisuus (µg/ml)	Kantaliuos	Kantaliuosta pipetoitava määrä (ml)	Mittapullo (ml)
1	20	1	2	100
2	30	2	3	100
3	40	3	4	100
4	50	1	5	100
5	60	2	3	50

Näytteitä valmistettiin kaksi rinnakkaista punnitsemalla 10 tablettia 500 ml mittapulloihin. Tabletit liuotettiin veteen sekoittamalla näytteitä tasoravistelijassa 20 minuuttia tai kunnes tabletit olivat liuenneet. Mittapullot täytettiin merkkiin vedellä. Näyteliuosta pipetoitiin 1 ml ja laimennettiin 100 ml:ksi vedellä. Näytteet suodatettiin 0,45 µm ruiskusuodattimen läpi. HPLC-ajon parametrit pidetään yrityksen sisäisenä tietona.

4.2.2 Häiriöalttiuden validointi

Häiriöalttiuden validoinnissa mitattiin menetelmän suorituskykyä muuttamalla ajoliuoksen pH:ta, kolonnin lämpötilaa, mittausaallonpituutta sekä virtausnopeutta. Taulukossa 3 on esitetty muutokset eri parametreille. Parametrien muutosten vaikutusta tutkittiin vaikuttavan lääkeaineen piikin retentioaikaan, pinta-alaan ja häntimistekijään. Validoinnissa tarkasteltiin myös parametrien muutosten vaikutusta vaikuttavan lääkeaineen ja lähimpänä olevan epäpuhtauden piikin erotteluasteeseen.

TAULUKKO 3. Häiriöalttiuden muutettavat parametrit

Parametri	Muutos
pH	±0,2 yksikköä
Kolonnin lämpötila	±2 °C
Mittausaallonpituus	±2 nm
Virtausnopeus	±0,2 ml/min

Näytteenä käytettiin vaikuttavan lääkeaineen referenssiä, johon oli lisätty kahta vaikuttavan lääkeaineen tunnettua epäpuhtautta. Vaikuttavan lääkeaineen referenssiä punnittiin tarkasti noin 25 mg, joka liuotettiin ja laimennettiin 25 ml:ksi vedellä. Valmistettiin välilaimennos 50 ml mittapulloon, johon pipetoitiin 5 ml kantaliuosta ja täytettiin merkkiin vedellä.

Epäpuhtauksia ei kvantitoitu vaan ne haluttiin kromatogrammiin näkyviin pienempinä piikkeinä verrattuna vaikuttavan lääkeaineen piikkiin. Epäpuhtauksista valmistettiin kantaliuokset liuottamalla epäpuhtauksia spaattelin kärjelliset 20 ml mittapulloihin vedellä. Epäpuhtauksien kantaliuokset ajettiin HPLC-laitteella menetelmän ajoparametreilla, jotta voitiin arvioida näytteeseen pipetoitavat tilavuudet. Näyte valmistettiin 10 ml mittapulloon, johon pipetoitiin 4 ml vaikuttavan lääkeaineen referenssin välilaimennosta, 2,5 ml epäpuhtauden 1 kantaliuosta ja 0,5 ml epäpuhtauden 2 kantaliuosta. Näytteet suodatettiin 0,45 µm ruiskusuodattimen läpi.

Häiriöalttiuden validoinnissa testattiin myös liuosten säilyvyyttä. Näytteitä ja standardeja säilytettiin huoneenlämmössä (+23°C) ja ne mitattiin tuoreita taulukon 2 mukaan valmistettuja standardeja vasten 24, 48 ja 72 tunnin jälkeen valmistuksesta. Säilyvyyden testaamisessa käytettiin toistettavuuden yhteydessä valmistettuja näytteitä ja standardeja, joiden valmistus on esitetty alaluvussa 4.2.6.

4.2.3 Lineaarisuuden validointi

Lineaarisuuden validoinnissa valmistettiin kolme kantaliuosta, joista jokaisesta valmistettiin viisi standardia taulukon 2 mukaan. Standardit suodatettiin 0,45 µm ruiskusuodattimen läpi. Standardeista tehtiin yksi standardisuora. Excelin regressioanalyysin avulla määritettiin suoran korrelaatiokerroin, kulmakerroin, y-akselin leikkauspiste, leikkauspisteen luottamusväli (95 %) sekä y-akselin leikkauspisteen suhde 100 % pitoisuustason standardien pinta-alojen keskiarvoon. Tuloksiin laskettiin myös standardien pinta-alojen suhde todellisiin pitoisuuksiin ja suhteiden poikkeamat kulmakertoimesta prosentteina.

4.2.4 Oikeellisuuden validointi

Oikeellisuus määritettiin näytteillä, joihin punnittiin vaikuttavan lääkeaineen referenssiä pitoisuustasoille 50 %, 100 % ja 150 %. Lisäksi näytteisiin punnittiin plaseboa, eli lääkevalmisteen muuta massaa ilman vaikuttavaa ainetta. Jokaiselle pitoisuustasolle valmistettiin kolme rinnakkaista näytettä. Lisäksi valmistettiin yksi näyte, jossa oli pelkkää plaseboa. Taulukossa 4 on esitetty vaikuttavan lääkeaineen referenssin sekä plasebon punnitusmäärät jokaiselle pitoisuustasolle.

TAULUKKO 4. Oikeellisuusnäytteet

Konsentraatiotaso	Vaikuttavan lääkeaineen referenssi (mg)	Plasebo (mg)
0 %	0	154
50 %	100	154
100 %	200	154
150 %	300	154

Vaikuttavan lääkeaineen referenssi sekä plasebo liuotettiin ja laimennettiin 50 ml mittapulloihin vedellä. Näytteet valmistettiin pipetoimalla 1 ml liuosta ja laimentamalla 100 ml:ksi vedellä. Näytteet mitattiin standardeja vasten, joiden valmistus on esitetty taulukossa 2. Näytteet ja standardit suodatettiin 0,45 µm ruiskusuodattimen läpi.

4.2.5 Spesifisyyden validointi

Spesifisyyden validoinnissa valmistettiin vaikuttavan lääkeaineen referenssistä sekä lääkevalmisteesta näytteet, joihin lisättiin kahta lääkeaineen tunnettua epäpuhtautta. Näytteiden valmistuksessa käytettiin häiriöalttiuden validoinnin yhteydessä valmistettuja epäpuhtauksien kantaliuoksia.

Vaikuttavan lääkeaineen referenssiä punnittiin tarkasti noin 100 mg ja liuotettiin ja laimennettiin 100 ml:ksi vedellä. Kantaliuoksesta valmistettiin välilaimennos 50 ml mittapulloon, johon pipetoitiin 5 ml kantaliuosta ja täytettiin merkkiin vedellä. Näyte valmistettiin 5 ml mittapulloon, johon pipetoitiin vaikuttavan lääkeaineen välilaimennosta 2 ml, epäpuhtauden 1 kantaliuosta 2,5 ml ja epäpuhtauden 2 kantaliuosta 0,5 ml.

Lääkevalmisteesta valmistettiin liuos 500 ml mittapulloon liuottamalla 10 tablettia veteen. Mittapullo täytettiin merkkiin vedellä. Liuosta pipetoitiin 5 ml ja laimennettiin 50 ml:ksi vedellä. Näyte valmistettiin 5 ml mittapulloon, johon pipetoitiin 0,5 ml välilaimennosta, 2,5 ml epäpuhtauden 1 kantaliuosta ja 0,5 ml epäpuhtauden 2 kantaliuosta. Mittapullo täytettiin merkkiin vedellä. Näytteet suodatettiin 0,45 µm ruiskusuodattimen läpi.

Näytteet analysoitiin menetelmän ajoparametreilla ja kromatogrammeja tarkasteltiin silmämääräisesti, ettei epäpuhtauksien piikit häiritse vaikuttavan lääkeaineen piikin kvantitontia. Jos epäpuhtaudet olisivat lähellä vaikuttavan lääkeaineen piikkiä, piikkien erotteluaste tulisi määrittää.

Vaikuttavaa lääkeainetta koitettiin hajottaa UV-valossa, korkeassa lämpötilassa sekä happamissa, emäksisissä ja hapettavissa olosuhteissa. Näytteinä käytettiin lääkevalmistetta sekä vaikuttavan lääkeaineen referenssiä.

Happamille, emäksisille ja hapettaville olosuhteille valmistettiin omat näytteet lääkevalmisteesta ja vaikuttavan aineen referenssistä. Näytteet valmistettiin 100 ml mittapulloihin. Lääkevalmisteen näytteet valmistettiin liuottamalla yksi tabletti 50 ml:aan vettä. Liuosta pipetoitiin näytteisiin 1 ml. Vaikuttavan lääkeaineen referenssiä punnittiin tarkasti noin 100 mg, joka liuotettiin 100 ml:ksi vedellä. Kantaliuosta pipetoitiin näytteisiin 4 ml. Näytteisiin pipetoitiin alla olevan taulukon 5 mukaisesti muita reagensseja tietyn olosuhteen aikaansaamiseksi.

TAULUKKO 5. Reagenssit happamiin, emäksisiin ja hapettaviin olosuhteisiin

Olosuhde	Pipetoitava reagenssi	Pipetoitava tilavuus (ml)
Hapan	5 M suolahappo	2
Emäksinen	5 M natriumkloridi	2
Hapettava	30 % vetyperoksidi	2

Ennen varsinaista validointia suoritettiin esivalidointi, jossa näytettä koitettiin hajottaa laimeammilla 1 M suolahapolla ja 1 M natriumkloridilla. Vaikuttava lääkeaine ei kuitenkaan hajonnut, joten validoinnissa käytettiin väkevämpiä reagensseja.

Näytteet laitettiin lämpökaappiin noin 70 °C neljäksi tunniksi. Lämmityksen jälkeen mittapullot täytettiin merkkiin vedellä.

