



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

LÄÄKEAINEEN IDENTIFIOINTI, PITOISUUS JA HAJOAMISTUOTTEIDEN MÄÄRÄT

Menetelmän kehitys ja validointi

Laura Sivonen

Opinnäytetyö
Toukokuu 2018
Energia- ja ympäristötekniikka
Laboratoriotekniikka



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Energia- ja ympäristötekniikka
Laboratoriotekniikka

SIVONEN, LAURA:

Lääkeaineen identifiointi, pitoisuus ja hajoamistuotteiden määrät
Menetelmän kehitys ja validointi

Opinnäytetyö 56 sivua, joista liitteitä 2 sivua
Toukokuu 2018

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli parantaa Santen Oy:llä käytössä olleita näytteenkäsittely- ja analysointimenetelmiä toistettavammiksi, nopeammiksi ja turvallisemmiksi. Näytteenkäsittelylle ja analysointimenetelmälle oli ennestään Santen Oy:n menetelmien lisäksi olemassa sopimusvalmistajan menetelmät, jotka molemmat olivat validoituja, mutta joissa oli todettu toistettavuusongelmia hankalan näytematriisin vuoksi. Tavoitteena oli siis joko jatkokehittää vanhoja menetelmiä tai vaihtoehtoisesti luoda täysin uudet menetelmät, optimoida ne ja validoida viranomaisohjeistuksen mukaisesti.

Opinnäytetyön kokeellisen vaiheen aikana saatiin näytteenkäsittelymenetelmä toistettavaksi ja käsittelyyn kuluvaa aikaa lyhennettyä huomattavasti. Lisäksi näytteenkäsittely saatiin yksinkertaistettua ja harmonisoitua. Analyysimenetelmä muutettiin isokraattisesta gradienttimenetelmäksi HPLC:llä, jonka jälkeen menetelmä skaalattiin ja optimoitiin UHPLC:lle.

Validoinnin osa-alueita ICH:n ohjeistuksen mukaan olivat spesifisyys, hajotuskokeet, toteamis- ja kvantitointiraja, lineaarisuus ja määrittämisalue, toistettavuus, oikeellisuus ja saanto, haavoittuvuus, liuosten säilyvyys ja suhteellinen vastekerroin. Myös vaatimukset olivat ICH:n ohjeistuksen mukaiset. Lähes kaikki osa-alueet täyttivät kriteerit ja näin ollen raportoitiin hyväksytyinä.

Validoinnin hyväksytyistä osa-alueista voidaan päätellä näytteenkäsittelymenetelmän olevan toistettava ja analyysimenetelmän sopivan UHPLC-laitteistolle. Kun validointi on hyväksytysti suoritettu loppuun, seuraava askel on siirtää se sopimusvalmistajalle. Kehitettyjen näytteenkäsittely- ja analyysimenetelmien puutteet ovat edelleen näytteenkäsittelyssä ja tulevaisuudessa tulisikin kehitystyötä painottaa näytteenkäsittelyyn.

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Energy and Environmental Engineering
Laboratory Engineering

SIVONEN, LAURA:

Active pharmaceutical ingredient's identification, assay and related substances
Method development and validation

Bachelor's thesis 56 pages, appendices 2 pages
May 2018

The purpose of this thesis was to improve the sample preparation and analysis methods used at Santen Oy. In addition to these, methods used by a contract manufacturer were also validated, as there were problems with repeatability. The aim of this study was to develop faster, easier and more repeatable methods and to optimize and validate them according to the guidelines of the ICH.

The sample preparation method was simplified and the analysis time cut to half. After the development the sample preparation was also easier and safer to an analyst as the steps were redesigned and some hazardous chemicals were no longer needed. The method of analysis was updated from isocratic to gradient with HPLC and afterwards the method was scaled and optimized for UHPLC.

The validation included specificity, forced degradation studies, limit of quantitation and detection, linearity and range, repeatability, accuracy and range, robustness, stability and relative response factor. Problems appeared in accuracy as the sample was probably not homogeneous, and the degradation studies and robustness were not completed because lack of time.

Although the validation was not completed the results gave indications that the sample preparation was repeatable and the method of analysis was suitable for the UHPLC system. The next step after the validation is completed is to transfer the methods to the contract manufacturer, which may be challenging. It has been clear all the way from beginning that the weakness of these methods is the sample preparation, and development of a completely new method should be considered in the future.

Key words: validation, method development, liquid chromatography

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	7
2	NESTEKROMATOGRAFIA	9
2.1	Nestekromatografian kehitys ja toiminta	9
2.1.1	Partitiokromatografia	10
2.2	Korkean erotuskyvyn kromatografia	11
2.3	Ultrakorkean erotuskyvyn kromatografia	12
2.4	Kolonni	13
2.5	Detektorit	14
2.5.1	Vaihdeltavan aallonpituuden detektori	14
2.5.2	Viritettävä UV-detektori	15
2.5.3	Valodiodirividetektori	16
2.6	Van Deemterin yhtälö	17
3	VALIDOINNIN TARKOITUS.....	21
4	NÄYTTEENKÄSITTELY JA ANALYYSIMENETELMÄN KEHITYS.....	23
4.1	Näytteenkäsittely	23
4.2	Analyysimenetelmän kehitys	24
4.2.1	HPLC	24
4.2.2	UPLC	25
5	VALIDOINNIN SUORITUS.....	28
5.1	Esivalmistelut.....	28
5.2	Spesifisyys	28
5.3	Hajotuskokeet	29
5.4	Toteamis- ja kvantitointiraja	30
5.5	Lineaarisuus ja määrittämisalue.....	31
5.6	Toistettavuus	32
5.6.1	Systeemin toistettavuus.....	32
5.6.2	Menetelmän ja laboratorion sisäinen toistettavuus	32
5.7	Oikeellisuus ja saanto	33
5.8	Haavoittuvuus	33
5.9	Liuosten säilyvyys	33
5.10	Suhteellinen vastekerroin.....	34
6	TULOKSET JA TULOSTEN TULKINTA	35
6.1	Systeemin ja menetelmän toistettavuus, identifiointi	35
6.2	Spesifisyys ja hajotuskokeet	37
6.3	Oikeellisuus ja saanto, lineaarisuus ja määrittämisalue	40
6.4	LOQ/LOD ja suhteellisen vastekerroin	46

6.5	Liuosten säilyvyys ja haavoittuvuus	47
7	JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA	50
	LÄHTEET	53
	LIITTEET	55
	Liite 1. Plasebon kromatogrammi spesifisyyttä varten	55
	Liite 2. Diluentin kromatogrammi spesifisyyttä varten.....	56

LYHENTEET JA TERMIT

API	Active Pharmaceutical Ingredient, vaikuttava aine
DAD	Diode array detector, diodirividetkatori
ICH	The International Council of Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
In-House standardi	Referenssistandardia vasten sertifioitu sekundääristandardi
LOD	Limit of Detection, toteamisraja
LOQ	Limit of Quantitation, määritysraja
Matriisi/plasebo	Lääkevalmiste ilman vaikuttavaa ainetta
Näytevoide	Oikeellisuuskokeita varten valmistettu voidetuotetta vastaava valmiste
OLS	Ordinary Least Squares, pienimmän neliön summa prosentteina
PDA	Photodiode array detector, valodiodirividetkatori
PEEK	Polyeetterieetteriketoni
PTFE	Polytetrafluorieteeni
psi	Pounds per Square Inch, paunaa neliötuumaa kohden, paineen yksikkö
RRF	Relative response factor, suhteellinen vastekerroin
SOP	Standard Operating Procedure, standardoitu toimintaohje
TUV	Tunable UV-detector, viritettävä UV-detektori
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography
VWD	Variable Wavelength Detector, vaihdeltavan aallonpituuden detektori
%LC	Label Claim %, prosentuaalinen nimellispitoisuus
%RSD	Relative Standard Deviation, prosentuaalinen suhteellinen standardipoikkeama
%y-leikkauspiste	Sovitetun suoran y-akselin leikkauspisteen osuus valitusta tasosta

1 JOHDANTO

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on luoda optimoitu analyysimenetelmä, joka olisi nopeampi, helpompi ja turvallisempi, ja joka validoitaisiin käyttöön lääketeollisuuden viranomaisohjeistuksen mukaisesti näin varmistaen menetelmän toimivuus rutiinianalytiikassa. Tarkoituksena on parantaa Santen Oy:llä käytössä olleita nykyisiä näytteenkäsittely- ja analysointimenetelmiä jatkokehittämällä kahta aikaisemmin validoitua näytteenkäsittely- ja analysointimenetelmää, joissa kummassakin oli todettu toiminnallisia puutteita.

