

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2015

Miikka Rosten

HYALURONIHAPON SPEKTRO- FOTOMETRISEN MÄÄRITYS- MENETELMÄN KEHITTÄMINEN



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Miikka Rosten

HYALURONIHAPON SPEKTROFOTOMETRISEN MÄÄRITYSMENETELMÄN KEHITTÄMINEN

Hyaluronaani eli hyaluronihappo on elimistön kudoksissa esiintyvä luonnollinen polymeeri, jota käytetään muun muassa kosteuttavana ja voitelevana ainesosana silmän ja piilolinssien hoitonesteissä. Uuden silmätippavalmisteen laadunvarmistukseen tarvittiin mittausmenetelmä ennen tuotteen myynnin aloittamista. Tässä tutkimuksessa kehitettiin menetelmä hyaluronihappopitoisuuden määrittämiseksi silmätippaliuoksessa.

Tutkimuksen lähtökohtana käytetään aikaisemmassa tutkimuksessa fermentoitutuotteen hyaluronihappopitoisuuden määrittämiseen kehitettyä menetelmää. Menetelmä perustuu hyaluronihapon ja kationisen pinta-aktiivisen setyylitrimetyyliammoniumbromidin (CTAB) väliseen reaktioon, jossa muodostuu samea suspensio. Suspension sameus (turbiditeetti) on suoraan verrannollinen hyaluronihappopitoisuuteen ja sitä voidaan mitata absorbanssin avulla.

Tietyllä hyaluronihappopitoisuusalueella ja aallonpituudella spektrofotometri-
sessä mittauksessa saadaan lineaarinen absorbanssivaste. Seoksen on annettava reagoida aina sama aika ennen mittaushetkeä, jotta saadaan toistettavia tuloksia. Reaktioaikaa tutkittiin mittaamalla seoksen absorbanssia eri aikapisteissä.

Reagenssien lämpötilalla ei ollut vaikutusta mittaustuloksiin, kun reaktiota tutkittiin kolmessa eri lämpötilassa. Myöskään pH ei muutu reaktiossa. Ennen mittausta seosta sekoittaessa on oltava tarkkana, sillä suuret leikkausvoimat saattavat vahingoittaa syntyneitä ionisia sidoksia hyaluronaanin ja CTAB:n välillä. Tutkimuksessa otettiin myös huomioon menetelmän käytännölliseen suorittamiseen ja mittauserävarmuuteen liittyviä tekijöitä.

ASIASANAT:

hyaluronaani, setyylitrimetyyliammoniumbromidi, laadunvarmistus, silmätippa, turbiditeetti, spektrofotometria, absorbanssi, kyynel neste, piilolasit

Miikka Rosten

DEVELOPMENT OF SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF HYALURONIC ACID

Hyaluronan or hyaluronic acid is a natural polymer of the body tissues. It is used among others as a moisturizing and lubricating ingredient in eye care and contact lens care solutions. Analysis method development was required for the quality assurance of a new eye drop product. In this thesis, a method for the determination of the hyaluronan concentration in eye drops was developed.

As the starting point for this study, a previous study for the determination of the hyaluronan concentration of a fermentation product was used. The method is based on a reaction between hyaluronan and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), which is a cationic surfactant. The reaction forms a turbid suspension the turbidity of which is directly proportional to the concentration of hyaluronan and can be quantified by the absorbance.

Spectrophotometric measurement in a certain concentration range of hyaluronan at a certain wavelength results in a linear absorbance response line. The mixture should be allowed to react always at the same time before the measurement so reliable results can be obtained. The reaction time was analyzed by measuring the absorbance at different time points.

The temperature of the reagents had no effect on the results when the reaction was studied at three different temperatures. Also, the pH did not vary in the reaction. The stirring of the mixture before measurements is one critical point because the high shear forces could break the ionic bonds between hyaluronan and CTAB. The study also took into account the practicality and uncertainty of the method.

KEYWORDS:

hyaluronan, cetyltrimethylammonium bromide, quality assurance, eye drop, turbidity, spectrophotometry, absorbance, tear fluid, contact lenses

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	6
1 JOHDANTO.....	7
2 TEORIA.....	8
2.1 REAGENSIT	8
2.1.1 Hyaluronihappo.....	8
2.1.2 Setyyli(trimetyyli)ammoniumbromidi, CTAB	10
2.1.3 Fosfaattipuskuri.....	11
2.1.4 Silmätippaliuokset.....	11
2.2 SPEKTROFOTOMETRIN TOIMINTA	11
3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	13
3.1 REAGENSISIEN VALMISTAMINEN	13
3.1.1 Hyaluronihappo.....	13
3.1.2 Setyyli(trimetyyli)ammoniumbromidi.....	13
3.1.3 Fosfaattipuskuri.....	13
3.1.4 Silmätippaliuokset.....	14
3.2 SPEKTROFOTOMETRISET MITTAUKSET	14
3.2.1 Mittauksissa käytetyt parametrit	14
3.2.2 Taustahäiriöt.....	15
3.2.3 Mittausaallonpituus ja lineaarinen määrittäsalue.....	15
3.2.4 Reaktioaika.....	15
3.2.5 Lämpötila	16
3.2.6 pH:n muutokset.....	16
3.2.7 CTAB/näyte -tilavuus-suhde.....	16
3.2.8 Menetelmän tarkkuus	17
3.2.9 Sekoituksen vaikutus	17
4 TULOKSET	18
4.1 TAUSTAHÄIRIÖT	18
4.2 MITTAUSAALLONPITUUS JA LINEAARINEN MÄÄRITYSALUE	18
4.3 REAKTIOAIKA	20
4.4 LÄMPÖTILA	21
4.5 PH:N MUUTOKSET	21
4.6 CTAB/NÄYTE -TILAVUUS-SUHDE	22
4.7 MENETELMÄN TARKKUUS.....	22
4.8 SEKOITUKSEN VAIKUTUS.....	23
5 PÄÄTELMÄT JA LOPPUTULOS	24
LÄHTEET	25

KUVAT

Kuva 1 Hyaluronaanin rakenteessa toistuva disakkaridiyksikkö	8
Kuva 2 Silmän rakenne	8
Kuva 3 Novozymesin Hyasis® -tuotemerkillä markkinoima hyaluronaani on tarkoitettu erityisesti silmänhoitotuotteisiin	9
Kuva 4 CTAB:n molekyylikaava ja rakenne	10
Kuva 5 CTAB:n todennäköinen ionireaktio HA-ketjujen kanssa	10
Kuva 6 Hilan toiminta	11
Kuva 7 CTAB:n (2,5 %) ja hyaluronaanin (0,4 %) absorptiospektrit	18
Kuva 8 CTAB:n (2,5 %) absorptiospektri vedessä ja fosfaattipuskurissa	18
Kuva 9 Reaktioseoksen absorbanssi HA-pitoisuuden (0,0005-0,1 %) suhteen eri mittausaallonpituuksilla	18
Kuva 10 Reaktioseoksen absorbanssivasteen lineaarisuus HA-pitoisuuden (0,0005-0,01%) funktiona eri mittausaallonpituuksilla	18
Kuva 11 HA-pitoisuuden (0,02-0,1%) suhde absorbanssiin	19
Kuva 12 Silmätippaliuoksen reaktioseoksen absorbanssivaste	19
Kuva 13 Veteen laimennetun ja puskuriiin laimennetun näytteen vertailu	19
Kuva 14 0,004% hyaluronihappo-vesiliuoksen reaktioaika	20
Kuva 15 0,04% hyaluronihappo-vesiliuoksen reaktioaika	20
Kuva 16 Hyaluronihappo-vesiliuoksen reaktioaika	20
Kuva 17 Silmätipasta puskuriiin tehtyjen laimennosten reaktioaika	20
Kuva 18 Reagenssien säilytyslämpötilan vaikutus	21
Kuva 19 CTAB/näyte tilavuus-suhteen vaikutus reaktioaikaan	22
Kuva 20 Mittaustarkkuus pullotetusta silmätippaliuksesta	22
Kuva 21 Sekoitustehon ja -ajan vaikutus reaktiotuotteen absorbanssiin	23