Korkean lämpötilan vaikutusta testattiin laittamalla jauhettu tabletti sekä vaikuttavan lääkeaineen referenssiä upokkaissa lämpökaappiin noin 70 °C neljäksi tunniksi. Tämän jälkeen tabletin jauheseos liuotettiin ja laimennettiin 50 ml:ksi vedellä. Liuosta pipetoitiin 1 ml ja laimennettiin 100 ml:ksi vedellä. Vaikuttavan lääkeaineen referenssiä punnittiin tarkasti noin 25 mg, joka liuotettiin ja laimennettiin 25 ml:ksi vedellä. Liuosta pipetoitiin 2 ml ja laimennettiin 50 ml:ksi vedellä.

UV-valon alle laitettiin jauhettu tabletti sekä vaikuttavan lääkeaineen referenssiä kahdeksi tunniksi. Jauhettu tabletti liuotettiin ja laimennettiin 50 ml:ksi vedellä. Liuosta pipetoitiin 1 ml ja laimennettiin 100 ml:ksi vedellä. Vaikuttavan lääkeaineen referenssiä punnittiin tarkasti noin 100 mg, joka liuotettiin ja laimennettiin 100 ml:ksi vedellä. Liuosta pipetoitiin 4 ml ja laimennettiin 100 ml:ksi vedellä.

Standardi valmistettiin punnitsemalla tarkasti noin 25 mg vaikuttavan lääkeaineen referenssiä, joka liuotettiin ja laimennettiin 25 ml:ksi vedellä. Liuosta pipetoitiin 4 ml ja laimennettiin 100 ml:ksi vedellä. Kaikki näytteet sekä standardi suodatettiin 0,45 µm suodattimen läpi. Standardi injektoidiin kahteen kertaan, joiden keskiarvoa käytettiin näytteiden pitoisuusprosenttien määrittämisessä. Näytteille laskettiin massatasapaino sekä vaikuttavan lääkeaineen piikin puhtaus määritettiin purity angle ja purity treshold -arvojen avulla.

4.2.6 Toistettavuuden validointi

Toistettavuuden validoinnissa valmistettiin standardit taulukon 2 mukaisesti. Näyte valmistettiin punnitsemalla 10 tablettia 500 ml mittapulloon. Tabletit liuotettiin veteen pitämällä näytettä tasoravistelijassa 20 minuuttia tai kunnes tabletit olivat lienneet. Mittapullo täytettiin merkkiin vedellä. Näyteliuoksesta pipetoitiin 1 ml ja laimennettiin 100 ml:ksi vedellä. Näyte suodatettiin 0,45 µm suodattimen läpi. Näytteitä valmistettiin kuusi rinnakkaista. Näytteet mitattiin standardeja vasten ja tuloksista laskettiin keskiarvo, keskihajonta sekä suhteellinen keskihajonta.

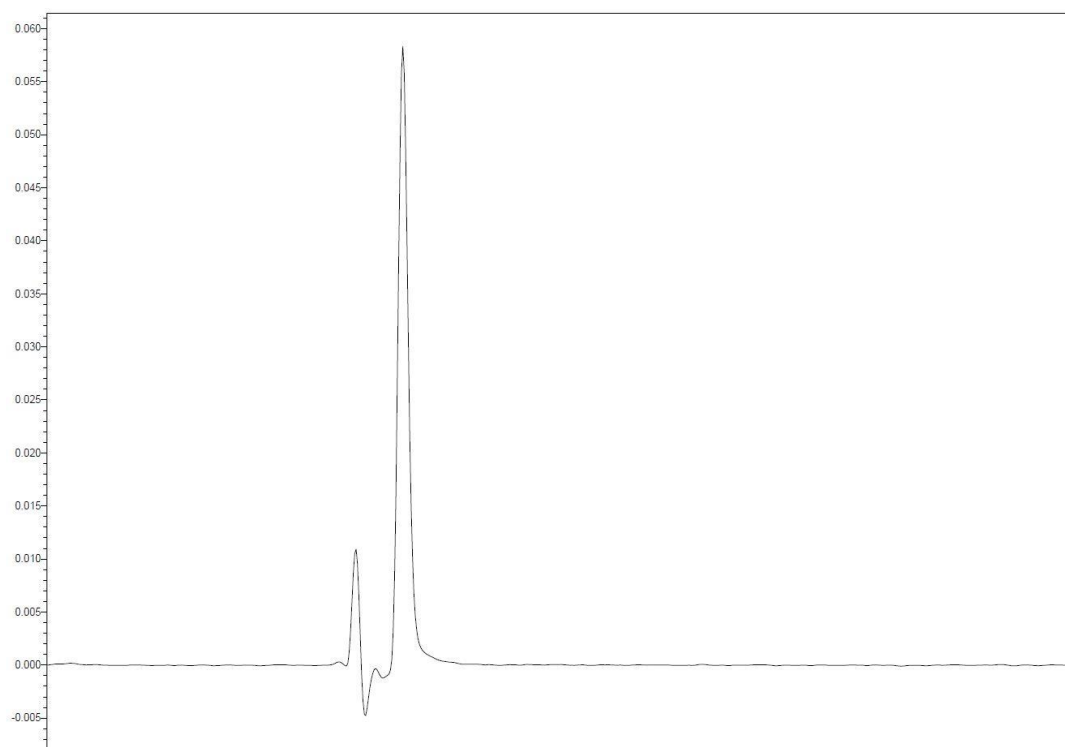
4.2.7 Uusittavuuden validointi

Uusittavuuden validoinnissa käytettiin toistettavuuden validoinnin tuloksia. Toistettavuus suoritettiin uudestaan kahtena päivänä, joista toisena suorittaja, laite ja kolonni olivat samat ja toisena vaihdettiin analyysin suorittajaa, laitetta sekä kolonnia. Kaikista tuloksista laskettiin keskiarvo, keskihajonta sekä suhteellinen keskihajonta.

5 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO

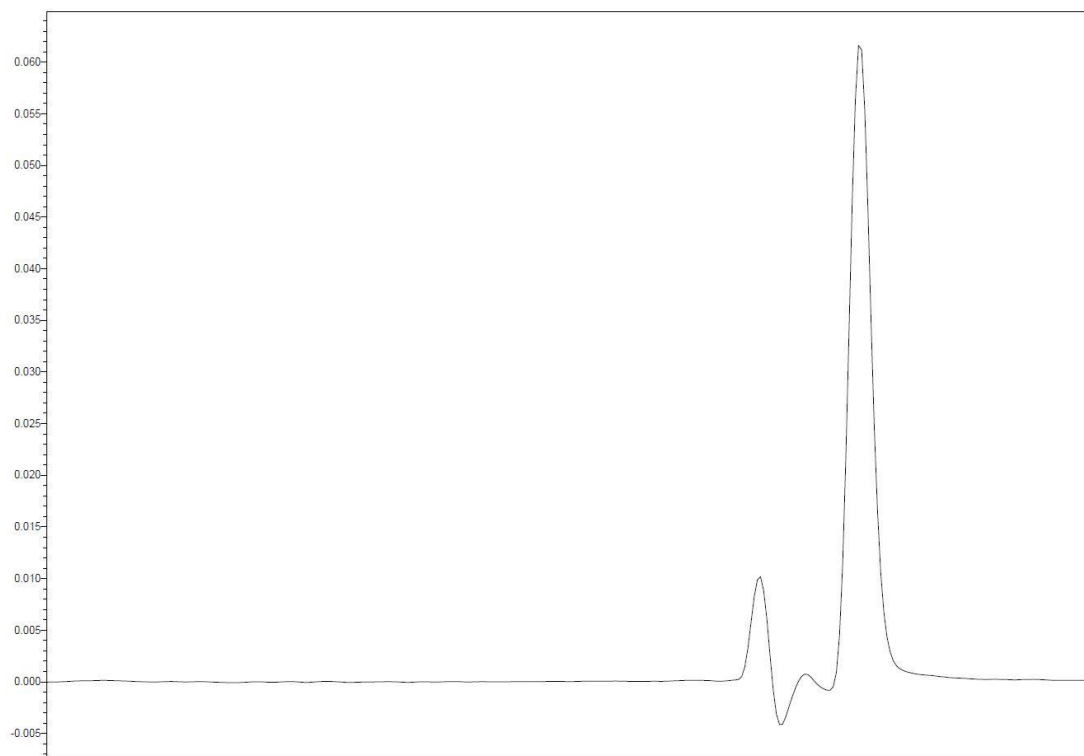
5.1 Menetelmäkehityksen tulokset

Veteen laimennetun standardin kromatogrammi on esitetty kuviossa 2.