Alun perin kyseessä olevalle voidetuotteelle on ollut olemassa kaksi validoitua näytteenkäsittelymenetelmää, joissa molemmissa oli vahvuutensa. Sopimusvalmistajan menetelmä oli suoraviivaisempi ja ajallisesti huomattavasti nopeampi, mutta ongelmaksi menetelmälle oli muodostunut toistettavuus ja oikeellisuus. Lisäksi käytetty tetrahydrofuraani (THF) on vahva liuotin, jolla on taipumusta liuottaa muoviset kapillaarit HPLC:stä, ja joka on terveysriski analysoijalle. Myös standardit olivat liuotettuina THF:n, joka ei ollut rutiinianalytiikassa toimiva liuotin vaikuttavalle aineelle (API), koska toistettavuus oli huono ja tuloserot standardille olivat jopa 0,9 – 5,0 % suuntaansa.

Toisaalta taas Santen Oy:n menetelmä oli aikaa vievämpi ja monivaiheisempi. Näytteenkäsittely sisälsi sykloheksaaniin ja metanoliin liuotukset, pitkiä sekoitus- ja ultraäänihaudejaksoja, typpihaihdutuksen ja suodatuksen kahteen eri otteeseen. Näistä johtuen käytetyssä menetelmässä oli huomattu toistettavuusongelma ja odotettua alhaisempi saanto, kun sitä oli käytetty analyysimenetelmän siirron jälkeen sopimusvalmistajan laboratoriossa. Alhainen saanto oli todettu jo validoinnin aikana ja kaavaan oli sisällytetty saantokerroin.

Haasteellisuutta näytteenkäsittelymenetelmän kehittelyyn tuo itse API, joka on huonosti veteen liukeneva. APIlla on myös taipumus hajota herkästi vesiliuoksissa ja muun muassa valon vaikutuksesta. Toisaalta matriisina voida aiheuttaa ongelmia API:n erottamisessa. Näytteenkäsittelyssä API:n tulisi erota matriisista, jottei mahdolliset voidepohjan jäämät kontaminoisi laitetta, mutta toisaalta API ja sen hajoamistuotteet saataisiin eristettyä mahdollisimman täydellisesti.

Analyysimenetelmän kehitystä ja optimointia arvioitaessa lähtökohtana tutkittiin sekä sopimusvalmistajalla käytössä ollutta analyysimenetelmää ja kolonnityyppiä että Santen Oy:ssä käytettyä analyysimenetelmää. Sopimusvalmistajan menetelmässä oli ongelmina muun muassa riittämätön resoluutio; THF:n piikki eluoitui hajoamistuote A:n piikin kanssa päällekkäin. Santen Oy:ssä kolonnityyppinä alun perin oli käänteisfaasikolonne ja ajoliuoksessa käytettiin ioniparireagenssia. Näillä oli saatu hyviä tuloksia, mutta erien välillä oli suurta vaihtelua. Lisäksi Santen Oy:llä käytössä ollut kolonnityyppi oli tekniikaltaan vanha, eikä sille löytynyt vastaavaa UHPLC-kolonna.

2 NESTEKROMATOGRAFIA

2.1 Nestekromatografian kehitys ja toiminta

Nestekromatografian kehitystyö keskittyy tänä päivänä tekniikoiden ja laitteiston osien optimoimiseen. Esimerkiksi vielä edelleen käytetyin nestekromatografiatyyppejä, käänteisfaasikromatografia, sai alkunsa jo vuonna 1950, mutta sen kehittämistä jatketaan yhä näinä päivinä (Fanali, Haddad, Poole, Riekkola 2017, 5). Myöhemmin markkinoille on tuotu uudenlaisia innovaatioita, kuten gradienttimenetelmät, ioniparikromatografia, puhumattakaan erilaisista kolonneista tai nestekromatografialaitteiston kokoonpanoista. Kokoonpanoihin saadaan vaihtelua esimerkiksi erityyppisten detektorien avulla, joiden teoria voi esimerkiksi perustua absorptioon tai sähkönjohtavuuteen.

Nestekromatografian teoria perustuu tasapainotilaan mobiili- ja stationäärifaasien välillä. Aineen retentioaikaan eli aikaan, jonka se tarvitsee kulkeutuakseen injektorilta detektorille, vaikuttavat kolonnin stationäärifaasin tyyppi, huokoisuus, partikkelien muoto, kolonnin dimensiot ja mekaaninen rakenne. Kromatografinen erotusmenetelmä valitaan halutun tai tarvittavan erotusmekanismin perusteella, joista yleisimpiä ovat kokoekskluusio-, ioninvaihto-, adsorptio- ja partitiokromatografia. Kaiken kaikkiaan HPLC erotusmenetelmiä on 21 erilaista, joista monet sivuavat toisiaan. Valittaessa nestekromatografia näytteen analysointiin on näytteen liuettava liuottimeen. (Moldoveanu & David 2012, 9–14)

Perinteinen nestekromatografia ja etenkin HPLC-laitteistot ovat vielä tänäkin päivänä käytetyimpiä tekniikoita kvantitatiiviseen ja kvalitatiiviseen analysointiin sekä identifiointiin huolimatta uuden sukupolven kromatografialaitteista, kuten UHPLC:stä. HPLC:tä käytetään kautta linjan lääketieteellisyydessä aina lääkeaineen kehityksestä jokapäiväiseen laadunvalvonnan rutiinianalytiikkaan. (Hassan 2012) Ennen vuosituhatien vaihdetta spektroskooppiset menetelmät ja kaasukromatografia olivat yleisesti käytössä, mutta nestekromatografian kehittyessä HPLC:t alkoivat korvata kyseisiä menetelmiä. HPLC:n voittokulku perustuu nestekromatografian monipuolisuuteen ja kykyyn muokata analyysin aikana olosuhteita hyödyntäen analyttien kemiallisia ominaisuuksia. Lisäksi HPLC:n detektorivalikoima on huomattavasti laajempi kuin esimerkiksi kaasukromatografiassa, ja uusia innovaatioita

syntyy koko ajan. Riippuen detektorista, eroteltu näyte voidaan kerätä talteen jatkoanalyysia varten, toisin kuin kaasukromatografiaa käytettäessä. (Nikolin, Imamović, Medanhodžić-Vuk, Sober 2004)

Trendi HPLC-tekniikassa on painottumassa koko ajan UHPLC:n sukupolveen. Vanhoja HPLC-laitteita korvataan koko ajan enenevässä määrin UHPLC:llä, joka myös osaltaan tuo UHPLC:n markkinahintaa alaspäin. Tällä hetkellä HPLC-laitteistoja kehitellään UHPLC-laitteiden suuntaan, eli isoimpana muutoksena kestävämpään suurempia paineita. Kuitenkin HPLC:n konfiguraatioilla ei voida saavuttaa UHPLC:n paineen kestävyyttä, joten väistämättä myöhemmin on edessä laitekannan päivittäminen, mikäli tavoitellaan parempaa suorituskykyä. Myös taloudellisesti ja ympäristöä ajatellen painostus UHPLC:n suuntaan on suuri, sillä koko ajan enemmän panostetaan ympäristöystävällisyyteen ja menojen karsimiseen. Nämä saadaan saavutettua uuden sukupolven nestekromatografiolla, joka tehokkaammin erottelee komponentit lyhyemmässä ajassa pienemmällä volyymilla. (The Evolution of UHPLC in Pharmaceutical Analysis 2015)