TAULUKOT

Taulukko 1 Fosfaattipuskurin reagenssit	13
Taulukko 2 Spektrofotometrin laiteasetukset	14
Taulukko 3 Laimennossarja standardiliuokselle	15
Taulukko 4 Reagenssien säilytyslämpötilan vaikutuksen määrittämisessä	16
Taulukko 5 CTAB/näyte tilavuus-suhteen määrittämisessä käytetyt suhteet	16
Taulukko 6 Tarkkuus mittauksen parametrit spektrofotometrissä	17
Taulukko 7 Pullotetun silmätippaliuoksen pH	21
Taulukko 8 Puskuriiin laimennettujen silmätippaliuosten reaktiotuotteen pH	21

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

Absorbanssi	Suure, joka kuvaa valon imeytymistä aineeseen.
CTAB	Setyylitrimetyyliammoniumbromidi eli setrimoniumbromidi (heksadekyylitrimetyyliammoniumbromidi) on kationinen pinta-aktiivinen aine.
Ei-newtoninen	Materiaalit, joiden viskositeetti (aineen sisäistä kitkaa kuvaava suure) riippuu leikkausnopeudesta tai muuttuu ajan funktiona sekä viskoelastiset materiaalit ovat ei-newtonisia.
HA	Hyaluronihappo (hyaluronic acid) on pitkäketjuinen glykosaminoglykaani, jota esiintyy lähes kaikissa kudoksissa.
Oftalmologia	Silmätautioppi eli oftalmologia on lääketieteen osa-alue. Siihen kuuluu silmänsairauksien ennaltaehkäisyä ja hoitoa, silmäkirurgiaa sekä taittovirheiden hoitoa.
Pseudoplastinen	Ei-newtoninen ominaisuus, jossa viskositeetti laskee lisääntäessä leikkausnopeutta.
Reologia	Tiede, joka tutkii materiaalin muodonmuutosta ja virtauskäyttäytymistä. Reologisiin ominaisuuksiin vaikuttaa aineen sisäiset ominaisuudet, rakenne, ulkopuolinen voima ja lämpötila.
Spektrofotometria	Tutkii aineen kykyä absorboida säteilyä eri aallonpituuksilla määrittämällä näytteeseen tulevan ja sen läpäisevän säteilyn voimakkuuksien suhdetta.
Turbidimetria	Prosessi, jossa mitataan läpäisevän valon voimakkuuden alenemaa suspension partikkelien aiheuttamasta sironnasta johtuen.

1 JOHDANTO

Hyaluronihappo on elimistön kudoksissa esiintyvä luonnollinen polymeeri. Hyödyllisten ominaisuuksiensa vuoksi sitä käytetään kosteuttavana ja voitelevana ainesosana kosmeettisissa sekä silmän ja piilolinssien hoitonesteissä. Tutkimuksen tarkoituksena on kehittää toimeksiantajan tuotanto-olosuhteisiin soveltuva menetelmä hyaluronihappopitoisuuden määrittämiseksi kosteuttavasta silmätippaliuoksesta tuotannon ja laadunvalvonnan eri vaiheissa tehtäviä määrittäviä varten.

Tutkimuksen lähtökohtana käytetään Chenin ja Wangin kuvaamaa menetelmää (1), jonka periaatteita sovelletaan hyaluronihapon mittaamiseen puskuriliuoksista ja silmätippatuotteesta. Menetelmässä hyödynnetään hyaluronihapon ja CTAB:n välistä reaktiota, jossa muodostuu samea suspensio eli turbiditeetti, joka absorboi laajalla aallonpituudella. Chenin ja Wangin menetelmässä turbiditeetin absorbanssia mitataan spektrofotometrillä aallonpituudella 400 nm antaen seoksen reagoida ensin noin 10 minuuttia. Turbiditeetti mitataan reaktiotuotteen absorbanssina, joka on suoraan verrannollinen hyaluronihappopitoisuuteen.

Tässä tutkimuksessa aikaisemman tutkimuksen (1) parametreja säädetään uuteen käyttötarkoitukseen soveltuvaksi. Toimeksiantajan tuote sisältää 0,2 % hyaluronihappoa, ja menetelmän avulla voidaan varmistaa tuotteen sisältävän luvatus pitoisuuden ja seurata tuotteen säilyvyyttä. Menetelmä on siis pääasiassa tarkoitettu laadunvalvontaan.

Samaa 0,2 % hyaluronihappopitoisuutta on käytetty jo aikaisemmassa toimeksiantajan tuotteessa ja yleisesti käytössä olevien silmätippojen hyaluronihappopitoisuus on noin 0,2 %, 0,18 % tai 0,15 %.

2 TEORIA

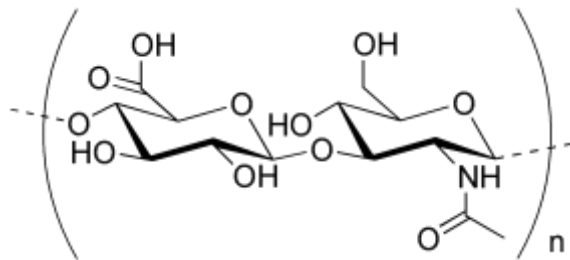
2.1 Reagenssit

2.1.1 Hyaluronihappo

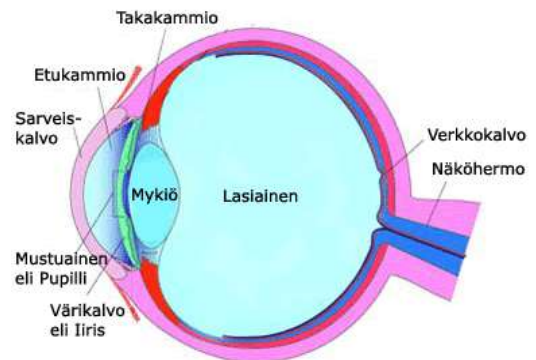
Hyaluronihappo eli hyaluronaani on haarautumattoman polysakkaridiketjun muodostama polymeeri, joka lukeutuu glykosaminoglykaaneihin (Kuva 1). Hyaluronaania esiintyy lähes kaikkialla elimistössä lähinnä soluväleissä, joissa se lisää solujen välistä tilaa sekä helpottaa solujen liikkumista ja jakautumista. Hyaluronaani löydettiin alun perin silmän lasiaisesta, minkä lisäksi sitä löytyy runsaasti myös napanuorasta, rustosta, nivelnesteestä sekä ihosta (2). Noin puolet elimistön hyaluronaanista esiintyy ihokudoksessa (3).

Silmän lasiainen (Kuva 2) on läpinäkyvä, väritön hyytelömäinen massa linssin ja verkkokalvon välissä ja muodostuu suurimmaksi osaksi vedestä (98–99 %) ja pienistä määristä suoloja. Hyaluronaani ylläpitää lasiaisen muotoa, tilavuutta ja rakennetta. Hyaluronaania onkin pidetty luontevana valintana silmälääkevalmistusten täyteaineeksi tai oftalmologisiin lääkinällisiin laitteisiin. (4)

Hyaluronaania valmistetaan solukalvolla poiketen muista glykosaminoglykaaneista, joiden valmistus tapahtuu Golgin laitteella. (2)



Kuva 1 Hyaluronaanin rakenteessa toistuva disakkaridiyksikkö



Kuva 2 Silmän rakenne

Negatiivisen sähkövarauksensa johdosta hyaluronaani sitoo runsaasti vettä natrium-ionien välityksellä. Se pystyy sitomaan vettä jopa 100 kertaa oman painonsa verran muodostaen läpinäkyvän, viskoosin geelin. (2)