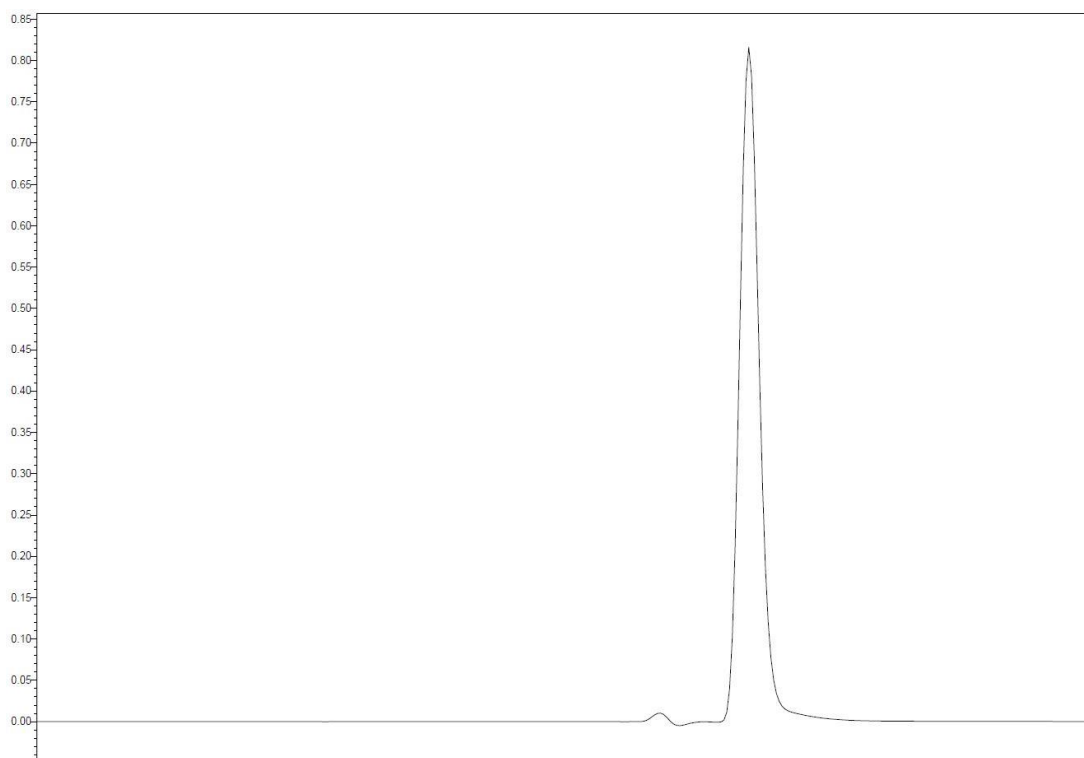
KUVIO 2. Veteen laimennettu standardi

Kromatogrammista nähtiin, ettei vaikuttavan lääkeaineen piikki ollut erottunut tarpeeksi hyvin kromatogrammin alussa olevista muista piikeistä. Häiritsevien piikkien ajateltiin johtuvan siitä, että näyteliuotin oli eri kuin ajoliuos, joten häiritseviä piikkejä koitettiin poistaa laimentamalla standardi fosfaattipuskuriin aikaisemmasta veteen valmistetusta kantaliuoksesta. Fosfaattipuskuriin laimennetun standardin kromatogrammi on esitetty kuviossa 3.



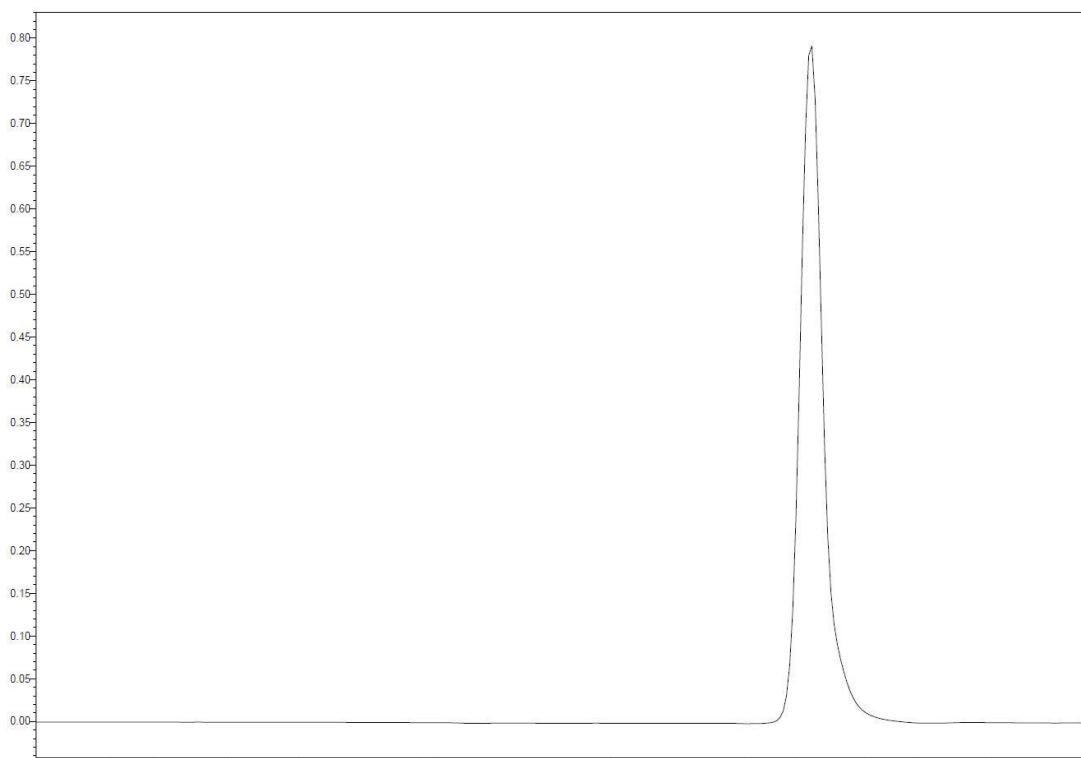
KUVIO 3. Fosfaattipuskuriin laimennettu standardi

Vaikuttavan lääkeaineen piikkiä häiritsevät muut piikit eivät hävinneet standardin laimentamisella fosfaattipuskuriin. Mittausaallonpituutta muutettiin ja kromatogrammi mittausaallonpituudella 292 nm on esitetty kuviossa 4.



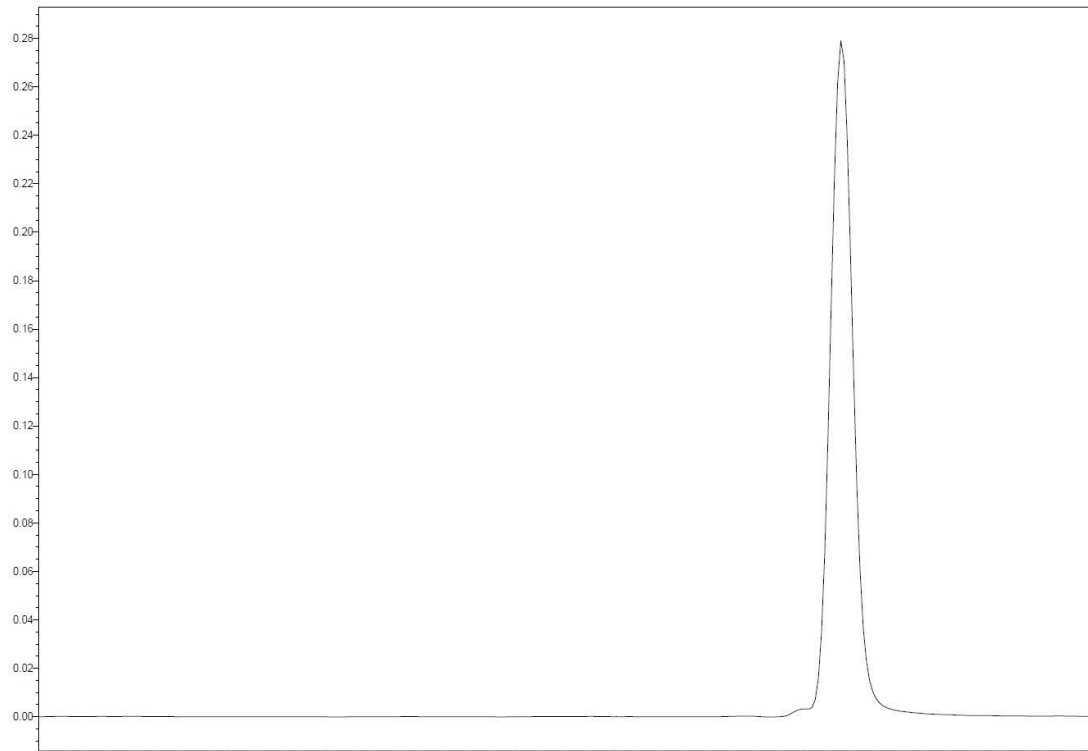
KUVIO 4. Mittausaallonpituus 292 nm

Vaikuttavan lääkeaineen piikkiä häiritsevät piikit pienenivät, mutta eivät hävinneet. Kokeiltiin, kuinka metanolin prosenttiosuuden nostaminen vaikuttaa häiritseviin piikkeihin. Kromatogrammi on esitetty kuviossa 5.



KUVIO 5. Metanolin suhde ajoliuoksessa 40 prosenttia

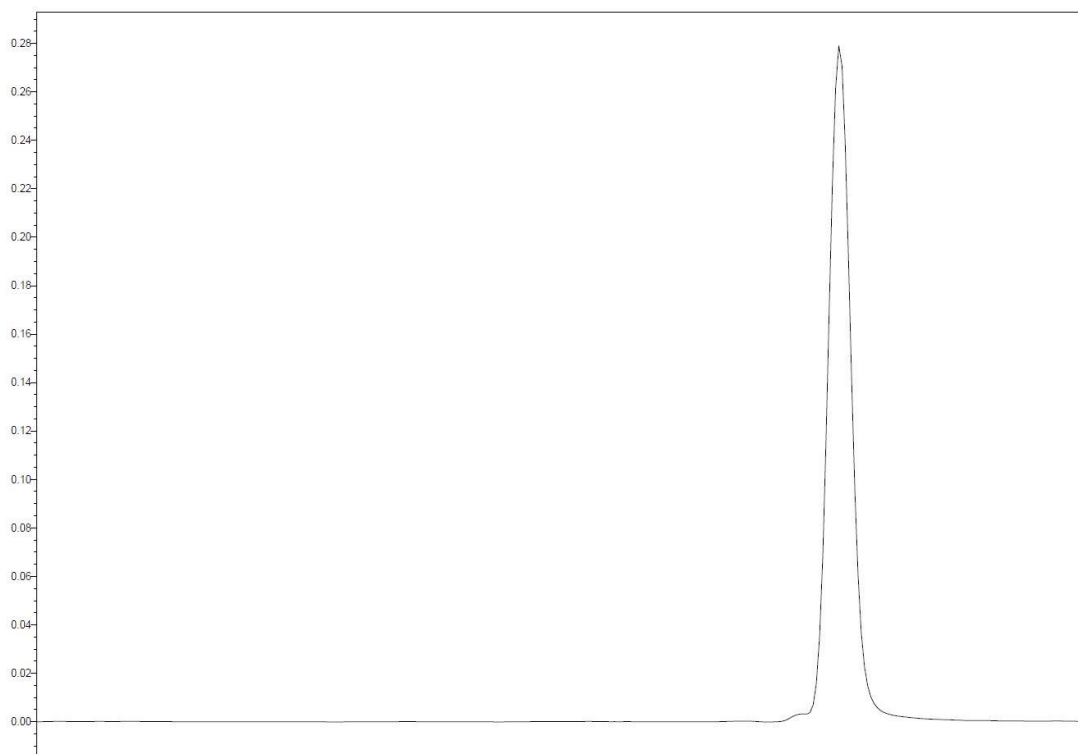
Häiritsevät piikit hävisivät vaikuttavan lääkeaineen piikin edestä, mutta piikki hänti paljon. Piikin muotoa koitettiin kaventaa ja häntimistä mahdollisesti vähentää injektio-tilavuuden pienentämisellä. Kuviossa 6 on esitetty kromatogrammi, jossa käytettiin 10 µl injektio-tilavuutta.