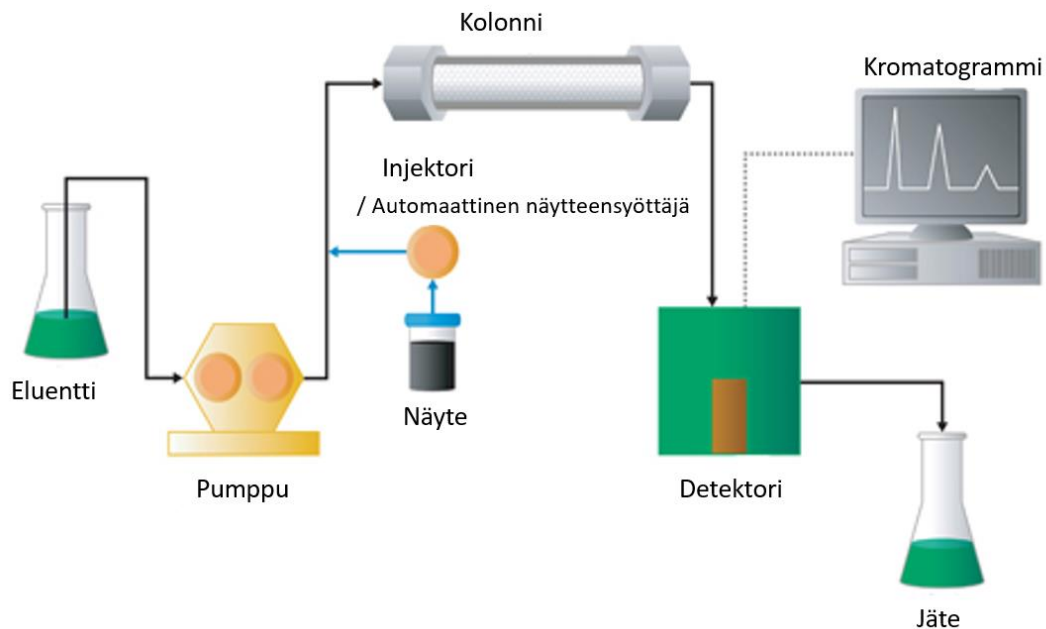
2.1.1 Partitiokromatografia

”*Similia similibus solvuntur*”, eli samanlainen liuottaa samanlaista. Partitiokromatografia perustuu eri faasien poolisuuteen ja stationäärifaasin kahteen osaan, kantajamateriaaliin ja siihen kiinnittyneeseen liuosfaasiin. Poolisuuseron ollessa riittävän merkittävä, pysyvät stationäärifaasi ja eluentti toisistaan erottuneina, esimerkkinä partitiokromatografiassa paljon käytetty oktanoli-vesiseos, jossa vesi kyllästyy oktanolista hyvinkin pienistä määristä. (Vailaya & Horváth 1998, 1–27)

Aineella on siis taipumus liueta faasiin, jonka poolisuus on lähempänä aineen poolisuutta. Nestekromatografiassa yleisesti käytetään hyväksi neste-neste-kromatografiaa, jossa stationäärifaasiin kiinnittynyt liuosfaasi ja eluentti ovat nestemäisessä muodossa. Tämä edelleen jaetaan normaali- ja käänteisfaasipartitiokromatografioihin. Normaali- ja käänteisfaasissa stationäärifaasin kantajamateriaali on poolinen, liuosfaasin ollessa poolisempi kuin eluentti. Käänteisfaasissa kantajamateriaali on pooliton ja liuosfaasi poolittomampi kuin eluentti. (Parris 1984, 193–202; Vailaya ym. 1998, 1–27)

2.2 Korkean erotuskyvyn kromatografia

High Performance Liquid Chromatography (HPLC), korkean erotuskyvyn nestekromatografia on analyysitekniikka, jossa näytteen molekyylien erottamiseen toisistaan käytetään korkeaa painetta, joka työntää yhdisteet tiiviisti pakatun kolonnin läpi ja jossa erottuminen lopulta tapahtuu. Kuviossa 1 on esiteltyä nestekromatografian toiminta yksinkertaistettuna kuvana. Niin kutsutut yleisosat, jotka löytyvät pääasiallisesti jokaisesta HPLC-laitteesta ovat eluentin jakelujärjestelmä, pumput, injektori, kolonni ja detektori. Lisäksi laitteisto on nykypäivänä yleensä liitettyä tietokoneeseen ja käytetty mobiilifaasi ohjataan detektorilta jäteastiaan, joka hävitetään asianmukaisesti.



KUVIO 1. HPLC:n pelkistetty havainnekuva (Kuva: Waters Corp. 2015. Muokattu suomenkieliseksi)

Pumpun tehtävänä on pumpata eluenttia suurella, mutta tasaisella voimalla tiivisti pakatun kolonnin läpi aina detektorille asti. Tasainen virtaus on edellytys hyvälle herkkyydelle ja pidentää kolonnin elinikää. Yleisimmät pumpputyypit ovat niin kutsutut resiprookkipumppu ja pneumaattinen pumppu. Resiprookkipumppu sisältää vain yhden männän, jonka avulla eluentti virtaa sisään ja ulos yhden suuntaisesta venttiilistä. Pneumaattisessa pumpassa kaasu liikuttaa joko mäntää tai suoraan eluenttia. (Jaarinen & Niiranen 2005, 153, 163; Meyer 2010, 59–62)

Kolonnissa erottuneet molekyylit ajautuvat detektorille eluentin mukana kolonniuunin jälkeen. Herkkä detektori havaitsee pienemmätkin muutokset eluentissa, jolloin molekyylistä tulee ajoliuoksesta eroava signaali. Havaitsemistapa vaihtelee detektorityypin mukaan; taitekerroin-, fluoresenssi- ja UV/Vis-detektorit ovat yleisimpiä, mutta myös sähkökemiallisia ja johtokykydetektoreita käytetään runsaasti. (Jaarinen & Niiranen 2005, 165–169) Detektoreista tarkemmin kappaleessa 2.5.

2.3 Ultrakorkean erotuskyvyn kromatografia

Kun verrataan HPLC:tä ja ultrakorkean erotuskyvyn kromatografiaa (UHPLC, Ultra High Performance Liquid Chromatography), ovat ne toimintaperiaatteiltaan samanlaisia keskenään. Suurimman eron näiden välille tekee laitteistojen suorituskyvyt, jotka ovat täysin eriävät toisistaan. Suorituskyvyllä tässä tapauksessa tarkoitetaan muun muassa laitteiston herkkyyttä, laitteen antamaa resoluutiota, analyysi-aikaa, piikkien muotoa ja paineen kestoa. Siinä missä suurin osa HPLC-laitteistoista kestää noin 6000 psin paineen, vastaavasti nykypäivänä UHPLC-laitteistot kestävät jopa 19000 psin paineen (Fanali ym. 2017, 10). On puhuttu nestekromatografialaitteen kehittämistä kestävämmään jopa noin 45000 psin paineet, mutta ongelmina näin korkeissa paineissa ovat viskoosinen kitka ja eluentin kokoonpuristuvuus (Meyer 2010, 353–355; Ahuja & Dong 2005, 624).

Suuremmalla paineensietokyvyllä ja kolonnin pienemmällä partikkelikoolla on puolensa, esimerkiksi virtausnopeutta voidaan laskea ja silti saada erinomainen erottelukyky paineen säilyessä korkeana (What is the Difference... 2014, Behnoush ym. 2015). Komponenttien erottuminen tapahtuu nopeammin, jolloin myös ajoaika lyhentyy jopa 5 – 20 kertaista. Viskoosista aiheutuva kitka tuo kuitenkin omat ongelmansa, joita ei juurikaan HPLC:llä työskennellessä ole. Kitka syntyy eri nestepintojen hankautuessa toisiinsa suurissa virtausnopeuksissa ja paineissa lämmittäen kolonnia ja eluentia. Eluentin lämpötilan muutos muuttaa myös eluentin viskositeettia, joka puolestaan muuttaa analyysin retentioaikaa ja aiheuttaa piikin leventymistä. (Guillarme & Veuthey 2012, 2; Grinias, Wong, Kennedy 2016, 42–50)