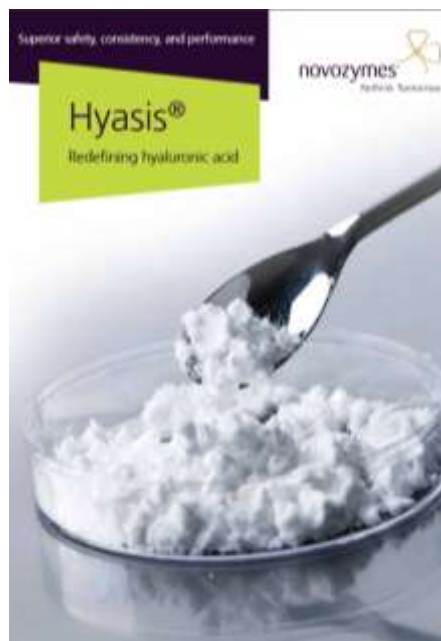
Alun perin hyaluronaanin ainoaksi tehtäväksi luultiin tilan täyttämistä solujen välillä, mutta sillä on myös useita muita tehtäviä elimistössä. Nykyään tunnetaan esimerkiksi useita proteoglykaaneja, jotka sitoutuvat hyaluronaanin kanssa. Näistä ehkä tärkeimpänä ovat rustokudoksissa esiintyvät aggregaanit, joille hyaluronaani toimii eräänlaisena keskusrihmana. Lisäksi hyaluronaani toimii

solun viestinvälittäjänä muun muassa sikiönkehityksessä ja haavojen parantamisessa. Hyaluronaania tarvitaan siis erityisesti nopeasti kasvavissa, uusiutuvissa ja paranevissa kudoksissa. (2) Hyaluronaani mm. edistää sarveiskalvovammojen parantumista. (4)

Silmässä hyaluronaania löytyy lasiaisen lisäksi sidekalvolta, sarveiskalvon epiteeliltä ja kyynelrauhasista. Erinomaisten vedenpidättävyysominaisuuksiensa johdosta hyaluronaani lisää ja ylläpitää silmän ulkopinnan kosteutta ja edistää sarveiskalvoseudun kyynelfilmin stabiilisuutta. (4) (5)

Hyaluronaanin ei-newtonisten ja pseudoplastisten ominaisuuksien johdosta sitä käytetään erilaisissa nestemäisissä ja geelimäisissä tuotteissa viskositeetin vahventena. Fysiologisessa (lähes neutraalissa) pH:ssa hyaluronihapon karboksyyliyhdytymät ovat dissosioituneina eli menettäneet vetyatominsa. Dissosioitumisen seurauksena koko molekyyli on negatiivisesti varautunut ja herkkä ionivahvuuden muutoksille. Hyaluronaanimolekyyli laajenee alhaisilla ionivahvuuksilla toisiaan hylkivien sähkövarausten johdosta, mikä lisää aineen viskositeettia. (3) Korkean viskositeetin omaavat hyaluronaanipohjaiset silmänhoitovalmisteet saattavat kuitenkin aiheuttaa muun muassa silmien ärsytystä sekä hetkelistä näön sumentumista. (4)

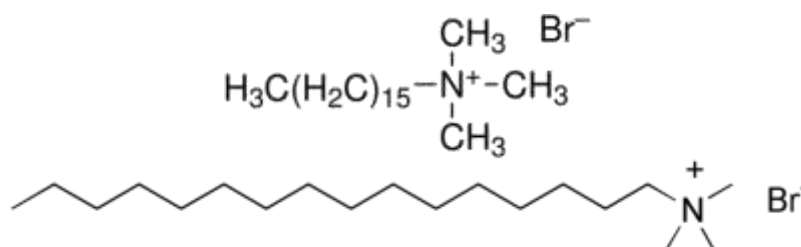
Tässä tutkimuksessa käytettiin erikoispuhdasta, mikrobiologisesti tuotettua hyaluronaania (Hyasis[®], Novozymes; Kuva 3), jonka reologisissa ominaisuuksissa ja valmistuksessa on panostettu erityisesti käyttöturvallisuuteen, maksimaaliseen mukavuuteen ja hyötyvaikutukseen silmässä sekä bioyhteensopivuuteen oftalmologisissa sovelluksissa. (4)



Kuva 3 Novozymesin Hyasis[®] -tuotemerkillä markkinoima hyaluronaani on tarkoitettu erityisesti silmänhoitotuotteisiin (4)

2.1.2 Setyyli(trimetyyli)ammoniumbromidi, CTAB

Setyyli(trimetyyli)ammoniumbromidi eli setrimoniumbromidi [$C_{19}H_{42}BrN$] on kationinen pinta-aktiivinen aine (1), joka kuuluu alkyylimetyyliammoniumsurfaktantteihin (6). Kationi muodostaa CTAB-molekyylin hydrofiilisen pään (7) ja alkyyliketju hydrofobisen pään (Kuva 4).

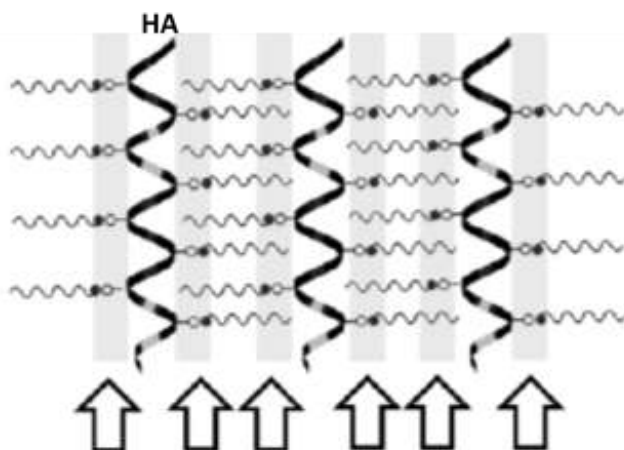


Kuva 4 CTAB:n molekyylikaava ja rakenne

CTAB liukenee hyvin sekä veteen että alkoholeihin (8). CTAB:ta käytetään myös antiseptina sekä nukleiinihappojen ja mukopolysakkaridien saostajana sekä puhdistusaineena (8) (9).

CTAB:ta käytetään yleensä 0,005-0,01 % pitoisuuksina ja se sisältää valmistusmenetelmästä peräisin olevia trimetyyliammoniumbromidin alkyyliketjuja. Sen antiseptinen puhdistusteho on suurin neutraalilla tai lievästi emäksisellä pH-alueella, ja sen aktiivisuus paranee alkoholin läsnä ollessa. CTAB on tehokas myös joitakin viruksia ja bakteerien itiöitä vastaan. (10)

Monet alkyylitrimetyyliammonium-yhdisteet muodostavat hyaluronihapon kanssa ionidoksiaalisia komplekseja, joissa hyaluronihappoketjut laskostuvat kampa-maiseksi rakenteeksi alkyylitrimetyyliammonium molekyylin hydrofiilisiin päihin. Nämä rakenteet ovat veteen liukenemattomia ja saostuvat vesiliuoksissa vähitellen (6). Todennäköisesti CTAB reagoi hyaluronihapon kanssa samalla periaatteella (Kuva 5).



Kuva 5 CTAB:n todennäköinen ionireaktio HA-ketjujen kanssa

2.1.3 Fosfaattipuskuri

Fosfaattia käytetään yleisesti puskurimolekyylinä erilaisissa kuluttajatuotteissa ja biokemiallisissa tutkimuksissa. Fosfaattipuskuri on käyttökelpoinen melko laajalla pH-alueella, vaikkakin sen puskurikapasiteetti on parhaimmillaan neutraalissa pH:ssa. Laajan pH-alueen ansiosta fosfaattipuskurilla voidaan puskuroida erilaisia happamia, emäksisiä ja neutraaleja liuoksia. Sekoittamalla kahta fosfaatin suolaa eri suhteissa saadaan helposti valmistettua halutun pH:n omaavia puskuriliuoksia. Lämpötila vaikuttaa pH:hon vain vähän. Yleensä käytetään natriumfosfaatin (NaH_2PO_4 & Na_2HPO_4) tai kaliumfosfaatin (K_2HPO_4 & KH_2PO_4) suolojen seosta. Kalsium ja eräät raskasmetallit voivat kuitenkin aiheuttaa sakkautumista. Fosfaatti saattaa estää joitakin biokemiallisia reaktioita esimerkiksi estämällä tiettyjen entsyymien tai muiden katalyyttien toimintaa. (11)