KUVIO 6. Injektio-tilavuus 10 μ l

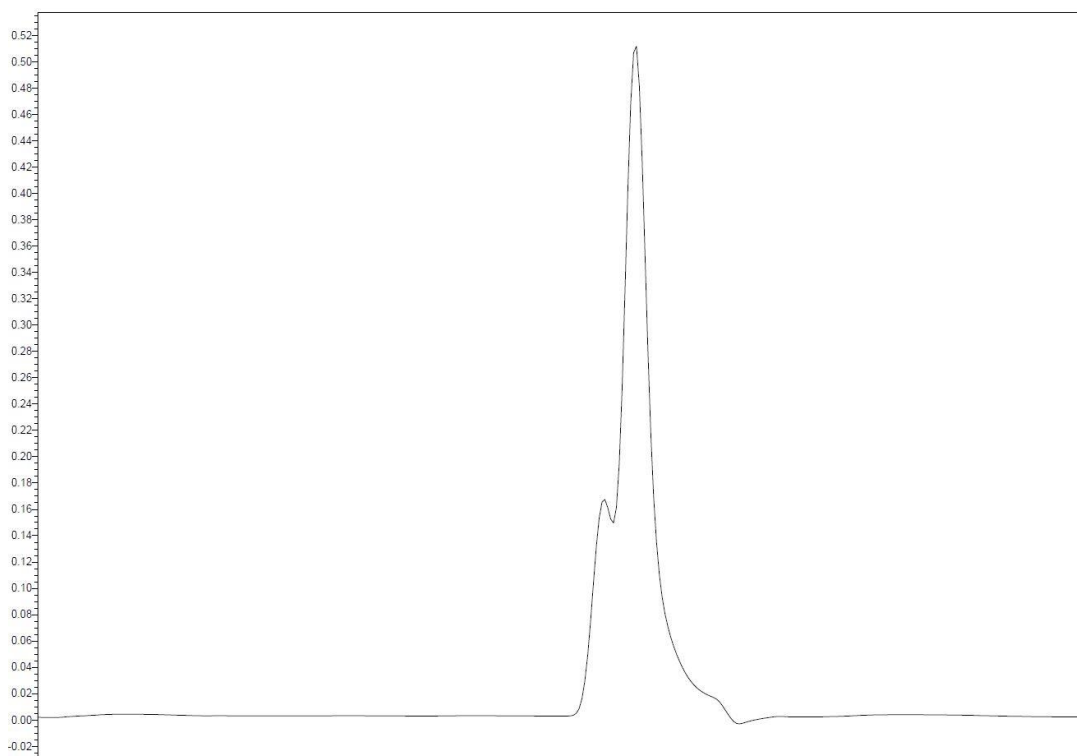
Kuvion 6 kromatogrammissa piikki kaventui ja oli riittävän symmetrinen, mutta häiritsevät piikit ilmestyivät takaisin vaikuttavan lääkeaineen piikin eteen. Voitiin olettaa, että häiritsevät piikit jäivät vaikuttavan lääkeaineen piikin alle metanolin suhteen nostamisen vaikutuksesta, koska suurempi metanolin pitoisuus lyhensi vaikuttavan lääkeaineen piikin retentioaikaa (Ahuja & Dong 2005, 25).

Häiritsevien piikkien käyttäytymistä haluttiin testata vielä tekemällä kantaliuos ja standardin laimennos täysin samanlaiseksi fosfaattipuskurin ja metanolin seokseen suhteessa 70:30 kanssa. Kromatogrammi on esitetty kuviossa 7.



KUVIO 7. Kantaliuos ja standardi laimennettu fosfaattipuskurin ja metanolin seokseen suhteessa 70:30

Ajoliukseen laimennettu näyte ei poistanut häiritseviä piikkejä. Orgaanisen liuottimen valinta vaikuttaa menetelmän selektiivisyyteen (Ahuja & Dong 2005, 35), joten metanolin sijaan ajoliuksessa testattiin asetonitriiliä. Kromatogrammi on esitetty kuviossa 8.



KUVIO 8. Ajoliuksena fosfaattipuskuri ja asetontriili suhteessa 70:30

Asetontriili ei toiminut orgaanisena liuottimena ja vaikuttavan lääkeaineen piikin muoto huononi huomattavasti. Piikkiin ilmestyi olkapää ja piikin takarintama muuttui epätasaiseksi, joten asetontriilin käyttö orgaanisena liuottimena hylättiin.

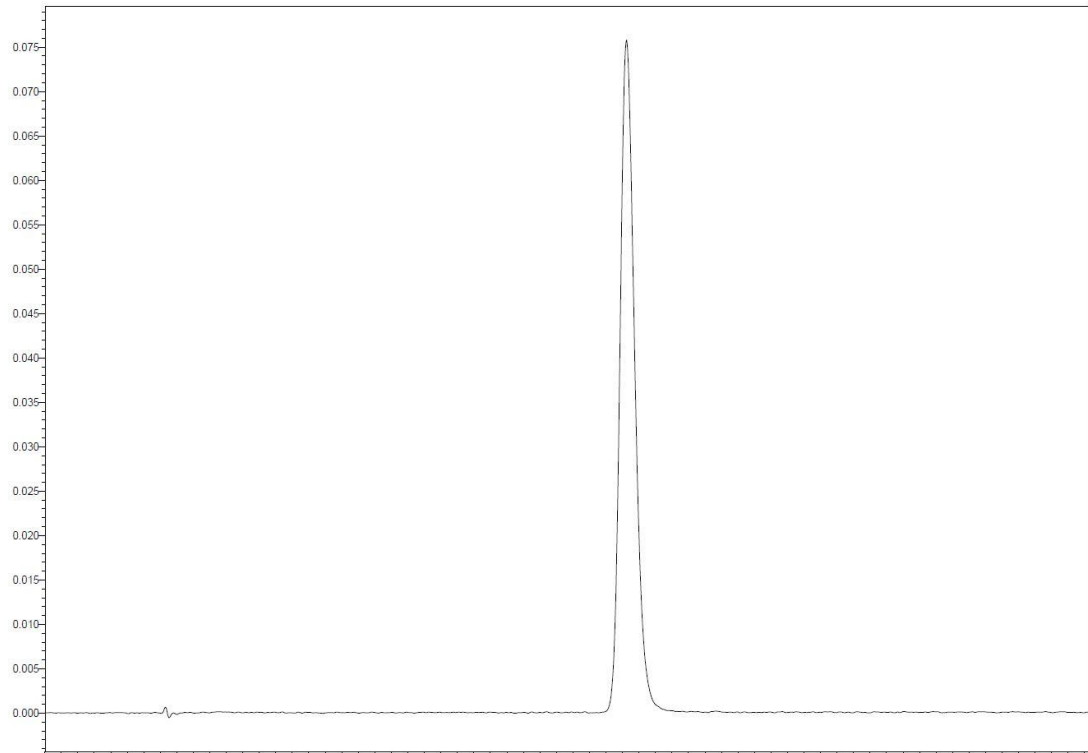
Koska häiritseviä piikeistä ei päästy eroon, koitettiin niiden ja vaikuttavan lääkeaineen piikin erottumista parantaa. Kokeiltiin käyttää 250 mm x 4,5 mm kokoista kolonnia, jonka partikkelikoko oli 5 μm . Kromatogrammi on esitetty kuviossa 9.



KUVIO 9. 25 cm pitkä kolonni

Vaikuttavan lääkeaineen piikin muoto oli hyvä pidemmällä kolonnilla. Piikin puhtautta tarkasteltiin Empower-ohjelmiston avulla ja piikki luokiteltiin puhtaaksi, joten piikin kvantitointi olisi mahdollista. Pidemmän kolonnin käyttäminen saattoi kuitenkin aiheuttaa vaikeuksia osalla laboratorion HPLC-laitteilla pienten kolonniuunien takia, joten pidemmän kolonnin käyttö hylättiin ja menetelmäkehitystä jatkettiin 15 cm kolonnilla.

Lyhyellä kolonnilla ja orgaanista liuotinta sisältävällä ajoliuoksella vaikuttavan lääkeaineen piikin retentioaika oli liian lähellä muita piikkejä. Vaihtoehtoina oli vähentää metanolin suhdetta ajoliuoksessa tai kokeilla ajoliuoksena pelkkää fosfaattipuskuria, joten päädyttiin testaamaan ensin pelkkää fosfaattipuskuria ja tarvittaessa lisättäisiin metanolia. Kromatogrammi on esitetty kuviossa 10.



KUVIO 10. Ajoliuksena fosfaattipuskuri

Vaikuttavan lääkeaineen piikistä tuli silmämääräisesti hyvän muotoinen, eikä sen ympärillä ollut häiritseviä piikkejä. Häiritsevät piikit näkyvät kromatogrammin alussa. Koska HPLC-laitteen pumpun paineet olivat alhaiset käyttäessä ajoliuksena pelkkää fosfaattipuskuria, virtausnopeutta nostettiin. Retentioajan oletettiin lyhenevän nostamalla virtausnopeutta (Kazakevich & LoBrutto 2007, 15). Kromatogrammi on esitetty kuviossa 11.