2.4 Kolonni

Kromatografiassa tapahtuva yhdisteiden erottuminen on aina kolonnista riippuvaista. Voidaan siis sanoa, että ilman kolonnia yhdisteiden erottumista ei juurikaan voi tapahtua. Kolonnin ulkokuoressa käytetään useimmiten 316-luokan ruostumatonta terästä, johon on lisätty korroosiolta suojaamaan kromi-nikkeli-molybdeeniseosta. Kyseessä oleva seos myös parantaa teräksen paineen kestävyyttä. Muita vähemmän käytettyjä ulkokuoren materiaaleja ovat esimerkiksi lasi, polyeetterieetteriketoni (PEEK), sekä harvinaisempi tantaali. (Meyer 2010, 117)

Kolonnin pakkausmateriaalit voidaan jakaa karkeasti kolmeen ryhmään; huokosettomat, pinnallisesti huokoiset ja täysin huokoiset. Huokosettomassa materiaalissa on hyvät ja huonot puolensa, alhaisen pinta-alansa vuoksi materiaali ei juurikaan kestä kuin hyvin pieniä näytemääriä. Toisaalta huokosettoman materiaalin kanssa ei ole huokosdiffuusiota tai aineensiirtokerrointa (*C*, Van Deemterin yhtälö). (Guillarme & Veuthey 2012, 50) Huokosettomuus tuottaa myös korkeita lämpötiloja kovissa paineissa. Jorgensonin työryhmä Pohjois-Carolinan yliopistossa testasi 1990-luvulla kaupallista huokosetonta pakkausmateriaalia saaden teoreettiseksi pohjaluvuksi jopa 480 000 metrille ja saavuttivat 60 000 psin paineen. (MacNair, Lewis, Jorgenson 1997, 983–989) Kyseinen pohjaluku on huomattavan suuri, kun vertaa esimerkiksi UHPLC-kolonnin pohjalukua, joka saattaa olla 200 000 metrillä. (Walter, Andrews 2014) Edellä mainittujen haittojen vuoksi UHPLC kolonneissa käytetään pääasiallisesti täysin huokoista pakkausmateriaalia, joka voidaan jakaa silikapohjaisiin ja hybridimateriaaleihin. Hybridimateriaali sisältää yleensä epäorgaaninen/orgaaninen-aineosin. Tavallisesti käytettyjä ovat silikametyyli, ja etyleenisillalla liitetty epäorgaaninen ryhmä, kuten silika. (Guillarme & Veuthey 2012, 50)

Silikapohjaiset kolonnit yleensä jaetaan käänteisfaasikolonneihin, jossa pinta on pooliton ja normaalifaasi-, ioninvaihto- ja hydrofiilisesti vuorovaikuttavaan kolonniin, joissa on poolinen pintamateriaali. (Guillarme & Veuthey 2012, 51) Silikan suuri käyttöaste kolonneissa johtuu sen monipuolisuudesta. Se on jo itsessään erinomainen adsorbentti, jonka silanoliryhmiin on helppo kemiallisesti liittää suuriakin sivuryhmiä. Lisäksi nykYTEKNIKAN ansiosta silikan puhdistaminen erittäin puhtaaksi on mahdollista, jolloin haastavampienkin analyyttien piikkien muodot ovat parantuneet huomasti. (Meyer 2010, 125; Ahuja & Dong 2005, 102) Yleisimmät sidotut ryhmät ovat esimerkiksi

C₁₈- ja C₈-hiiliryhvät, jotka ovat erittäin poolittomia, mistä johtuen ajo-olosuhteet pystytään säilyttämään stabiilimpina ja mobiilifaasina yleensä voidaan käyttää halvempia eluenteja, kuten vettä, jossa modifiaerina käytetään pientä määrää orgaanista liuotinta, esimerkiksi metanolia tai asetonitriiliä. (Jaarinen & Niiranen 2005, 156; Ahuja & Dong 2005, 103)

Partikkeleiden koot vaihtelevat yleisesti HPLC-kolonneissa 3 – 10 µm välillä. Vastaavasti UHPLC-kolonneissa partikkeli kokoa on pystytty pienentämään. Uudenlaisella kolonnin pakkaamisella saadaan aikaiseksi jopa alle 2 µm partikkelikoot, jolla kolonnin tehokkuus on kasvanut merkittävästi pituuden lyhentyessä. (Guillarme & Veuthey 2012, 1–3) Partikkelikoon pienentyessä taustapaine nousee; esimerkiksi partikkelikoon laskiessa 3,5 µm:stä 1,7 µm:n (muutos 2 µm:ä), nousee paine nelinkertaiseksi, joka rajoittaa etenkin HPLC-kolonnin pakkaamista. (Guillarme & Veuthey 2012, 29–30; Taleuzzaman ym. 2015, 1056).

2.5 Detektorit

2.5.1 Vaihdeltavan aallonpituuden detektori

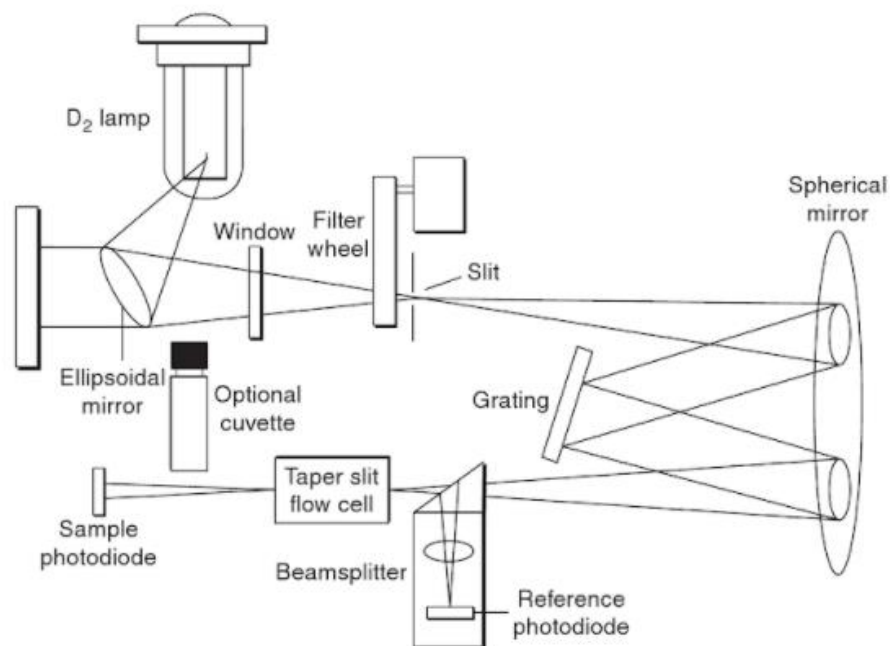
Vaihdeltavan aallonpituuden detektori (VWD, Variable Wavelength Detector) käyttää valonlähteenä deuteriumlampua, jonka emittoima aallonpituus on 190 – 600 nm. Erilaisten peilien, linssien ja suodattimien ansiosta valonsäde saapuu hilalle, joka hajottaa säteen aallonpituuksien mukaan. Kääntämällä hilan kulmaa saadaan valittua haluttu aallonpituus, joka ohjataan peileillä säteenjakajalle. Säteenjakaja ohjaa osan säteestä virtauskyvetille, jossa virtaa eluentti ja osan referenssidiodille, jolla mitataan absorptioitumatonta intensiteettiä. Virtauskyvetille ohjattu säde jatkaa matkaansa kyvetin läpi näytetidiodille, jolla mitataan valon intensiteetti näytteen jälkeen.

Isoimpina eroina yleisesti käytettyyn diodirividetektoriin (DAD) VWD:ssa ovat pelkän deuteriumlampun käyttäminen, (DAD:ssa käytetään deuteriumlampun lisäksi myös tungstenlampua) sekä referenssidiodin puuttuminen. Referenssisäteen käyttämisen sijaan DAD:ssa haetaan absorptioitumaton intensiteetin taso käynnistettäessä detektori tai vaihtoehtoisesti ajoa aloittaessa. Pohjaviivan korjauksiin DAD käyttää

referenssiaallonpituutta, jolla ei saisi ajossa absorptoitua mitään. VWD:lla tämä korjataan myös referenssisäteen avulla. (Corradini, Eksteen, Schoenmakers, Miller 2011, 543–547; Agilent Technologies 2016, 24–25)

2.5.2 Viritettävä UV-detektori

Tunable UV –detektori (TUV) on osa Watersin suurempaa Acquity-tuotemerkkisarjaa (kuvio 1). Se toimii aallonpituusalueella 190 – 700 nm ja, kuten monissa muissakin UV-detektoreissa myös TUV:ssa käytetään deuteriumlamppua. Deuteriumlampun tuottama emissio tuottaa tasaisesti UV-valoa, mutta tuottaa jonkin verran ongelmia näkyvän valon ja lähellä infrapunavalon alueita. Tämän heikkouden paikkaamiseksi monet valmistajan lisäävät tungstenista valmistetun filamentin lamppuun parantaen näkyvän valon ja infrapuna-alueen signaaleja.