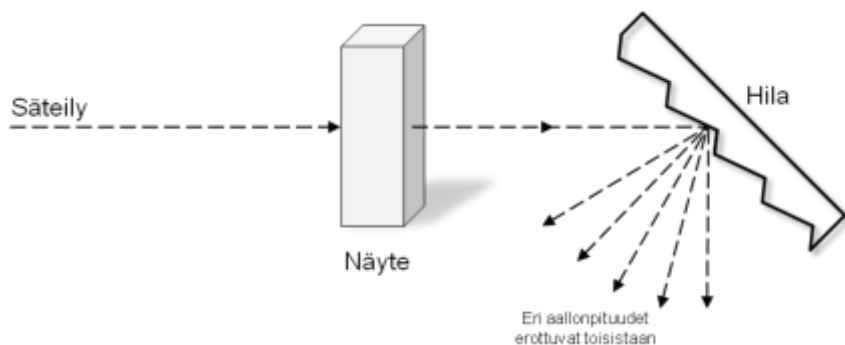
2.1.4 Silmätippaliuokset

Silmän pintaa verhoaa ohut, mutta monikerroksinen ”voiteluaine”, kyynelneste, jota erittyy ja poistuu silmästä jatkuvasti. Uloin lipidikerros sekä voitelee että estää vesikerroksen haihtumista. Jos kyynelneesten määrä vähenee heikentyneen tuotannon tai suurentuneen haihdunnan seurauksena tai sen koostumus muuttuu, kyynelneste ”katkeaa” liian aikaisin, jolloin sarveiskalvon pinta kuivuu. Kuivuminen aiheuttaa ärsytystuntemuksia ja silmien räpyttelyn tarvetta. (12)

Silmien kuivumisen oireiden lievittämiseen käytetään kosteuttavia silmätippoja. Joitakin valmisteita kutsutaan myös ”keinokyyneliksi”. Silmätippoja voidaan käyttää koska tahansa oireiden mukaan, mutta paras vaikutus saadaan, kun silmätippoja käytetään jo ennen oireiden ilmaantumista. (12)

2.2 Spektrofotometrin toiminta

Spektrofotometri pystyy erottamaan eri aallonpituudet toisistaan ja mittaamaan niitä vastaavat intensiteetit. Aallonpituuksien erottamista kutsutaan dispersioksi, joka saadaan aikaan hilan avulla (Kuva 6). Eri aallonpituudet heijastuvat hilasta eri suuntiin, jolloin yksittäisiä kapeita aallonpituuskaistoja voidaan valita ja niiden intensiteettiä pystytään mittaamaan.



Kuva 6 Hilan toiminta

Absorbanssilla kuvataan näytteeseen absorboituneen säteilyn määrää. Absorbanssia käytetäänkin kvantitatiivisessa analyysissä, sillä se on suoraan verrannollinen näytteen pitoisuuteen ja noudattaa Lambert-Beerin lakia (Kaava 1),

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)Cb \quad (1)$$

jossa $A(\lambda)$ on absorbanssi, $\varepsilon(\lambda)$ on ns. molaarinen absorptiokerroin, joka on yksilöllinen eri aineille ja aallonpituuksille, C on absorboivan aineen pitoisuus ja b on säteilyn näytteessä kulkema matka. (13)

Säteilyn kulkiessa näytteen läpi sen intensiteetti pienenee. Pienenemiseen vaikuttavat edellä mainitun lain mukaisesti näytteen pitoisuus, näytekerroksen paksuus sekä säteilyn aallonpituus. Absorptiossa valohiukkasen eli fotonin energia virittää absorboivien atomien tai molekyylien elektroneja korkeampienergiseseen tilaan, jolloin fotoni itse häviää. Absorbanssin ollessa alhainen vuorovaikutus aineen kanssa on vähäistä ja vain pieni osa säteilystä absorboituu näytteeseen. Absorbanssin taas ollessa korkea vain pieni osa säteilystä tulee näytteen läpi. (13)

Absorbanssin mittaamiseksi valonsäde valitulla aallonpituudella jaetaan mekaanisesti kahdelle eri kaistalle, mittaustielle ja referenssitielle. Mittaustiellä on näyteliuos kyvetissä, jolla on tarkka sisämitta (näytepaksuus). Referenssitielle laitetaan samanlainen kyveti, jossa on vertailunestettä ("nollaliuos"), esimerkiksi vettä tai puskuriliuosta ilman absorboivaa näytettä. Vertaamalla läpäisseen valon intensiteettien eroa laite laskee näytekyvetin sisältämän näytteen absorbanssin.

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Reagenssien valmistaminen

3.1.1 Hyaluronihappo

Tutkimuksissa käytettiin sekä 0,2 % (2 mg/ml) että 0,4 % (4 mg/ml) hyaluronihapon vesiliuoksia ja niiden laimennoksia. 0,4 % hyaluronihappoa valmistettiin liuottamalla 0,2 g puhdasta hyaluronaania 50 ml:aan puhdasta vettä. 0,2 % hyaluronihappoa valmistettiin lisäämällä 0,2 g puhdasta hyaluronaania 100 ml:aan puhdasta vettä. Hyaluronihapon täydellisen liukenemisen varmistamiseksi liuosta sekoitettiin yön yli ennen käyttöä. Valmista liuosta säilytettiin huoneenlämmössä.

3.1.2 Setyyliirimetyyliammoniumbromidi

CTAB-reagenssin valmistukseen käytettiin aikaisemman tutkimuksen mukaista ohjetta (1). CTAB:n ja hyaluronaanin turbidimetristä reaktiota varten valmistettiin 0,2 M NaCl-liuos (1,17 g NaCl + 100 ml H₂O), johon liuotettiin 2,5 % (2,5 g) CTAB:ta. Valmista CTAB-reagenssia säilytettiin huoneenlämmössä.

3.1.3 Fosfaattipuskuri

Laimennoksia ja silmätipan koeliuosten valmistusta varten valmistettiin puskuriliuosta alla olevan taulukon mukaisesti (Taulukko 1). Kaikki reagenssit lisättiin veteen ja sekoitettiin kunnes kaikki olivat liuenneet. Puskuria säilytettiin huoneenlämmössä.

Taulukko 1 Fosfaattipuskurin reagenssit

Reagenssi	Määrä	Pitoisuus
Dinatriumvetyfosfaatti [Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O]	0,500 g	1,0 g/l
Natriumdivetyfosfaatti [NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O]	0,165 g	0,33 g/l
Natriumkloridi [NaCl]	4,250 g	8,5 g/l
Vesi [H ₂ O]	500 ml	-

3.1.4 Silmätippaliuokset

Alustavissa mittauksissa käytettiin toimeksiantajan valmista pulloitettua ja suodatettua silmätippaliuosta (0,2 % HA). Myöhemmässä vaiheessa silmätippaliuos valmistettiin itse fosfaattipuskuriin lisäämällä 0,2 g hyaluronihappoa 100 ml:aan fosfaattipuskuria (0,2 % HA). Tästä laimennettiin edelleen 0,01 %:ksi liuokseksi lisäämällä 1 ml:aan 0,2 % silmätippaliuosta 19 ml fosfaattipuskuria.

Viimeisissä määrityksissä käytettiin toimeksiantajan uutta pulloitettua ja suodatettua silmätippaerää. Liuoksia säilytettiin huoneenlämmössä. Tästä tehtiin mittauksia varten 1:25 (0,008 % HA) laimennos lisäämällä 0,5 ml:aan silmätippaliuosta 12 ml puhdasta vettä.

3.2 Spektrofotometriset mittaukset

3.2.1 Mittauksissa käytetyt parametrit

Spektrofotometrin (*Lambda 40, PerkinElmer*) lamppujen mittaustien ja referenssien säteen energiat mitattiin jokaisena mittauspäivänä ennen mittausten aloittamista siihen tarkoitetuilla laitteen sisäisillä metodeilla.

Vesiliuoksia tai vedellä laimennettuja näytteitä mitattaessa spektrofotometri nolattiin (*Autozero*) vedellä ja fosfaattipuskurilla laimennettuja näytteitä mitattaessa fosfaattipuskurilla.

Alustavissa mittauksissa, jolloin optimaalista mittausaallonpituutta ei vielä ollut tiedossa, mitattiin näytteen spektriä laajalla aallonpituusalueella (Taulukko 2).

Taulukko 2 Spektrofotometrin laiteasetukset

Scan	Vaihdellen välillä 220–800 nm
Interval	1,0 nm
Number of cycles	1
Ordinate mode	A
Lamp UV/VIS	On
Scan speed	1920 nm
Smooth	0 nm
Slit	1,00 nm

Yksittäistä mittausta varten pipetoitiin 2 ml CTAB-reagenssia 15 ml:n vetoiseen muoviputkeen, johon lisättiin 1 ml mitattavaa näytettä. Samalla kun näyte lisättiin, käynnistettiin sekuntikello ja seos sekoitettiin varovaisesti vortexilla. Noin 4 minuuttia näytteen lisäyksestä sekoitettiin uudestaan varovaisesti vortexilla, kaadettiin seos kvartsikyvetiin ja siirrettiin kyveti spektrofotometriin. Tarkalleen 5 minuutin kohdalla käynnistettiin mittaus tietokoneelta.