KUVIO 11. Suurempi virtausnopeus

Retentioaika saatiin lyhennettyä nostamalla virtausnopeutta, eikä metanolia tarvittu lisätä ajoliuokseen. Piikki leveni hieman alhaisempaan virtausnopeuteen verrattuna, mutta muoto on riittävän hyvä pitoisuusmenetelmään.

5.2 Validoinnin tulokset

Seuraavissa alaluvuissa on esitetty validoinnin tulokset. Taulukossa 6 on esitetty kootusti hyväksymiskriteerit eri validointiparametreille. Määritettävät validointiparametrit ja määrittäminen ovat ICH:n laatimia. Hyväksymiskriteerit ovat Vitabalans Oy:n määrittämiä, joita käytetään pitoisuusmenetelmien validoinnissa.

TAULUKKO 6. Validoinnin hyväksymiskriteerit

Validointiparametri	Hyväksymiskriteerit
Häiriöalttius	Muutettavat parametrit eivät saa vaikuttaa huomattavasti menetelmän suorituskykyyn, liuosten tulee säilyä vähintään 24 tuntia
Lineaarisuus	Korrelaatiokerroin $\geq 0,997$, y-akselin leikkauspiste kulkee leikkauspisteen 95 % luotettavuusalueella tai y-akselin leikkauspisteen suhde 100 % tason standardien pinta-alojen keskiarvoon ≤ 2 %, pinta-ala/konsentraatio -arvot eivät saa poiketa kulmakertoimesta yli 2 %
Oikeellisuus	Tasojen saantoprosenttien keskiarvo sekä kaikkien näytteiden saantoprosenttien keskiarvo 100 ± 2 %, %RSD $\leq 2,7$
Spesifisyys	Muut piikit eivät saa häiritä pääpiikin eluoitumista, massatasapaino 95–105 %, purity angle < purity treshold
Toistettavuus	%RSD $\leq 2,7$
Uusittavuus	%RSD $\leq 2,7$

5.2.1 Häiriöalttiuden tulokset

Pitoisuusmenetelmän validoinnissa keskityttiin vaikuttavan lääkeaineen piikin retentioajan, pinta-alan, ja häntimistekijän muutoksiin sekä vaikuttavan lääkeaineen ja lähimpänä olevan epäpuhtauden piikkien erotteluasteeseen. Taulukossa 7 on esitetty menetelmän parametreilla saadut arvot vaikuttavan lääkeaineen piikin pinta-alalle ja häntimistekijälle sekä vaikuttavan lääkeaineen ja lähimpänä eluoituvan epäpuhtauden erotteluasteelle. Retentioaikaa ei ole esitetty taulukossa, ettei vaikuttavaa lääkeainetta voida tunnistaa sen perusteella.

TAULUKKO 7. Vaikuttavan lääkeaineen piikin pinta-ala, häntimistekijä sekä vaikuttavan lääkeaineen ja lähimpänä eluoituvan epäpuhtauden piikkien välinen erotteluaste

Pinta-ala ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Häntimistekijä	Vaikuttavan lääkeaineen ja epäpuhtauden erotteluaste
640094	1,2	10,1

Häntimistekijän arvosta voidaan päätellä, että vaikuttavan lääkeaineen piikki häntii hieman arvon ollessa >1 , mutta osuu tähdätyyn arvoväliin 0,9–1,4 (Ahuja & Dong 2005, 29–30). Vaikuttavan lääkeaineen ja epäpuhtauden piikin välinen erotteluaste on $>1,5$, joten erottuminen tapahtuu täydellisesti pohjaviivan kautta (Ahuja & Dong 2005, 28–29).

Ajoliuoksen pH:n, kolonnin lämpötilan, mittausaallonpituuden sekä virtausnopeuden muutosten vaikutukset on esitetty taulukoissa 8–11. Vaikutukset on esitetty taulukoissa prosentuaalisina muutoksina verrattuna taulukon 7 arvoihin.

TAULUKKO 8. Ajoliuoksen pH:n muutosten vaikutukset

Muutos	Retentioaika	Pinta-ala	Häntimistekijä	Vaikuttavan lääkeaineen ja epäpuhtauden erotteluaste
pH -0,2	-6 %	+1 %	0 %	-2 %
pH +0,2	-3 %	-1 %	0 %	0 %

Ajoliuoksen pH:n muuttaminen $\pm 0,2$ pH-yksikköä ei vaikuttanut tutkittaviin piikin ominaisuuksiin. Suurin vaikutus sillä oli retentioaikaan, mikä sekin oli vähäinen. Voidaan todeta, ettei ajoliuoksen pH:n muuttaminen $\pm 0,2$ pH-yksikköä vaikuta menetelmän suorituskykyyn.

TAULUKKO 9. Kolonnin lämpötilan muutosten vaikutukset

Muutos	Retentioaika	Pinta-ala	Häntimistekijä	Vaikuttavan lääkeaineen ja epäpuhtauden erotteluaste
-2 °C	+1 %	0 %	+2 %	+2 %
+2 °C	-6 %	-1 %	0 %	0 %

Kolonnin lämpötilan muuttaminen ± 2 °C ei vaikuttanut huomattavasti tutkittaviin piikin ominaisuuksiin. Voidaan todeta, ettei kolonnin lämpötilan muuttaminen ± 2 °C vaikuta menetelmän suorituskykyyn.

TAULUKKO 10. Mittausaallonpituuden muutosten vaikutukset

Muutos	Retentioaika	Pinta-ala	Häntimistekijä	Vaikuttavan lääkeaineen ja epäpuhtauden erotteluaste
-2 nm	-2 %	-3 %	+1 %	0 %
+2 nm	-2 %	0 %	-1 %	0 %

Mittausaallonpituuden muuttaminen ± 2 nm ei vaikuttanut huomattavasti tutkittaviin piikin ominaisuuksiin. Voidaan todeta, ettei mittausaallonpituuden muuttaminen ± 2 nm vaikuta menetelmän suorituskykyyn.

TAULUKKO 11. Virtausnopeuden muutosten vaikutukset

Muutos	Retentioaika	Pinta-ala	Häntimistekijä	Vaikuttavan lääkeaineen ja epäpuhtauden erotteluaste
-0,2 ml/min	+14 %	+15 %	+1 %	+4 %
+0,2 ml/min	-13 %	-12 %	-2 %	-4 %

Virtausnopeuden muutoksella oli suurin vaikutus piikkien ominaisuuksiin. Virtausnopeuden muuttaminen tyypillisesti muuttaa retentioaikaa, kuten tässäkin tapauksessa. Retentioaika lyheni nostaessa ja piteni laskiessa virtausnopeutta (Kazakevich & LoBrutto 2007, 15). Pinta-ala kasvoi laskemalla ja pieneni nostamalla virtausnopeutta. Muutokset olivat kuitenkin vain noin $\pm 15\%$, joten ne olivat hyväksyttävällä tasolla.

Piikin pinta-ala on riippuvainen virtausnopeudesta käyttäessä UV-detektoria, ja se muuttuu samassa suhteessa virtausnopeuden käänteislukuun. Tämä perustuu aikaan, jossa analyyttiin absorboituu säteilyä. Aika määräytyy analyytin kulkeman valotien pituuden ja nopeuden mukaan. Jos virtausnopeutta lasketaan, nopeus valotien läpi pienenee ja analyytillä on enemmän aikaa absorboida, jolloin pinta-ala kasvaa. (Stoll 2019.) Häntimistekijään tai vaikuttavan lääkeaineen ja epäpuhtauden piikkien väliseen erotteluasteeseen virtausnopeudella ei juurikaan ollut vaikutusta, joten voidaan todeta, ettei virtausnopeuden muuttaminen $\pm 0,2$ ml/min vaikuta menetelmän suorituskykyyn.

Standardien säilyvyyksien tulokset huoneenlämmössä on esitetty taulukossa 12. Standardien pitoisuudet analysoitiin 24, 48 ja 72 tunnin säilytyksen jälkeen.

TAULUKKO 12. Standardien säilyvyyden tulokset

Std	0 h	24 h	48 h	72 h
1	20,0	20,2	19,9	20,1
2	31,8	31,4	31,5	31,4
3	40,6	40,5	40,9	40,3
4	50,0	50,0	50,4	49,6
5	63,6	63,1	63,7	62,6

Standardien pitoisuudet pysyivät lähes samana 72 tunnin ajan. Taulukkoon 13 on laskettu tulosten perusteella saantoprosentit standardeille 24, 48 ja 72 tunnin säilytyksen jälkeen. Saantoprosenteille on laskettu keskiarvot, keskihajonnat sekä suhteelliset keskihajonnat.

TAULUKKO 13. Standardien säilyvyyden saantoprosentit

Standardi	24 h saanto-%	48 h saanto-%	72 h saanto-%
1	101,1	99,5	100,2
2	98,8	99,1	98,8
3	99,6	100,6	99,1
4	100,0	100,7	99,2
5	99,2	100,2	98,4
Keskiarvo	99,7	100,0	99,1
Keskihajonta	0,9	0,7	0,7
%RSD	0,9	0,7	0,7

Standardien säilyvyyden saantoprosentit täyttävät hyväksymiskriteerin ($100\pm 2\%$) jopa 72 tunnin jälkeen. Tulosten perusteella voidaan todeta, että standardit säilyvät 72 tunnin ajan huoneenlämmössä.

Taulukossa 14 on esitetty näytteiden säilyvyyksien mittaustulokset 0, 24, 48 ja 72 tunnin säilytyksen jälkeen. Jokaisen säilytysajan tuloksista on laskettu keskiarvot, keskihajonnat sekä suhteelliset keskihajonnat.