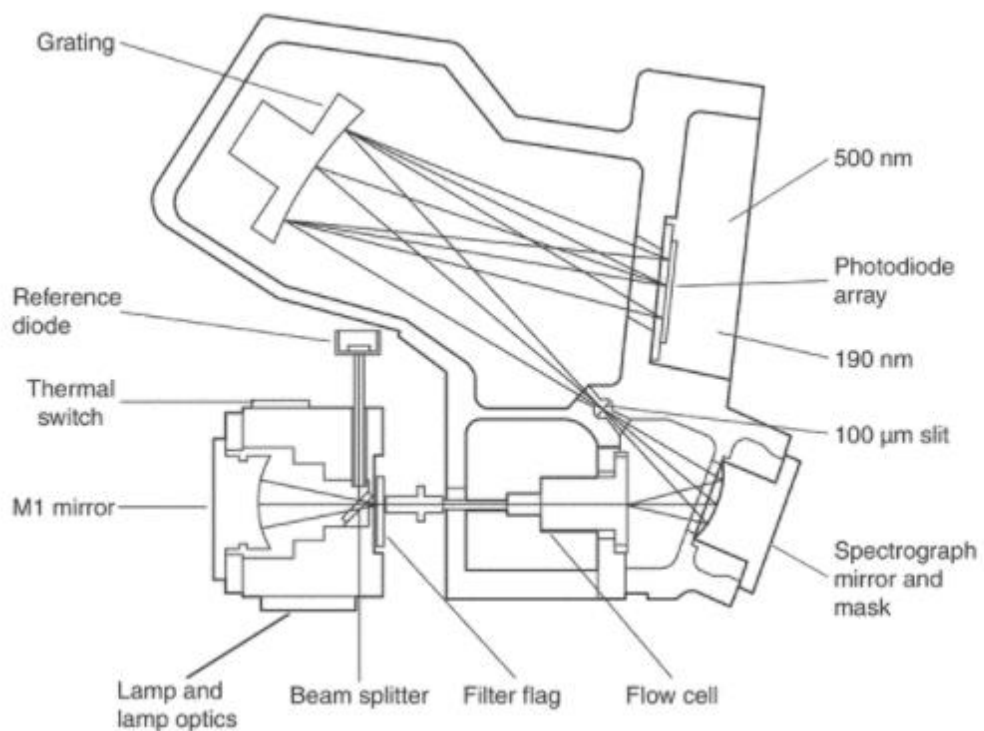
KUVIO 1. TUV-detektorin kokoonpano (Wilson, Poole 2009, 448)

Vahvimmillaan TUV on, kun tarvitaan detektointia yhdellä spesifisellä aallonpituudella, esimerkiksi laadunvalvonnassa, jossa tiedetään ennalta mitä etsitään ja millä parametreilla. Yksittäinen aallonpituus saadaan aikaiseksi diffraktiohilalla, ja hilaa voidaan säätää esimerkiksi ajastetun ohjelman avulla saman ajon aikana. Detektorilla on myös mahdollista mitata useammalla aallonpituudella saman ajon aikana, mutta sitä ei

juurikaan käytetä hilan liikuttamiseen kuluvan ajan vuoksi. Hilan liikuttaminen lisää myös pohjavaiivan meluisuutta. (Wilson & Poole 2009, 442–444, 448)

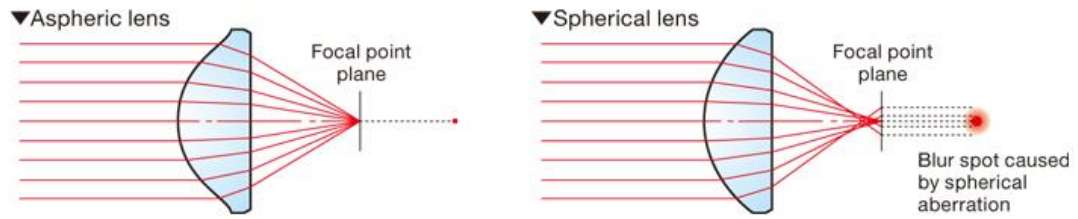
2.5.3 Valodiodirividetektor

Valodiodirividetektor (PDA, Photodiode Array detector) on detektor (kuvio 2), jolla voidaan tarkastella laajempaa aallonpituusalueutta samanaikaisesti, ja jolla voidaan luoda niin 2D- kuin 3D-kromatogrammeja. PDA:ta usein käytetään analyytin identifiointiin ja epäpuhtauksien tutkimiseen vertailemalla saatua kromatogrammia standardikirjastoon. PDA käyttää deuteriumlamppua aallonpituuksien aikaansaamiseksi.



KUVIO 2. PDA-detektorin kokoonpano (Wilson, Poole 2009, 447)

Jotta korkea resoluutio voidaan säilyttää laajalla skaalalla aallonpituuksia, on valon poistumisrako kapeampi kuin UV-detektorissa (WVD ja TUV) käytetty, ja optiikan määrä on pelkistetty. Linssien sijaan käytetään asfäärisiä peilejä kromaattisen poikkeaman välttämiseksi. Asfäärinen muoto on esitettyä kuviossa 3 linssien avulla.



KUVIO 3. Ero asfäärisen ja sfäärisen eli pallomaisen linssin välillä (Global Optosigma, 2018)

Lähtiessään valonlähteeltä valo osuu ensimmäisenä kuperaan peiliin, joka kerää valon säteeksi ja osa valonsäteestä ohjataan referenssidiodille. Loput säteistä menevät virtauskyvetille, josta säde ohjataan toiselle peilille ja raolle. Virtauskyvetiltä lähteneet liian poikkeavat säteet jäävät toisella peilillä sijaitseviin rakoihin. Toiselta peililtä raosta ulos päässeet säteet jatkavat hilan kautta diodeille. (Wilson, Poole 2009, 443–444, 447–448; Choi n. d.)

2.6 Van Deemterin yhtälö

Laitteistojen erotuskykyä tarkasteltaessa käytetään van Deemterin yhtälöä, jolla pääasiallisesti arvioidaan kolonnin tehokkuutta pohjan korkeuden, H , avulla. Se voidaan esittää kahdessa muodossa (yhtälöt 1 ja 3) ja yhtälön 3 avulla voidaan esittää van Deemterin käyrä (kuvio 5). Toinen yhtälöistä on

$$H = \frac{L}{N} \quad (1)$$

jossa tunnuksat

H = teoreettinen pohjan korkeusekvivalentti

L = kolonnin pituus

N = teoreettinen pohjaluku.

Kolonnin tehokkuus esitetään teoreettisena pohjalukuna, N . Pääsääntöisesti mitä suurempi kolonnin pohjaluku, sen tehokkaammin se erottelee komponentit ja sitä kapeammat piikit kromatogrammissa. Teoreettinen pohjaluku voidaan useimmiten laskea piikin retentioajan ja pohjan leveyden suhteena kaavalla

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_t}\right)^2 \quad (2)$$

jossa tunnuksset

t_R = piikin retentioaika

w_t = piikin pohjan leveys.