3.2.2 Taustahäiriöt

Tutkittiin mahdollisten muiden aineiden vaikutukset tuloksiin. Ensimmäisenä testattiin CTAB-reagenssin vaikutus mittaamalla 1 ml vettä ja 2 ml CTAB-reagenssia sisältävän näytteen spektri ja pelkän 0,4 % hyaluronihappovesiliuoksen spektri välillä 220–800 nm.

Toiseksi testattiin fosfaattipuskurin vaikutusta mittaamalla 1 ml vettä ja 2 ml CTAB-reagenssia sisältävän näytteen spektri välillä 220–800 nm ja 1 ml fosfaattipuskuria ja 2 ml CTAB-reagenssia sisältävän näytteen spektri samoilla aallonpituuksilla.

3.2.3 Mittausaallonpituus ja lineaarinen määrittämisalue

Menetelmässä käytettävä aallonpituus määritettiin käyttämällä mittauksissa eri hyaluronaanipitoisuuden omaavia näytteitä aallonpituuksilla 220–800 nm. Tuloksista tehtiin kuvaajat absorbanssin ja hyaluronaanipitoisuuden suhteesta.

Itse valmistetusta 0,2 % hyaluronihappoa sisältävästä silmätippaliuoksesta valmistettiin 0,01 % laimennos lisäämällä 1 ml:aan silmätippaliuosta 19 ml puskuria. Tästä valmistettiin edelleen laimennossarja (Taulukko 3).

Taulukko 3 Laimennossarja standardiliuokselle

HA-pitoisuus (%)	0,01 % liuosta (µl)	Puskuria (µl)
0,0083	3000	600
0,0067	2800	1400
0,005	2000	2000
0,003	1400	2800
0,002	800	3200
0,0005	200	3800

3.2.4 Reaktioaika

Optimaalista ja käytännöllistä reaktioaikaa määritettiin eri hyaluronihappopitoisuuksilla mittaamalla absorptiospektriä eri aikapisteissä. Aluksi mitattiin 0,04 % ja 0,004 % HA-vesiliuosta minuutista noin kahteen tuntiin aallonpituuksilla 300–800 nm sekä pitoisuuksilla 0,05 % ja 0,005 % minuutista viiteentoista minuuttiin aallonpituudella 340 nm, jotta saadaan suuntaa reaktioajan pituudesta ja sopivasta näytepitoisuudesta.

Tulosten perusteella absorbanssia mitattiin 1-10 minuutin reaktioajalla silmätipasta fosfaattipuskuriin valmistetuilla laimennoksilla pitoisuuksilla 0,01 %, 0,005 % ja 0,0005 % aallonpituudella 320 nm.

3.2.5 Lämpötila

Lämpötilan vaikutusta mittaustuloksiin arvioitiin säilyttämällä reagensseja eri lämpötiloissa ennen mittausta. Reagensseja säilytettiin huoneenlämmössä, jääkaapissa (+4 °C) ja lämpökaapissa (+35 °C) alla olevan taulukon (Taulukko 4) mukaan.

Taulukko 4 Reagenssien säilytyslämpötilan vaikutuksen määrittämisessä

Mittaus	Hyaluronihapon säilytys	CTAB-reagenssin säilytys
1	Huoneenlämpö	Huoneenlämpö
2	Jääkaappi	Jääkaappi
3	Lämpökaappi	Lämpökaappi
4	Jääkaappi	Huoneenlämpö

Huoneenlämpöistä CTAB-reagenssia kokeiltiin jääkaappikylmään hyaluronihappoliuokseen, koska CTAB-reagenssi jähmettyi jääkaapissa. Jääkaappikylmä CTAB-reagenssi sulatettiin ennen käyttöä huoneenlämmössä.

3.2.6 pH:n muutokset

Aikaisempien tutkimusten mukaan 0,2 % hyaluronaani-vesi -liuoksen pH vaihtelee välillä 5,5–7,5. (3)

pH mitattiin pH-mittarilla silmätippaliuoksesta eri pitoisuuksilla. Fosfaattipuskuriin laimennettujen silmätippaliuosten pH CTAB reaktion jälkeen mitattiin laimentamalla reaktiotuote 1:10 fosfaattipuskurilla lisäämällä 1 ml:aan reaktiotuotetta 9 ml puskuria ja sekoittamalla kevyesti.

3.2.7 CTAB/näyte -tilavuus-suhde

Suhteen vaikutusta määritettäessä käytettiin 1:25-laimennosta (0,008 % HA) silmätippaliuoksesta. Lähtökohtana käytettiin aikaisemmassa tutkimuksessa (1) käytettyä suhdetta (1 ml näytettä ja 2 ml CTAB-reagenssia). Tästä tehtiin muutoksia kumpaankin suuntaan alla olevan taulukon (Taulukko 5) mukaisesti.

Taulukko 5 CTAB/näyte tilavuus-suhteen määrittämisessä käytetyt suhteet

Mittaus	Näyte (ml)	CTAB (ml)
1	2	1
2	1	1
3	1	1,5
4	1	2
5	1	2,5
6	1	3

3.2.8 Menetelmän tarkkuus

Mittaustarkkuutta arvioitiin kymmenellä rinnakkaisella silmätippalaimennoksella kahtena peräkkäisenä mittauspäivänä (yhteensä 20 rinnakkaista mittausta). Mittaukset tehtiin laimennoksilla 1:25 veteen (0,008 % HA) ja 5 minuutin reaktioajalla. Muut käytetyt parametrit on esitetty alla (Taulukko 6).

Taulukko 6 Tarkkuus mittauksen parametrit spektrofotometrissä

Wavelength	320 nm
Number of cycles	1
Response	2 s
Slit	1 nm

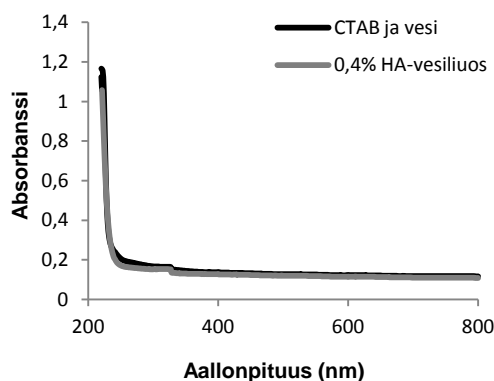
3.2.9 Sekoituksen vaikutus

Hyaluronaanin reagoiessa CTAB:n kanssa se muodostaa oletettavasti ionisia vetysidoksia (6) (Kuva 5). Reaktioseosta sekoittaessa seokseen syntyy ionisidoksia mahdollisesti hajottavia leikkausvoimia. Sekoituksen vaikutusta lopputulokseen tutkittiin kahdella eri sekoitustehokkuudella (vortexin asetuksilla 1 ja 6) sekä eri sekoitusajoilla (1, 4 ja 8 s).

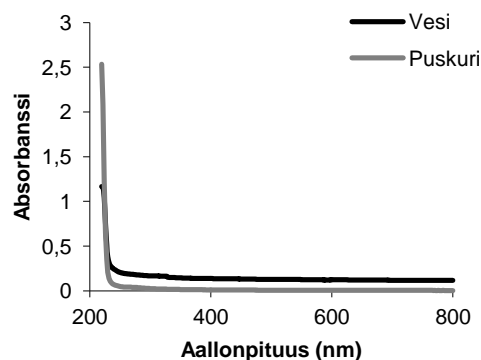
4 TULOKSET

4.1 Taustahäiriöt

CTAB ja hyaluronaani eivät absorboi aallonpituuksilla n. 250–800 nm (Kuva 7).