TAULUKKO 14. Näytteiden säilyvyyden tulokset

Näyte	0 h	24 h	48 h	72 h
1	202,8	200,6	201,9	199,0
2	202,6	201,7	201,3	197,8
3	202,4	202,0	200,5	198,0
4	201,5	200,5	201,0	198,3
5	200,4	199,1	200,3	197,9
6	202,4	201,4	202,0	199,6
Keskiarvo	202,1	200,9	201,2	199,6
Keskihajonta	0,9	1,1	0,7	0,7
%RSD	0,4	0,5	0,4	0,4

Näytteiden osalta huomataan pitoisuuksien alenneen hieman 72 tunnin säilytyksen jälkeen verrattuna heti näytteiden valmistamisen jälkeen tehtyihin mittauksiin. Taulukkoon 15 on laskettu näytteiden tuloksista saantoprosentit 24,

48 ja 72 tunnin säilytyksen jälkeen. Saantoprosenteille on laskettu niiden keskiarvot, keskihajonnat sekä suhteelliset keskihajonnat.

TAULUKKO 15. Näytteiden säilyvyyden saantoprosentit

Näyte	24 h saanto-%	48 h saanto-%	72 h saanto-%
1	98,9	99,6	98,1
2	99,5	99,3	97,6
3	99,8	99,1	97,8
4	99,5	99,7	98,4
5	99,3	99,9	98,7
6	99,5	99,8	98,6
Keskiarvo	99,4	99,6	98,2
Keskihajonta	0,3	0,3	0,5
%RSD	0,3	0,3	0,5

Näytteiden säilyvyyden saantoprosentit täyttävät hyväksymiskriteerin (100 ± 2 %) jopa 72 tunnin jälkeen. Tulosten perusteella voidaan todeta, että näytteet säilyvät 72 tunnin ajan huoneenlämmössä.

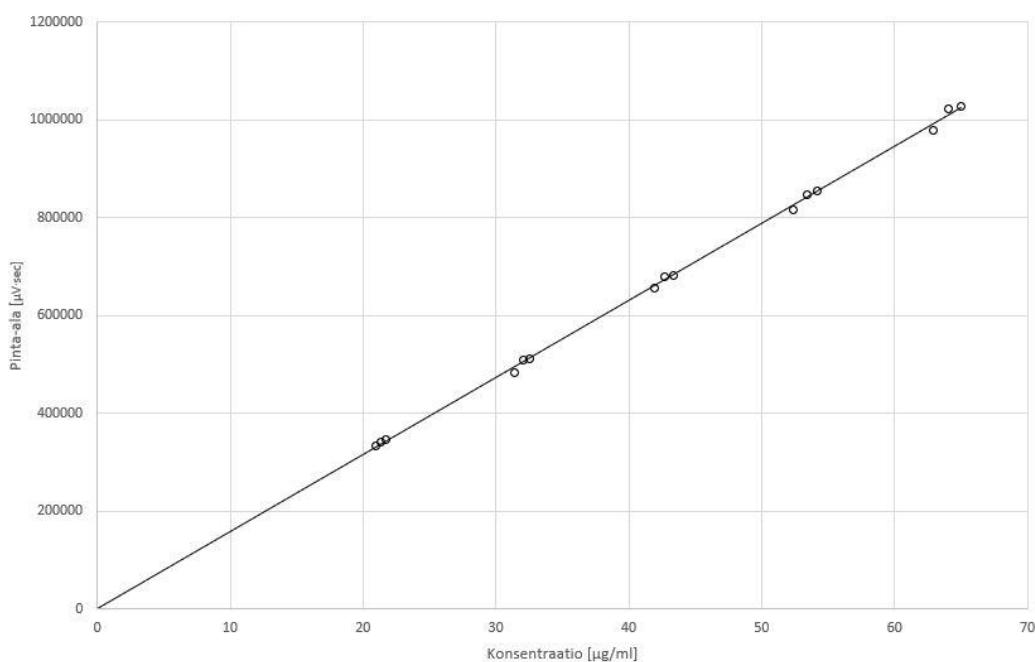
5.2.2 Lineaarisuuden tulokset

Taulukkoon 16 on kerätty jokaisesta kantaliuoksesta valmistettujen standardien teoreettiset ja todelliset pitoisuudet. Todelliset pitoisuudet on laskettu kantaliuoksiin punnitun vaikuttavan lääkeaineen referenssin mukaan. Taulukossa 16 on HPLC-laitteen antamat pinta-alat jokaiselle standardille ja lasketut arvot standardien pinta-alan suhteesta todelliseen pitoisuuteen. Laskettuja arvoja on verrattu standardisuoran kulmakertoimeen, joka löytyy taulukosta 17.

TAULUKKO 16. Linearisuuden tulokset

Taso	Teoreettinen pitoisuus (µg/ml)	Todellinen pitoisuus (µg/ml)	Pinta-ala (µV·s)	Pinta-ala/pitoisuus	Poikkeama kk:sta (%)
50 %	20	21,68	345727	15947	1,3
		20,96	333158	15895	1,0
		21,36	342473	16033	1,9
75 %	30	32,52	511185	15719	-0,1
		31,44	482829	15357	-2,4
		32,04	508310	15865	0,8
100 %	40	43,36	681862	15726	-0,1
		41,92	655940	15647	-0,6
		42,72	679494	15906	1,1
125 %	50	54,20	854195	15760	0,1
		52,40	817087	15593	-0,9
		53,40	847206	15865	0,8
150 %	60	65,04	1028655	15816	0,5
		62,88	979058	15570	-1,1
		64,08	1021766	15945	1,3

Standardien pinta-alojen suhde todelliseen pitoisuuteen saa poiketa standardisuoran kulmakertoimesta ± 2 %, joten kaikki tulokset täyttävät hyväksymiskriteerin. Kuviossa 12 on esitetty standardisuora taulukon 16 tuloksista.



KUVIO 12. Standardisuora kaikista lineaarisuuden validoinnin standardeista

Taulukkoon 17 on kerätty Excelin regressioanalyysistä standardisuoran kulmakerroin, y-akselin leikkauspiste sekä y-akselin leikkauspisteen luottamusväli (95 %). Taulukkoon on myös laskettu y-akselin leikkauspisteen suhde 100 % tason standardien pinta-alojen keskiarvoon.

TAULUKKO 17. Lineaarisuuden parametrien tulokset

Parametri	Tulos
Korrelaatiokerroin	0,9992
Kulmakerroin	15737
y-akselin leikkauspiste	1151
y-akselin leikkauspisteen luottamusväli (95 %)	-11094–13397
y-akselin leikkauspisteen osuus 100 % tason standardien pinta-alojen keskiarvosta	0,2 %

Standardisuoran korrelaatiokerroin on erinomainen ja täyttää hyväksymiskriteerin $\geq 0,997$. Korrelaatiokerroin kuvaa kahden muuttujan välistä lineaarisen suhteen vahvuutta (Correlation Coefficient n.d.). Y-akselin

leikkauspiste kulkee luottamusvälin 95 % alueella ja y-akselin leikkauspisteen osuus 100 % tason standardien pinta-alojen keskiarvoon on 0,2 %, joka täyttää hyväksymiskriteerin ≤ 2 %. Näin ollen voidaan todeta, että menetelmä on lineaarinen.

5.2.3 Oikeellisuuden tulokset

Taulukkoon 18 on kerätty oikeellisuusnäytteiden todelliset pitoisuudet, jotka on laskettu vaikuttavan lääkeaineen referenssin punnitustuloksesta sekä laitteen määrittämät pitoisuudet, jotka perustuvat piikkien pinta-aloihin. Taulukkoon on lisäksi laskettu laitteen määrittämien pitoisuuksien saantoprosentit verrattuna todellisiin pitoisuuksiin. Jokaiselle pitoisuustasolle on laskettu saantoprosenttien keskiarvot.

TAULUKKO 18. Oikeellisuuden tulokset

Taso	Todellinen pitoisuus (µg/ml)	Mitattu pitoisuus (µg/ml)	Saanto-%	Saanto-% keskiarvo
50 %	100,7	99,6	99,0	100,0
	100,0	100,6	100,6	
	99,3	99,8	100,5	
100 %	201,3	196,0	97,4	99,0
	200,3	197,8	98,8	
	201,2	202,9	100,8	
150 %	304,0	297,2	97,8	98,0
	304,3	296,1	97,3	
	300,3	296,7	98,8	

Jokaisen pitoisuustason saantoprosenttien keskiarvot täyttävät hyväksymiskriteerin 100 ± 2 %.

Taulukossa 19 on esitetty kaikkien mittaustulosten saantoprosenttien keskiarvo, jonka tulee olla 100 ± 2 %. Taulukkoon on myös laskettu saantoprosenttien keskihajonta, suhteellinen keskihajonta sekä luottamusväli (95 %).

TAULUKKO 19. Kaikkien oikeellisuusnäytteiden lasketut tulokset

Kaikkien saanto-% keskiarvo	99,0
Keskihajonta	1,4
%RSD	1,4
Luottamusväli (95 %)	98,1–99,9

Kaikkien tulosten saantoprosenttien keskiarvo täyttää hyväksymiskriteerin 100 ± 2 % sekä suhteellinen keskihajonta on $\leq 2,7$ %, joten menetelmä voidaan todeta oikeelliseksi.

5.2.4 Spesifisyyden tulokset

Spesifisyyden validoinnissa valmistettiin tablettinäytteestä ja vaikuttavan lääkeaineen referenssistä näytteet, joihin lisättiin kahta lääkeaineen tunnettua epäpuhtautta. Vaikuttavan lääkeaineen referenssin ja epäpuhtauksien kromatogrammi on esitetty liitteessä 1. Lääkevalmisteiden ja epäpuhtauksien kromatogrammi on esitetty liitteessä 2. Kromatogrammeista nähdään, että epäpuhtaudet eluoituvat eri aikaan kuin vaikuttava lääkeaine, joten voitiin todeta, etteivät epäpuhtaudet häiritse vaikuttavan lääkeaineen kvantitointia ja menetelmä on spesifinen.

Hajotuskokeiden näytteiden massatasapaino laskettiin piikkien pinta-alojen suhteesta verrattuna standardin pinta-alaan ja tulokset saatiin suoraan Empower-ohjelmistosta. Vaikuttavan lääkeaineen piikkien puhtaudet määritettiin purity angle ja purity treshold -arvojen avulla. Taulukossa 20 on esitetty näytteiden massatasapainojen tulokset sekä puhtausarvot hajotuskokeiden jälkeen.