Yhtälön 3 avulla voidaan laskea tarkemmat arvot van Deemterin käyrälle, kun kyseessä oleva yhtälö huomioi tarkemmin erilaisia teoreettisia arvoja, kuten eddy diffuusion, aksiaalisen diffuusion ja aineensiirtokerroimen. Yhtälö voidaan kirjoittaa muotoon

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (3)$$

jossa tunnuksset

H = teoreettinen pohjan korkeusekvivalentti

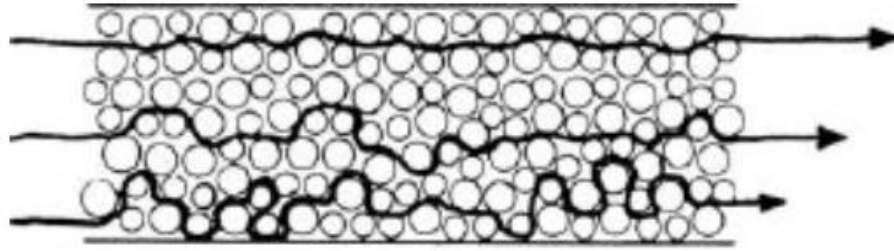
A = Eddy diffuusio

B = aksiaalinen diffuusio

u = liuosfaasin lineaarinen virtausnopeus

C = aineensiirtokerroin.

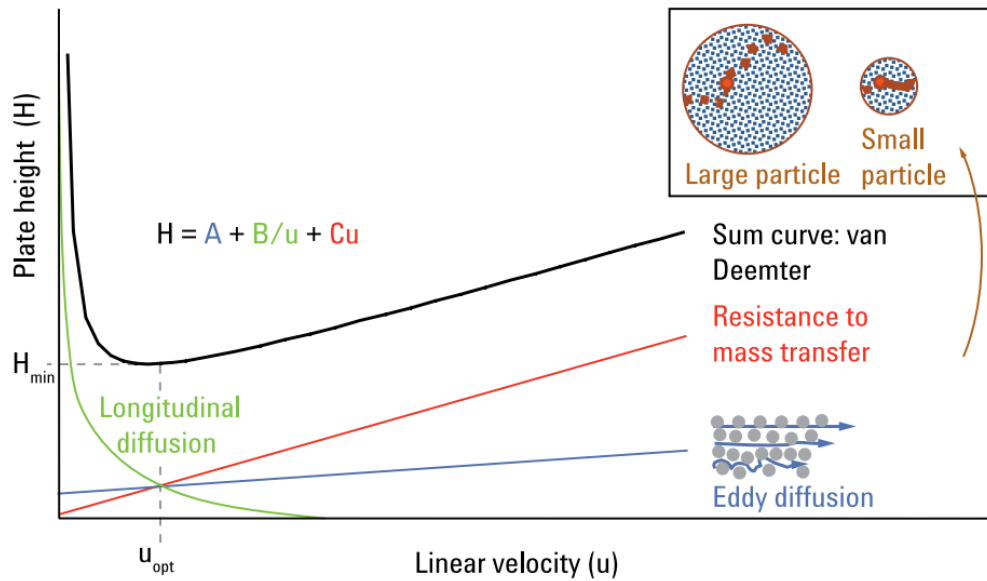
Eddy diffuusio, A , eli pyörrediffuusio (kuvio 4) on kolonnissa tapahtuva ilmiö, joka johtuu kolonnin materiaalin pakkauksessa tapahtuneesta epätasaisuudesta. Eddy diffuusion aikana osa kolonniin ajetuista partikkeleista poistuu huomattavasti suoraviivaisemmin ja nopeammin kolonnista, kun taas osa partikkeleista kulkee mutkikkaamman reitin ja jää kolonniin pidemmäksi aikaa (kuvio 4). Pakkaamisen lisäksi eddy diffuusion vaikuttavat partikkeleiden koko, muoto, seinämien materiaali ja sileyys, sekä kolonnin halkaisija. Tämä ilmiö aiheuttaa piikin leventymistä kromatogrammissa. (Meyer 2010, 20; What is the Difference Between... 2014)



KUVIO 4. Eddy diffuusion vaikutus virtaukseen kolonnissa (Meyer 2010, 20)

Aksiaalinen diffuusio, B , kuvaa näyterintaman leviämistä eluentissa kolmiulotteisesti ilman ulkoisia voimia. Myös tämä ilmiö aiheuttaa piikin leventymistä. Aksiaalinen diffuusio vaikuttaa pohjalukuun vain, mikäli stationäärifaasin partikkelikoko on pieni ja käytetään liian pientä virtausnopeutta suhteessa partikkelikokoon tai mikäli diffuusiokerroin on suuri. (Meyer 2010, 21) Diffuusiokerroin määrittelee molekyylien liikkeen nesteessä ja on riippuvainen lämpötilasta ja viskositeetista (Nikolaropoulos, Arvanitopoulou, Katsanos 1995, 639–642).

Aineensiirtokerroin, C , voidaan edelleen jakaa kaiken kaikkiaan viiteen osaan, joista aineensiirtokerroin mobiilifaasissa, C_m , ja aineensiirtokerroin stationäärifaasissa, C_s , ovat tärkeimmät vaikuttajat. Aineensiirtokerroin mobiilifaasissa ilmiönä selittyy eluentin nopeammalla liikkumisella kolonnin seinämällä, kuin stationäärifaasin välissä, jolloin näyte liikkuu nopeammin ulos kolonnista seinämien läheltä. Aineensiirtokerroin stationäärifaasissa esittää osaltaan näytteen vuorovaikutusta stationäärifaasiin ja tämän vuorovaikutuksen aiheuttamaa matkan pituutta. Virtausnopeutta laskemalla voidaan molemmissa tapauksessa ennaltaehkäistä piikin leventymistä. Muita merkityksellisiä osia aineensiirtokertoimessa ovat stationäärifaasin koostumus, jossa tulisi käyttää pieniä partikkeleita, tai partikkeleita joilla on ohut ja huokoinen pinta. Lisäksi pieni viskoosiset eluentit ovat suositeltavia. (Meyer 2010, 355)



KUVIO 5. Van Deemterin kuvaaja (Agilent Technologies 2016, 11)

Van Deemterin käyrä (kuvio 5) esitetään lineaarisen virtausnopeuden, u , funktiona, josta voidaan arvioida optimaaliset ajo-olosuhteet tiettyntyyppiselle kolonnille. Tavoitteena on saada mahdollisimman pieni pohjan korkeus, H , jolloin voidaan tuottaa suurin erottuvuus. Partikkelikoko, optimoitu virtausnopeus ja käytetyn eluentin alhainen viskositeetti ovat parhaita vaikuttajia erottuvuuteen. (Agilent Technologies 2016, 11)

3 VALIDOINNIN TARKOITUS

Validoinnissa käytetyt parametrit perustuvat ICH:n (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) ohjeistukseen Q2® “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology”, jonka tarkoituksena on harmonisoida ihmisillä käytettyjen lääkkeiden analyysien validointiparametrit Japanin, Euroopan ja Yhdysvaltojen alueilla. Ohjeistus ei välttämättä sisällä kaikkia rekisteröintiä varten tarvittavia osa-alueita, vaan tarkoituksena on toimia ohjenuorana eri maiden lääketeollisuuden toimijoille. Seuraavaksi esiteltävien validoinnin parametrien ohjeistukset perustuvat Santen Oy:n sisäiseen standardoituun toimintaohjeeseen (SOP, Standard Operating Procedure), jonka perustana on käytetty ICH:n ohjeistusta. Validoinnin osia olivat spesifisyys, hajotuskokeet, toteamis- ja kvantitointiraja, lineaarisuus ja määrittäminen, toistettavuus, oikeellisuus ja saanto, haavoittuvuus, liuosten säilyvyys ja suhteellinen vastekerroin.

Menetelmän spesifisyydellä tarkoitetaan tutkittavan analyysin yksiselitteistä erottamista epäpuhtauksista, matriisista ja hajoamistuotteista, sekä todentamista etteivät edellä mainitut eluoidu häiritsevästi analyysin kanssa. Spesifisyyttä tutkittaessa yleensä analysoidaan analyytti, synteesiepäpuhtaudet, hajoamistuotteet, hajotuskokeiden näytteet, plasebo, diluentti ja eluentti. Samalla varmistetaan hajotuskokeilla, ettei matriisista synny häiritseviä komponentteja tunnettujen epäpuhtauksien ja hajoamistuotteiden lisäksi. Hajotuskokeissa API:n valmistetta, standardia ja plaseboa altistetaan lämmölle, valolle, hapolle, emäkselle ja hapettimelle. Tavoitteellinen hajoamistaso on n. 15 % kontrollinäytteeseen verrattuna, mutta 10 – 30 % hajoamistaso on hyväksyttävä vaihtelu. API:n piikin puhtaus osoitetaan laajalla UV-spektrillä (PDA-detektorilla), jota verrataan kontrollinäytteen spektriin.