Kuva 7 CTAB:n (2,5 %) ja hyaluronaanin (0,4 %) absorptiospektrit

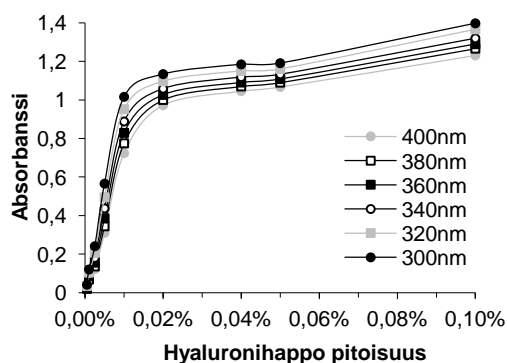


Kuva 8 CTAB:n (2,5 %) absorptiospektri vedessä ja fosfaattipuskurissa

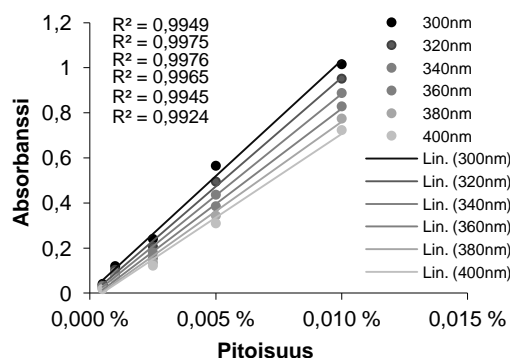
Kun verrataan CTAB-näytteitä, joissa toisessa käytettiin vettä ja toisessa fosfaattipuskuria, huomataan puskuria sisältävän näytteen absorbanssin jäävän alhaisemmaksi mittausaallonpituuksilla (Kuva 8).

4.2 Mittausaallonpituus ja lineaarinen määrittäminen

Optimaalisen mittausaallonpituuden määrittämiseksi eri pitoisuuksia sisältävien hyaluronihappoliuosten annettiin reagoida CTAB-reagenssin kanssa. Hyaluronihappopitoisuuteen 0,01 % saakka absorbanssivaste on likimain lineaarinen. Yli tämän pitoisuuden kuvaaja kääntyy selvästi ja muodostaa toisen suuntaisen lineaarisen vastealueen (Kuva 9 ja Kuva 10).

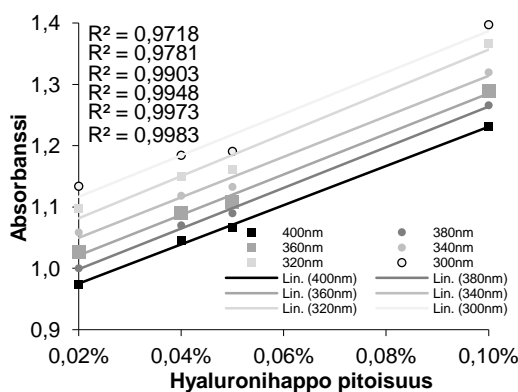


Kuva 9 Reaktioseoksen absorbanssi HA-pitoisuuden (0,0005-0,1 %) suhteen eri mittausaallonpituuksilla

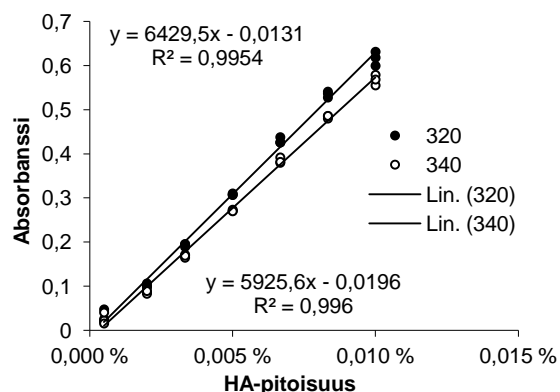


Kuva 10 Reaktioseoksen absorbanssivasteen lineaarisuus HA-pitoisuuden (0,0005-0,01%) funktiona eri mittausaallonpituuksilla

Tarkasteltaessa absorbanssin vastetta hyaluronihapon vesiliuoksessa pitoisuusalueella 0,001-0,01 % paras lineaarisuus (suurin lineaarisen ratkaisufunktion korrelaation selityskerroin R^2) saadaan aallonpituudella 340 nm (Kuva 10). Tätä suuremmilla pitoisuuksilla paras lineaarisuus saataisiin aallonpituudella 400 nm (Kuva 11).

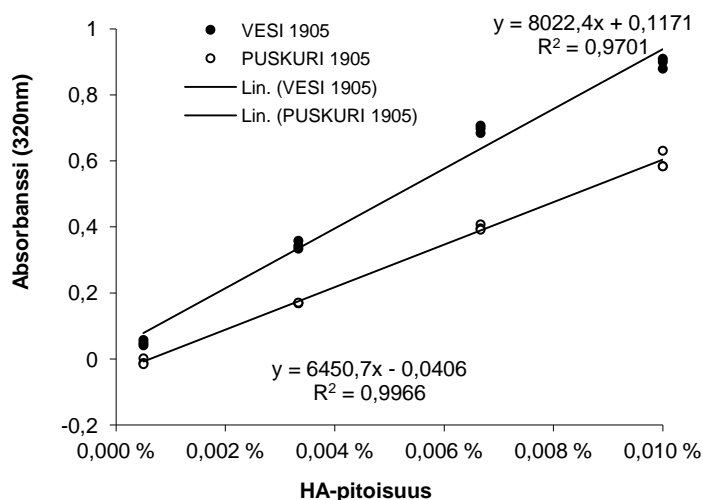


Kuva 11 HA-pitoisuuden (0,02-0,1%) suhde absorbanssiin



Kuva 12 Silmätippaliuoksen reaktioseoksen absorbanssivaste

Valmiista pullotetusta silmätipasta valmistetuista puskuriiin tehdyistä laimennoksista saadun absorbanssivasteen lineaarisuus (R^2) ei huomattavasti muutu aallonpituutta muuttamalla (Kuva 12). Aallonpituudella 320 nm suora kulkee kuitenkin lähempänä origoa.



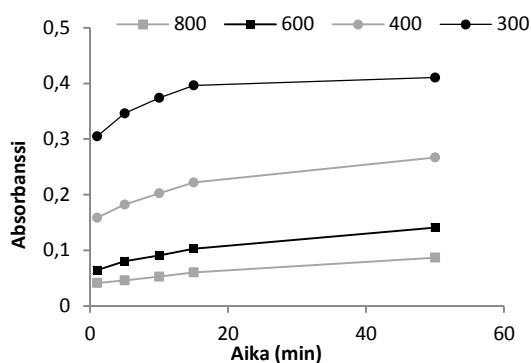
Kuva 13 Veteen laimennetun ja puskuriiin laimennetun näytteen vertailu

Veteen laimennettujen silmätippänäytteiden absorbanssi on korkeampi kuin puskuriiin laimennettujen näytteiden (Kuva 13). Tämä tosin on selitettävissä jo aiemmin testatulla taustahäiriöllä, missä CTAB-reagenssin absorbanssi on korkeampi vedessä kuin puskurissa (ks. Taustahäiriöt s. 15).

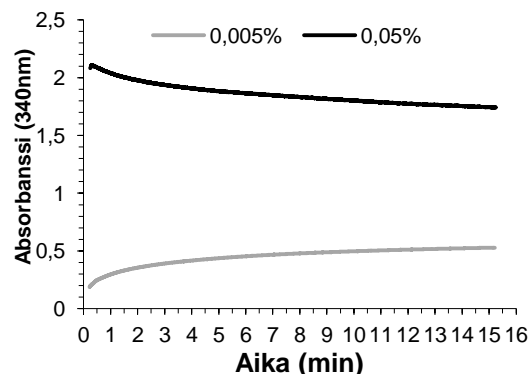
Absorbanssivaste muodostaa loivasti S-kirjaimen muotoisen käyrän (Kuva 12 ja Kuva 13), joten vaste ei ole täsmälleen lineaarinen. Kuvaaja noudattaa melko tarkasti 3. asteen polynomifunktiota ($R^2 \geq 0,998$). Mittaamisen kannalta ei olisi kuitenkaan asianmukaista laskea näytteen pitoisuutta absorbanssivasteesta monimutkaisien matemaattisten kaavojen avulla. Tästä syystä jatkotutkimuksissa keskityttiin pitoisuuden laskemiseen lineaarisella vastekertoimella, joka antaa käytännöllisen ja riittävän suuren tarkkuuden.