TAULUKKO 20. Hajotuskokeiden massatasapainot ja puhtaudet

Näyte	Massatasapaino (%)	Purity angle / purity treshold
Lääkevalmiste, 5 M HCl	104	0,461 / 0,709
Lääkevalmiste, 5 M NaOH	101	9,298 / 19,562
Lääkevalmiste, 30 % H ₂ O ₂	102	0,636 / 0,831
Lääkevalmiste, UV-valo	99	0,551 / 0,736
Lääkevalmiste, lämmitetty	95	0,615 / 0,839
Referenssi, 5 M HCl	101	0,567 / 0,990
Referenssi, 5 M NaOH	101	3,489 / 8,153
Referenssi, 30 % H ₂ O ₂	98	0,646 / 1,106
Referenssi, UV-valo	101	0,661 / 1,025
Referenssi, lämmitetty	100	0,506 / 0,719

Vaikuttava lääkeaine ei hajonnut happamissa, emäksisissä tai hapettavissa olosuhteissa, eikä myöskään korkeassa lämpötilassa tai UV-valon vaikutuksesta. Koska vaikuttava lääkeaine ei hajonnut ankarissa olosuhteissa, se voidaan todeta hyvin stabiiliksi. Massatasapainon tulokset täyttävät kaikissa tapauksissa hyväksymiskriteerin 95–105 %. Kaikkien näytteiden purity angle on pienempi kuin purity treshold, joten vaikuttavan lääkeaineen piikit ovat puhtaita (Hotha ym. 2013, 81).

5.2.5 Toistettavuuden tulokset

Taulukossa 21 on esitetty laitteen määrittämät pitoisuudet toistettavuusnäytteille sekä niistä lasketut keskiarvo, keskihajonta sekä suhteellinen keskihajonta.

TAULUKKO 21. Toistettavuuden tulokset

Näyte	mg/tabl
1	202,5
2	202,3
3	202,1
4	201,2
5	200,2
6	202,1
Keskiarvo	201,7
Keskihajonta	0,9
%RSD	0,4

Tablettien pitoisuudet ovat hyvin lähellä toisiaan. Suhteellinen keskihajonta täyttää hyväksymiskriteerin $\leq 2,7$ %, joten menetelmä voidaan todeta toistettavaksi.

5.2.6 Uusittavuuden tulokset

Uusittavuuden määrittämisessä käytettiin toistettavuuden tuloksia taulukosta 21. Toistettavuus suoritettiin uusittavuuden validointia varten kaksi kertaa uudestaan ja tulokset on esitetty taulukoissa 22 ja 23. Taulukon 22 tulokset ovat määritetty saman suorittajan toimesta samalla laitteella ja kolonnilla. Mittaustuloksista on laskettu taulukkoon keskiarvo, keskihajonta sekä suhteellinen keskihajonta.

TAULUKKO 22. Uusittavuus, sama suorittaja, laite ja kolonni

Näyte	mg/tabl
1	199,7
2	199,3
3	200,9
4	199,9
5	201,5
6	201,3
Keskiarvo	200,4
Keskihajonta	0,9
%RSD	0,5

Tablettien pitoisuudet ovat lähellä toisiaan ja suhteellinen keskihajonta on 0,5 %. Taulukon 23 tulokset ovat toisen suorittajan määrittämät ja analyysissä käytettiin toista laitetta sekä kolonnia. Mittaustuloksista on laskettu taulukkoon keskiarvo, keskihajonta sekä suhteellinen keskihajonta.

TAULUKKO 23. Uusittavuus, eri suorittaja, laite ja kolonni

Näyte	mg/tabl
1	205,4
2	202,8
3	200,7
4	201,0
5	200,7
6	202,1
Keskiarvo	202,1
Keskihajonta	1,8
%RSD	0,9

Eri suorittajan tekemissä pitoisuusmittauksissa erot näytteiden välillä on pienet ja suhteellinen keskihajonta 0,9 %. Taulukkoon 24 on laskettu kaikkien taulukoiden 21–23 näytteiden pitoisuuksien keskiarvo, keskihajonta sekä suhteellinen keskihajonta.

TAULUKKO 24. Uusittavuuden tulokset

Keskiarvo	201,4
Keskihajonta	0,9
%RSD	0,4

Kaikkien mittaustulosten suhteellinen keskihajonta on todella hyvä 0,4 % ja täyttää hyväksymiskriteerin $\leq 2,7$ %, joten menetelmä voidaan todeta uusittavaksi.

6 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää lääkevalmisteen vaikuttavan aineen pitoisuusmenetelmä yrityksen nykyisiin tarpeisiin sopivaksi. Opinnäytetyössä onnistuttiin muuttamaan pitoisuusmenetelmä perustumaan piikkien pinta-alaan korkeuden sijasta ja ajoliuokseksi löydettiin yksinkertaisempi vaihtoehto, joka ei sisällä ioniparireagenssia. Uuden menetelmän ajoliuos valmistetaan kaliumdivetyfosfaatista sekä vedestä, joten sen valmistaminen on edullista ja nopeaa. Kun ajoliuos ei sisällä orgaanista liuotinta, se on ympäristöystävällinen, ei vaaranna työntekijöiden terveyttä ja minimoi työtaturmariskiä. Orgaaniset liuottimet ovat herkästi syttyviä yhdisteitä, joista osa voi aiheuttaa syöpää ja olla hermomyrkkijä. Orgaaniset liuottimet voivat aiheuttaa työntekijälle iho-oireita ja tulehduksia. (Organic Solvents n.d.)

Uuden pitoisuusmenetelmän ajoliuos sisältää kaliumdivetyfosfaatista valmistettua puskuria, jonka vuoksi kolonni tulee pestä huolellisesti vedellä ennen pesua orgaanisella liuottimella. Orgaaninen liuotin voi pahimmassa tapauksessa kiteyttää puskurin suoloja kolonniin ja tukkia sen (Diagnosing and Preventing High Back Pressure in LC Systems n.d.).

Uudessa pitoisuusmenetelmässä standardien ja näytteiden valmistustilavuuksia pienennettiin, mikä vähentää reagenssien kulutusta ja tekee menetelmästä taloudellisemman sekä ympäristöystävällisemmän. Vanhassa menetelmässä standardit ja näytteet laimennettiin veteen, mikä pystyttiin säilyttämään uudessa menetelmässä. Liuosten laimentaminen veteen nopeuttaa liuosten valmistusta, vähentää ympäristön kuormitusta ja sen käyttäminen on taloudellisempaa verrattuna muihin liuottimiin. Liuosten valmistaminen ilman orgaanisia liuottimia säästää myös jätekustannuksissa, koska analyysissä käytettäviä liuoksia ei tarvitse kerätä erikseen hävitettäväksi.

Uudella menetelmällä saatiin parannettua vaikuttavan lääkeaineen piikin häntimistekijää. Häntimistekijän arvo vanhassa menetelmässä oli 1,7, joten piikki hänti todella paljon, mikä vaikeutti piikin integrointia ja vaikuttavan lääkeaineen pitoisuuden kvantitointia. Uudella menetelmällä häntimistekijän arvo oli 1,2, joten

pitoisuuden kvantitointi oli paljon luotettavampaa. Jos piikki häntii voimakkaasti tai piikin eturintama on loiva, pohjaviivan peruskohina aiheuttaa piikin mittausvirhettä (Hinshaw 2009).

Menetelmäkehityksen osalta jatkotutkimusta voisi tehdä ajoliuoksen osalta. Nyt menetelmässä käytettiin fosfaattipuskuria, jonka pH säädettiin ortofosforihapolla. Ajoliuoksena voisi kokeilla ortofosforihaposta tehtyä vesiliuosta, jolloin ajoliuoksen tekovaiheessa säästettäisiin aikaa ja reagensseja. Hapon vesiliuos ajoliuoksena helpottaisi myös kolonnien puhdistusta, eikä puskurin suolat tukkisi kolonnia (Diagnosing and Preventing High Back Pressure in LC Systems n.d.).

Menetelmäkehityksen lisäksi opinnäytetyön tavoitteena oli validoida uusi kehitetty pitoisuusmenetelmä. Validoinnissa määritettiin häiriöalttius, lineaarisuus, oikeellisuus, spesifisyys, toistettavuus sekä uusittavuus. Kaikki validointiparametrit täyttivät hyväksymiskriteerit.

Validoinnissa määritettiin menetelmän suorituskyky muuttamalla ajoliuoksen pH:ta, kolonnin lämpötilaa, mittausaallonpituutta sekä virtausnopeutta. Mitkään muutetuista parametreistä eivät vaikuttaneet merkittävästi menetelmän suorituskykyyn. Suurin vaikutus oli virtausnopeuden muuttamisella vaikuttavan lääkeaineen piikin retentioaikaan, mutta vaikutukset olivat enintään $\pm 15\%$, joten ne olivat hyväksyttävällä tasolla. Häiriöalttiudessa määritettiin myös näytteiden ja standardien säilyvyyttä huoneenlämmössä mittaamalla ne tuoreita standardeja vasten 24, 48 ja 72 tunnin säilytyksen jälkeen. Näytteiden ja standardien todettiin säilyvän huoneenlämmössä 72 tunnin ajan saantoprosenttien ollessa $100 \pm 2\%$.

Validoinnissa todettiin menetelmän olevan lineaarinen. Korrelaatiokerroin oli erinomainen 0,9992 vaatimuksen ollessa 0,997. Y-akselin leikkauspiste kulki 95 % luottamusvälin alueella, y-akselin leikkauspisteen osuus 100 % tason standardien pinta-alojen keskiarvoon oli 0,2 % ja kaikkien mitattujen standardien pinta-alojen suhde todelliseen pitoisuuteen poikkesi kulmakertoimesta enintään 2 %.