Toteamisrajan (limit of detection, LOD) ja kvantitointirajan (limit of quantitation, LOQ) tutkimuksella haettiin menetelmälle ja käytössä olevalle analyysille alin konsentraatiotaso, jolla näyte voidaan kvantitoida riittävällä toistotarkkuudella ja oikeellisuudella. Toteamis- ja kvantitointiraja arvioidaan signaali/kohina-suhteella (S/N). Vertailukohina saadaan piikkiä kromatogrammissa ympäröivältä alueelta, jossa ei ole muita piikkejä.

Lineaarisuuden tarkoituksena oli osoittaa korrelaatio APIn ja hajoamistuote piikkien pinta-alojen ja konsentraatioiden välillä. Samalla tutkittiin määrittämisalueen olevan toistettava, lineaarinen ja oikeellinen alimman ja ylimmän konsentraation välillä. Oikeellisuudessa ja saannossa tarkoituksena oli osoittaa analyysin tulosten oikeellisuus, eli esittää analyysitulokset verrattuna teoreettiseen arvoon saantoprosenttina.

Systeemin toistettavuudella arvioitiin systeemin sopivuutta ja tarkkuutta kyseessä olevalle analyysimenetelmälle injektioimalla useita kertoja samasta näyteliuksesta. Samalla määritetään systeemin sopivuus (system suitability) -testaukselle parametrit, joilla varmistettiin systeemin toimivuus ja tulosten luotettavuus rutiinianalytiikan aikana jokaisen sekvenssin alussa. Menetelmän toistettavuudella osoitettiin etenkin näytteenkäsittelyn olevan toistettava samalla menetelmällä tehtäessä useita näytteitä voidevalmisteesta. Toisin sanoen parametrilla tutkittiin tulosten hajontaa samoissa olosuhteissa lyhyen ajan sisällä. Myös laboratorion sisäinen toistotarkkuus tutkittiin samalla periaatteella, mutta olosuhteita muutettiin enemmän. Perinteisiä olosuhteiden muutoksia ovat eri laitteella analysointi, useat eri analysoijat ja mahdollisesti esimerkiksi ajaminen kolonnilla, jolla on eri eränumero.

Haavoittuvuuskokeiden tarkoituksena oli testata ajo-olosuhteiden muutoksien vaikutusta tulokseen. Havaitut olosuhteet kirjataan analyysiohjeeseen joko kriittisinä muutoksina, tai muutoksina joiden rajoissa analyysin sallitaan vaihtelevan. Stabiilisuuden tarkoituksena oli osoittaa näytteiden ja standardiliuosten säilyvyys tunnetuissa säilytysolosuhteissa. Säilyvyys osoitettiin vertailemalla eri ajankohtina ajettujen näyteketjujen samojen näytteiden pinta-aloja keskenään pitoisuus laskettuna aina tuoreeseen standardiin nähden. Suhteellisella vastekertoimella (Relative Response Factor, RRF) korjataan APIn ja tunnettujen epäpuhtauksien vasteiden välistä eroa. APIn hajotessa sen hajoamistuotteilla ei välttämättä ole samoja kromoforeja (absorpoivia ryhmiä), jolloin vaste saattaa olla pienempi APIlle optimoidulla aallonpituudella.

4 NÄYTTEENKÄSITTELY JA ANALYYSIMENETELMÄN KEHITYS

4.1 Näytteenkäsittely

Näytteenkäsittelymenetelmän kehitys aloitettiin vertailemalla sopimusvalmistajan menetelmällä valmistettuja näytteitä muokattuihin näytteenkäsittelymenetelmiin. Muokattujen näytteenkäsittelymenetelmien pohjana käytettiin sopimusvalmistajan näytteenkäsittelyä (taulukko 1). Pääasialliset muutokset kehitetyn näytteenkäsittelymenetelmän eri versioiden välillä olivat liuotustilavuudet ja haihdutuslämpötilat.

TAULUKKO 1. Sopimusvalmistajan näytteenkäsittelymenetelmä

-
1. Punnitse tarkasti 0,5 g voidetta ja liuota 10,0 ml THF:n. Tuloksena homogeeninen seos
 2. Laimenna 1:1 kylmään veteen (6,0 ml + 6,0 ml)
 3. Sekoita ja jäähdytä jääkaapissa 5 min, jolloin rasva nousee pinnalle
 4. Ruiskusuodatus näytepulloon Acrodisc® CR PTFE 25 mm, 0,45 µm
-

Ensimmäisissä versioissa sopimusvalmistajan menetelmään lisättiin typpihaihdutus, mutta jätettiin ruiskusuodatus pois olettaen, että kaikki rasva kertyy näytteen pinnalle jääkaapissa seisottaessa. Haihdutuksen jälkeen haihdutusputken pohjalle kuitenkin jäi pieni rasvahelmi ja näin ollen näytettä ei voitu analysoida HPLC:llä laitteen kontaminoitumisen pelossa. Ensimmäisten testausten jälkeen lisättiin mukaan sopimusvalmistajan menetelmän mukaisesti ruiskusuodatus näytteen jäähdyttämisen jälkeiseen vaiheeseen rasvan poistamiseksi haihdutettavasta osasta. Typpihaihduttimen lämpötilaa säädettiin korkeammaksi haihtumisen nopeuttamiseksi samalla seuraten API:n stabiiliutta ja hajoamistuotteiden määriä sopivan lämpötilan löytämiseksi.

Näytteenkäsittelymenetelmän kehityksen aikana testattiin näytteen liuotusta myös etanoliin kylmän veden sijasta. Voidematriisi käyttäytyi odottamattomasti etanolin kanssa muodostaessaan höttöä rasvapaakun sijasta. Rasvaa yritettiin sentrifugoida ja ruiskusuodattaa, mutta kummassakin tapauksessa haihdutuksen jälkeen haihdutusputken pohjalle jäi rasvahelmi, joten etanolin käyttö näytteenkäsittelyssä hylättiin ja menetelmän kehitystä jatkettiin kylmän veden kanssa.

Lopullisessa menetelmässä päädyttiin laimentamaan näyte kylmällä vedellä ennen jääkaapissa jäähdyttämistä ja ruiskusuodattamaan ennen haihdutusta. Tämän jälkeen keskityttiin näytteenkäsittelymenetelmän optimoimiseen. Optimoinnissa haettiin typpihaihdutukselle lämpötila, jonka API kestäisi hajoamatta ja jossa hajoamistuotteiden määrät eivät kasvaisi liian suuriksi. Lisäksi rinnalla testattiin eri konsentraatioita standardille, jotta standardin valmistus olisi toistettavaa ja analysoijalle mielekästä. Standardin konsentraatioon peilaten optimoitiin myös näytteen lopullinen konsentraatio, jonka tuli olla sama standardin kanssa.

Lopullinen menetelmä, joka jo menetelmänkehitysvaiheessa osoitettiin myös toistettavaksi, on esitetty taulukossa 2.

TAULUKKO 2. Validoinnissa käytetty näytteenkäsittelymenetelmä

-
1. Punnitse tarkasti 0,5 g voidetta ja liuota 10 ml:aan THF:a
 2. Laimenna 10 ml:lla kylmää vettä
 3. Sekoita ja jäähdytä 5 minuuttia ($5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$)
 4. Ruiskusuodata näytettä 2 ml koeputkeen (Acrodisc® CR PTFE 25 mm, 0,45 μm)
 5. Pipetoi suodosta 1 ml koeputkeen
 6. Haihduta näyte kuiviin typpihaihduttimella (15 minuuttia, 60 °C)
 7. Jäännöksen liuotus 1 ml:n MeOH:H₂O (50:50,v/v)
-

Lopullisen menetelmän etuina olivat pienemmät tilavuudet. Näytteenkäsittely voidaan suorittaa niin automaattipipetillä, kuin täyspipetilläkin. Lopullinen näyte on rasvaton ruiskusuodatuksen ansiosta, näytteenkäsittelyaika kohtuullistettiin ja THF:sta päästiin eroon haihdutuksen ansiosta.