4.3 Reaktioaika

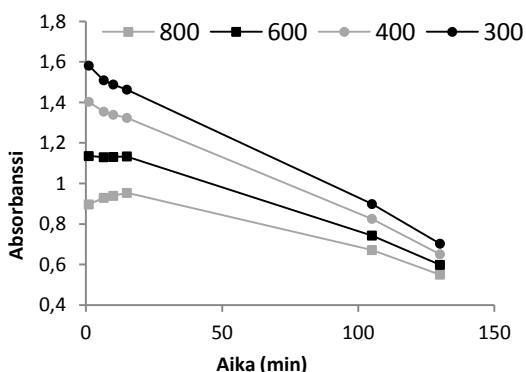
Pienemmällä hyaluronihappopitoisuudella (0,004 %) turbiditeetti kehittyi tasaisesti jopa puolituntia (Kuva 14) kun taas suuremmalla pitoisuudella (0,04 %) reaktio tapahtuu nopeasti ja absorbanssi alkaa laskea erityisesti alhaisemmilla aallonpituuksilla jo muutamien minuuttien jälkeen (Kuva 15). Sama efekti on havaittavissa myös pitoisuuksilla 0,005 % ja 0,05 % (Kuva 16).



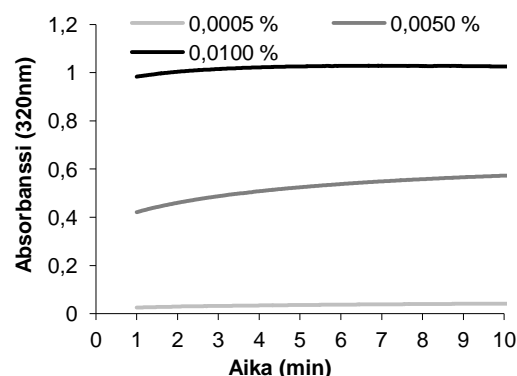
Kuva 14 0,004% hyaluronihappovesiliuoksen reaktioaika



Kuva 16 Hyaluronihappovesiliuoksen reaktioaika



Kuva 15 0,04% hyaluronihappovesiliuoksen reaktioaika

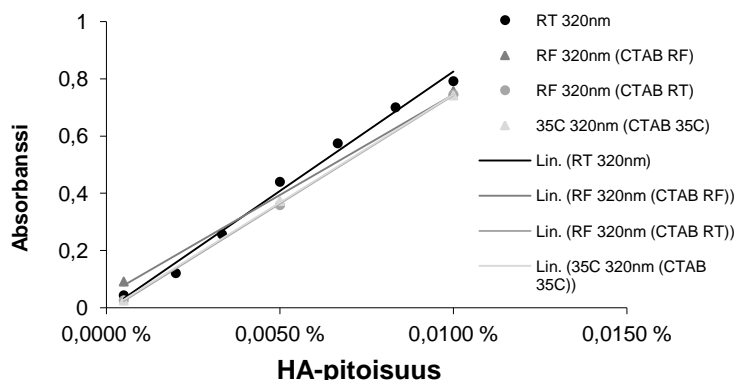


Kuva 17 Silmätippasta puskuriin tehtyjen laimennosten reaktioaika

Kun silmätippaliuoksesta valmistettiin laimennoksia puskuriin, oli hyaluronihappopitoisuudella 0,01 % optimaalinen reaktioaika, jolla absorbanssi ei enää merkittävästi muutu, noin 5 minuuttia (Kuva 17).

4.4 Lämpötila

CTAB-reagenssi jähmettyy jääkaappilämpötilassa ja se tulee sulattaa huoneenlämmössä ennen käyttöä. Huomattavia eroja ei kuitenkaan synny käytettäessä jääkaappi- tai lämpökaappilämpötiloissa olevia reagensseja (Kuva 18).



Kuva 18 Reagenssien säilytislämpötilan vaikutus (CTAB RF = Jääkaapista sulatettu CTAB-reagenssi)

4.5 pH:n muutokset

Veteen laimennettuna silmätippaliuoksen pH pysyttelee neutraalina kaikilla pitoisuuksilla. Huomattavaa vaihtelua ei ole, kun huomioidaan, että mittaukset ovat yksittäisiä ilman rinnakkaisia tuloksia (Taulukko 7).

Taulukko 7 Pullotetun silmätippaliuoksen pH

HA-pitoisuus (%)	pH	Lämpötila (°C)
0,4	6,90	22,8
0,2	7,11	21,9
0,02	7,02	22,4
0,002	7,09	22,4

pH-mittari kalibroitu: asy 6,828 / slope 98,7%

Fosfaattipuskuriin laimennettujen tarkan pitoisuuden omaavien silmätippaliuosten reaktiotuotteen pH pysyttelee tarkalleen 7,10 tienoilla, vaikka rinnakkaisia mittauksia ei tehty (Taulukko 8).

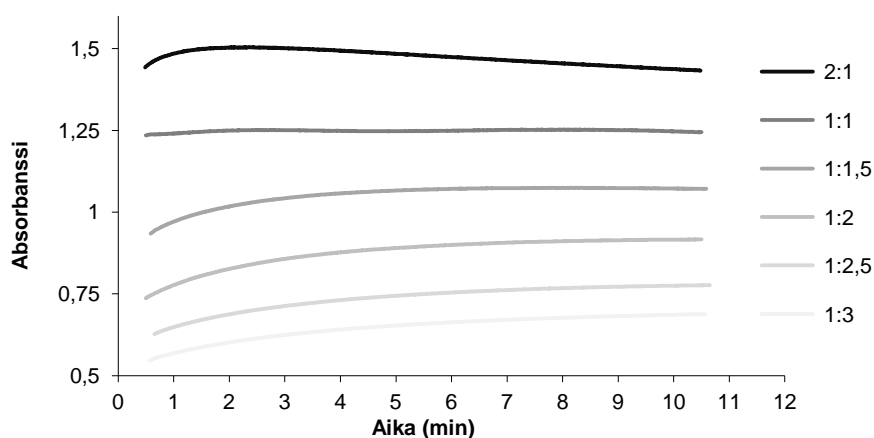
Taulukko 8 Puskuriin laimennettujen silmätippaliuosten reaktiotuotteen pH

HA-pitoisuus (%)	pH	Lämpötila (°C)
0,01	7,10	21,8
0,0083	7,10	22,3
0,0067	7,10	22,6
0,005	7,10	22,3
0,0033	7,11	22,3
0,002	7,11	22,3
0,0005	7,11	22,6
Keskiarvo	7,10	22,3

pH-mittari kalibroitu: asy 6,818 / slope 98,64%

4.6 CTAB/näyte -tilavuus-suhde

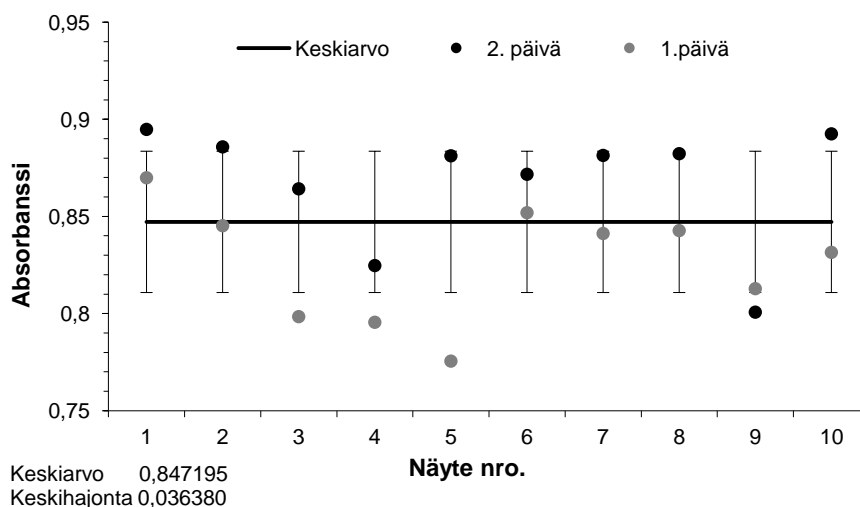
Käytettäessä 1:25-laimennosta näytteestä paras tilavuussuhde olisi 1 ml näyte-laimennosta ja 1,5 ml CTAB-reagenssia. Menetelmän kannalta kuitenkin käytännöllisempi suhde on 1 ml näyteliuosta ja 2 ml CTAB-reagenssia, koska näytekyvetin tilavuus on noin 3 ml. Tällä suhteella reaktio on lähes kokonaan tapahtunut ja turbiditeetti (absorbanssi) pysyy stabiilina 5 minuutin jälkeen. Pienemällä määrällä CTAB-reagenssia reaktio jatkuu pidempään ja suuremmalla määrällä reaktio tapahtuu nopeammin (Kuva 19).