Menetelmän spesifisyyden määrittämisessä vaikuttavaan lääkeaineeseen lisättiin sen kahta tunnettua epäpuhtautta ja tarkasteltiin niiden vaikutusta vaikuttavan lääkeaineen pitoisuuden kvantitointiin. Lähimpänä eluoituneen epäpuhtauden ja vaikuttavan lääkeaineen piikkien resoluutio oli 10,1, mikä tarkoittaa, etteivät epäpuhtaudet häiritse vaikuttavan lääkeaineen pitoisuuden määrittämistä (Ahuja & Dong 2005, 28–29).

Validoinnissa testattiin vaikuttavan lääkeaineen stabiilisuutta hajotuskokeilla, joissa vaikuttavaa lääkeainetta koitettiin tarkoituksenmukaisesti hajottaa happamissa, emäksisissä ja hapettavissa olosuhteissa sekä UV-valolla ja lämmöllä. Hajotuskokeiden tuloksista määritettiin piikin puhtaus purity angle ja pyrity treshold -arvoilla sekä laskettiin massatasapaino. Vaikuttava lääkeaine ei hajonnut missään olosuhteissa, piikit olivat puhtaita sekä massatasapainojen tulokset olivat hyväksymiskriteerin 95–105 % alueella.

Menetelmä todettiin validoinnissa oikeelliseksi, toistettavaksi sekä uusittavaksi. Oikeellisuuden määrittämisessä pitoisuustasojen 50 %, 100 % ja 150 % saantoprosentit olivat 100 ± 2 % ja saantoprosenttien suhteellinen keskihajonta oli 1,40 %, joka täytti hyväksymiskriteerin $\leq 2,7$ %. Toistettavuuden ja uusittavuuden tulosten suhteellisten keskihajontojen hyväksymiskriteerit olivat $\leq 2,7$ %. Toistettavuus määritettiin 100 % pitoisuustasolla kuudella rinnakkaisella näytteellä, joiden keskihajonta oli 0,4 %. Uusittavuuden määrittämisessä käytettiin kolmen toistettavuusmäärittäytymisen tuloksia, joten toistettavuus suoritettiin lisäksi kahteen kertaan. Toiseen määrittäytymiseen vaihdettiin analyysin suorittaja, laite sekä kolonni, jotta voitiin varmistaa, etteivät tulokset ole riippuvaisia kyseisistä tekijöistä. Uusittavuustulosten suhteellinen keskihajonta oli 0,4 %.

Opinnäytetyössä tehdystä validoinnista kirjoitettiin virallinen validointiraportti, joka lähetettiin viranomaisille hyväksyttäväksi. Kun validoinnin tulokset on tarkastettu ja menetelmä hyväksytty, uusi kehitetty menetelmä otetaan laadunvalvontalaboratoriossa käyttöön kyseisen lääkevalmisteen vaikuttavan aineen pitoisuuden määrittämiseen.

LÄHTEET

Ahuja, S. & Dong, M. W. 2005. Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC. 1. painos. Elsevier Academic Press.

Bavage, N, B., Bavage, S, B., Dalal, P, S. & Deshmukh, S, U. 2021. Use Of High-Performance Liquid Chromatography in the Pharmaceutical Industry. The International Journal of Innovative Research in Technology and Science. 8 (2), 506–511.

Correlation coefficient. n.d. JMP. Verkkosivu. Viitattu 19.1.2024.
https://www.jmp.com/en_hk/statistics-knowledge-portal/what-is-correlation/correlation-coefficient.html

Diagnosing and Preventing High Back Pressure in LC Systems. n.d. Restek. Verkkosivu. Viitattu 3.11.2023.
<https://www.restek.com/global/en/articles/diagnosing-and-preventing-high-back-pressure-in-LC-systems>

Harmonisation for Better Health. n.d. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Verkkosivu. Viitattu 22.10.2023. <https://www.ich.org/page/mission>

Harris, D, C. 2007. Quantitative Chemical Analysis. 7. painos. New York: W. H. Freeman and Company.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principle, Types, Instrumentation and Applications. 2022. LaboratoryInfo. Verkkosivu. Viitattu 6.9.2023. <https://laboratoryinfo.com/hplc/>

Hinshaw, J, V. 2009. Pinning Down Tailing Peaks, Part II: Quantitative Measurement. LCGC North America. 27 (7), 542–549.

Hotha, K, K., Reddy, S, P, K., Raju, V, K. & Ravindranath, L, K. 2013. Forced Degradation Studies: Pharmaceutical Approach – Overview of Regulatory Guidance and Literature for the Drug Products and Drug Substances. International Research Journal of Pharmacy. 4 (5), 78–85.

Hägg, M. 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy. Metrologian neuvottelukunta.

Kazakevich, Y. & LoBrutto, R. 2007. HPLC for Pharmaceutical Scientists. Hoboken: John Wiley & Sons.

Koester, V. 2016. What is HPLC. ChemistryViews. Verkkosivu. Viitattu 6.9.2023.
https://www.chemistryviews.org/details/education/9464911/What_is_HPLC/

Krull, I. S., Swartz, E. M. 2006. Method Validation and Robustness. LCGC North America. 24 (5), 480–490.

Mäkelä, M., Soininen, L., Tuomola, S. & Öistämö, J. 2019. Tekniikan kaavasto. 20. painos. Tampere: Tammertekniikka.

Nikolin, B., Imamović, B., Medanhodžić-Vuk, S. & Sober, M. 2004. High Performance Liquid Chromatography in Pharmaceutical Analyses. National Library of Medicine. Verkkosivu. Viitattu 7.9.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7250120/>

Organic Solvents. n.d. N.C. Department of Labor. Verkkosivu. Viitattu 2.12.2023. <https://www.labor.nc.gov/organic-solvents#Tab-HazardOverview-859>

Papadoyannis, I, N & Gika, H, G. 2004. Peak Purity Determination with a Diode Array Detector. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 27 (6), 1083–1092.

Q&A for Ion-Pairing Reagent. 2021. Welch. Verkkosivu. Viitattu 3.11.2023 <https://www.welch-us.com/qa-for-ion-pairing-reagent/>

Stoll, D, R. 2019. Effect of Flow Rate on UV Detection in Liquid Chromatography. LCGC North America. 37 (12), 846–850.

Swartz, M. 2010. HPLC Detectors: A Brief Review. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 10 (9–12), 1130-1150.

Torbeck, L, D. 2010. Statistical Solutions: %RSD: Friend or Foe. Pharmaceutical Technology. 34 (1).

Validation of Analytical Procedures Q2(R1). 1995. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (ICH).

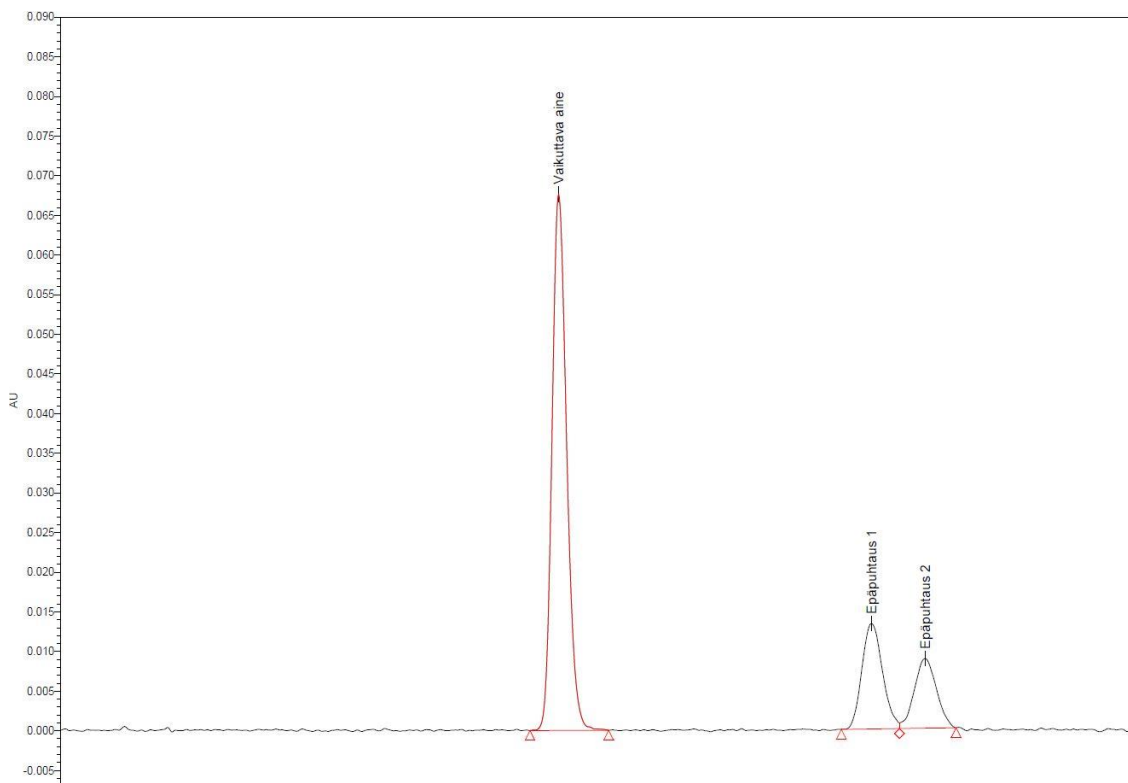
Validation of Analytical Procedures Q2(R2). 2022. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (ICH).

Vitalbans Oy – suomalainen lääketehdas. n.d. Verkkosivu. Viitattu 21.10.2023. <https://vitalbans.fi/fi/vitalbans/vitalbans-suomalainen-laaketehdas/>

Why The Pharmaceutical Industry Uses HPLC. 2020. GenTech Scientific. Verkkosivu. Viitattu 8.10.2023. <https://gentechscientific.com/why-the-pharmaceutical-industry-uses-hplc/>

LIITTEET

Liite 1. Vaikuttavan lääkeaineen referenssin ja tunnettujen epäpuhtauksien kromatogrammi



Liite 2. Lääkevalmisteen ja tunnettujen epäpuhtauksien kromatogrammi