Kuva 19 CTAB/näyte tilavuus-suhteen vaikutus reaktioaikaan

4.7 Menetelmän tarkkuus

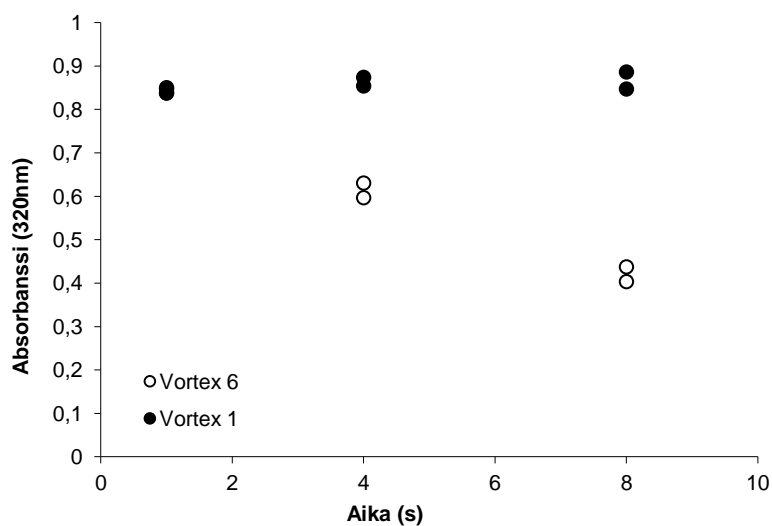
Samasta silmätippaliuoksesta kahtena peräkkäisenä mittauspäivänä tehtyjen mittausten tulokset vaihtelevat välillä 0,78–0,89 absorbanssiyksikköä keskiarvon ollessa 0,85 ja keskihajonnan 0,04 yksikköä (Kuva 20).



Kuva 20 Mittaustarkkuus pullotetusta silmätippaliuoksesta

4.8 Sekoituksen vaikutus

Kun näytteen ja CTAB:n reaktioseosta sekoitetaan liian rajusti ja liian pitkään, absorbanssi laskee (Kuva 21). Ilmiö viittaa siihen, että syntynyt reaktiotuote hajoaa herkästi.



Kuva 21 Sekoitustehon ja -ajan vaikutus reaktiotuotteen absorbanssiin

5 PÄÄTELMÄT JA LOPPUTULOS

Fosfaattipuskuri mahdollisesti reagoi CTAB:n kanssa, jolloin absorbanssi jää alhaisemmaksi kuin veteen tehdyillä laimennoksilla (ks. Taustahäiriöt s. 15). Käytettäessä aina vesilaimennoksia saadaan kuitenkin luotettavia tuloksia, joita voidaan verrata vesilaimennoksista tehtyyn standardiin. Vesilaimennoksia käytettäessä kustannukset ovat alhaisemmat ja fosfaattipuskurin käyttöikä ei tarvitse määrittää erikseen.

Alhaisemmilla hyaluronihappopitoisuuksilla (0,0005-0,01 %) saadaan aallonpituudella 320 nm lineaarinen suora kun käytetään reaktioaikana 5 minuuttia. Näin ollen menetelmää varten voidaan valita 0,2-prosenttisen silmätippavalmisteen sopivaksi laimennokseksi 1:25 (0,008 %), jolloin absorbanssi osuu lineaarisen vastealueen yläosaan, jossa optimaalinen reaktioaika on noin 5 minuuttia.

Reagenssien lämpötiloilla ei ole suurta vaikutusta, mutta toistettavuuden kannalta on luotettavampaa käyttää aina huoneenlämpöisiä reagensseja mittauksissa. CTAB-reagenssia ei suositella säilytettävän jääkaapissa, koska se jähmettyy.

Paras ja käytännöllisin tapa saada aikaan sopiva reaktio on käyttää mitattaessa 1 ml näytettä vesilaimennoksena ja 2 ml CTAB-reagenssia. Tällöin näytetilavuus on näytekyllä sopiva ja reaktioaika on noin 5 minuuttia.

Laimennoksia tehtäessä ja reagensseja pipetoitaessa on oltava tarkkana, sillä pienetkin pitoisuuserot vaikuttavat tulokseen. Näytteitä sekoittaessa on varottava syntyneiden reaktiosidosten hajoamista liian kovien leikkausvoimien johdosta, sillä tämä vaikuttaa tuloksiin merkittävästi. Toistettavuus on kuitenkin tulosten mukaan hyvä kun tilastollinen hajonta on vain noin 4 %.

Tulosten perusteella laadittiin yksityiskohtaiset työohjeet, ja toimeksiantaja otti menetelmän validoinnin kautta käyttöön uuden silmätippatuotteen laaduntarkkailuun. Uusi tuote saatiin markkinoille vuoden 2015 alussa.

LÄHTEET

1. **Chen Y. ja Wang Q.** Establishment of CTAB turbidimetric method to determine hyaluronic acid content. *Carbohydrate Polymers*, 2009 78(1): 178-181.
2. **Solunetti.** Solunetti.fi. [Online] 2006. [Viitattu: 13. lokakuuta 2014.] <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/hyaluronaani/2/>.
3. **Becker, L. C.; Bergfeld, W. F.; Belsito, D. V.; Klaassen, C. D.; Marks, J. G.; Shank, R. C.; Slaga, T. J. ja Snyder, P. W.** Final Report of the Safety Assessment of Hyaluronic Acid, Potassium Hyaluronate, and Sodium Hyaluronate. *International Journal of Toxicology*. 2009,28 (4 Suppl): 5-67.
4. **Novozymes.** *Biopharma, Eye care, Hyasis[®]*, Bacillus-derived hyaluronic acid. Bagsvaerd : Novozymes Biopharma DK A/S, 2011.
5. **Enbuske, J.** Kyynelneste ja piilolinssit. Kalmar, Ruotsi : Linnaeus University, 30. kesäkuuta 2010.
6. **Tolentino, A.; Alla, A.; Martínez de Ilarduya, A. ja Muñoz-Guerra, S.** Comb-like ionic complexes of hyaluronic acid with alkylmethylammonium surfactants. *Carbohydrate Polymers* 2013, 92(1): 691-6.
7. **Kosmetiikan kemiaa.** kosmetiikankemiaa.com. [Online] 2014. [Viitattu: 11. maaliskuuta 2015.] <http://www.kosmetiikankemiaa.com/mitakosmetiikkaon/13>.
8. **MERCK & CO., Inc.** The Merck Index. Budavari, S.; O'Neil, M. J.; Smith, A; Heckelman, P.E. ja Kinneary, J. F. New Jersey : Merck Research Laboratories, 1996. s. 2068. ISBN 0911910-12-3.
9. **Morris, C. G.** Dictionary of Science and Technology. Academic Press, Inc., 1992. s. 396. ISBN 978-0-12-200400-1.
10. **Kulshreshtha, A. K.; Singh, O. N. ja Wall, G. M.** Pharmaceutical Suspensions: From Formulation Development to Manufacturing. Springer Science & Business Media, 2009. s. 120. ISBN 978-1-4419-1086-8.

11. **World encyclopedic knowledge.** swewe.net. [Online] 2015. [Viitattu: 9. maaliskuuta 2015.]

http://www.swewe.net/word_show.htm/?193471_1&Phosphate_buffer.

12. **Sandberg-Lall, M.** silmalaakariyhdistys.fi. [Online] Suomen Silmälääkäriyhdistys ry, 23. helmikuuta 2014. [Viitattu: 9. maaliskuuta 2015.]

http://www.silmalaakariyhdistys.fi/fin/silmataudit_ja_nakeminen/kuivat_silmat/.

13. **Jaarinen, S. ja Niiranen, J.** Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki : AEL, 1995. ISBN 951-37-1614-7.