4.2 Analyysimenetelmän kehitys

4.2.1 HPLC

Laitteistona käytettiin Agilentin 1100-sarjan laitteistoa, jossa detektorina oli VWD. Kolonnina käytettiin xSelect HSS T3-silikapohjaan sidottua käänteisfaasikolonnia, jonka dimensiot olivat 4,6 mm x 150 mm, ja partikkelikoko 3,5 μm . Kyseessä oleva käänteisfaasikolonnityksilö oli aikaisemmin todettu toimivaksi toisen laborantin toimesta

testausajoissa, joten seuraava askel oli testata kolonnierien vaihtuvuuden vaikuttavuutta erotukseen. Uuden erän kolonni otettiin käyttöön laitevalmistajan ohjeiden mukaisesti ja eri erien antamia kromatogrammeja verrattiin päällekkäin toisiinsa, eikä erien välillä havaittu eroavaisuuksia.

Analyysimenetelmän kehitys aloitettiin muuttamalla menetelmä isokraattisesta gradienttimenetelmäksi resoluution parantamiseksi ja nopeuttamaan viimeisenä eluoituvan piikin (peräpiikin) eluoitumista. Varsinaisen gradienttimenetelmän luomiseen kokeiltiin kaiken kaikkiaan 15 erilaista gradienttia ja menetelmän optimoimiseksi suoritettiin vielä 13 sekvenssiä.

TAULUKKO 3. Gradienttimenetelmä HPLC:lle

Aika (min)	Ajoliuos A 0,01 M perkloorihappo (%)	Ajoliuos B Metanoli (%)
0,00	88	12
3,00	88	12
15,00	65	35
25,00	65	35
25,10	88	12
30,00	88	12

Taulukossa 3 on esitetty lopullinen optimoitu gradienttimenetelmä, jolla saatiin riittävä resoluutio aikaiseksi samalla kun ajoaika pystyttiin lyhentämään isokraattisen menetelmän 60 minuutista 30 minuutiksi. Ongelmalliseksi havaittiin kuitenkin, että Watersin ja Agilentin laitteistojen eroavaisuuksien vuoksi taustapaine nousi testatulla Waters-laitteistolla liian suureksi, eikä menetelmää pystytty siirtämään Agilentin HPLC:ltä Watersin HPLC:lle. Jatkotestauksia Watersin HPLC-laitteistoilla ei tehty kiinnostuksen painottuessa menetelmän siirtämiseen UPLC-laitteistolle.

4.2.2 UPLC

Käytössä ollut konfiguraatio UPLC:lla oli Watersin valmistama H-Class, jossa detektoreina valittavissa TUV ja PDA. Kolonnina oli Watersin Acquity UPLC HSS T3-silikapohjaan sidottu käänteisfaasikolonni, jonka dimensiot olivat 2,1 mm x 75 mm, ja partikkelikoko 1,8 µm. Kyseessä olevaan kolonniin päädyttiin laitevalmistajan

edustajan suosituksesta. Kolonni on vastaava kuin HPLC:ssa käytetty kolonni. Analyysimenetelmä skaalattiin UPLC:n kolonnille sopivaksi Watersin kolonnilaskurilla, johon syötettiin HPLC:lla käytetyt arvot kolonnista, systeemistä ja analyysimenetelmästä (kuvio 7). Systeemien viivästystilavuudet (dwell volume) ovat systeemin käyttöönoton yhteydessä määritettyjä arvoja ja kullekin laitteistokonfiguraatiolle ominaiset.

From...
Describe your original method.

Column Diameter (D): 4,600 mm
Length (L): 150 mm
Particle Size (dp): 3,5 µm
L/dp: 42 857

System Dwell volume: 1,500 mL

Method Injection volume: 20,0 µL
Temperature: 30 °C
Run time: 30,00 min

Time (min)	Flow Rate (mL/min)	%A Water	%B Methanol	%C Acetonitri	%D Water	Column Volumes
1 0,00	1,500	88,0	12,0	0,0	0,0	0,00
2 3,00	1,500	88,0	12,0	0,0	0,0	2,74
3 15,00	1,500	65,0	35,0	0,0	0,0	10,94
4 25,00	1,500	65,0	35,0	0,0	0,0	9,12
5 25,10	1,500	88,0	12,0	0,0	0,0	0,09
6 30,00	1,500	88,0	12,0	0,0	0,0	4,47

To...
Describe your target method.

Column Diameter (D): 2,100 mm
Length (L): 75 mm
Particle Size (dp): 1,8 µm
L/dp: 41 667

System Dwell volume: 0,400 mL
High pressure limit: 1 034 bar

Method Flow rate: Scaled: (0.608 mL/min) Custom: 0,300 mL/min

Time (min)	Flow Rate (mL/min)	%A Water	%B Methanol	Column Volumes
1 0,00	0,300	88,0	12,0	0,00
2 1,56	0,300	88,0	12,0	2,74
3 7,82	0,300	65,0	35,0	10,94
4 13,03	0,300	65,0	35,0	9,12
5 13,08	0,300	88,0	12,0	0,09
6 15,63	0,300	88,0	12,0	4,47

288 bar Maximum pressure

522 bar Maximum pressure **2.1 µL** Injection volume **15.63 min** Run time **244 µL** Pre-injection volume

KUVIO 7. Kolonnilaskurilla skaalattu gradienttimenetelmä

Detektorilla käytetty aallonpituus ja kolonniuunin lämpötila pysyivät samoina kuin HPLC:lla käytettäessä, eli 280 nm ja 30 °C. Gradienttien A ajoliuoksissa mainitaan virheellisesti vesi (Water), vaikka molemmissa tapauksissa kyseessä on 0,01 M perkloorihappo, sillä kyseiseen sarakkeeseen oli mahdollista valita vain oletusarvoisia eluenteja. Kuvassa 6 on laskurin skaalaama gradientti, jonka pohjalta analyysimenetelmä optimoitiin UPLC:lle. Virtausnopeutta nostettiin 0,3 ml/min:sta 0,45 ml/min:iin ja gradienttiin lisättiin gradienttiporras 10 – 13 minuutin kohdalle nopeuttamaan viimeisenä eluoituvan piikin eluoitumista.

TAULUKKO 4. Gradienttimenetelmä UPLC:lle

Aika (min)	Ajoliuos A 0,01 M perkloorihappo (%)	Ajoliuos B Metanoli (%)
0,00	88	12
1,56	88	12
7,82	65	35
10,00	65	35
10,08	55	45
13,00	55	45
13,08	88	12
15,00	88	12

Taulukossa 4 esitetyllä gradientilla resoluutio piikkien välillä on hyvä ja ajoaika saatiin puolitettua verrattuna HPLC:n analyysimenetelmään. Taulukossa 5 on esitettyä ajoliuosten laitekohtaiset kulutukset sekvenssiä kohden.

TAULUKKO 5. Ajoliuosten kulutusten ero laitteiden välillä

	0,01 M perkloorihappo	Metanoli
HPLC	33,91 ml	11,09 ml
UPLC	4,89 ml	1,86 ml

Tehokkaamman erottelun lisäksi etuina UPLC:lle siirtyessä olivat ajoliuosten kulutusten pienentyminen seitsemäsosaan alkuperäisestä. Se osaltaan luo taloudellisuutta ja vähentää ympäristön kuormitusta, sekä suurempi herkkyys ja pienempi näytetilavuus.

5 VALIDOINNIN SUORITUS

5.1 Esivalmistelut

Tutkittavia tunnettuja hajoamistuotteita oli kaiken kaikkiaan kuusi (6) kappaletta, jotka esiintyvät tässä opinnäytetyössä nimillä hajoamistuote A, hajoamistuote B, hajoamistuote C, hajoamistuote D, hajoamistuote E ja hajoamistuote F. Hajoamistuote C:tä lukuun ottamatta hajoamistuotteet olivat kiinteitä jauheita. Osassa validointitestejä näytteenä käytetty vanhentunut voidetuote oli aikaisemmin analysoitua voidetta, jonka tiedettiin sisältävän hajoamistuote A:ta tietyllä pitoisuustasolla. Hajotuskokeissa, spesifisyydessä, oikeellisuudessa ja saannossa, sekä stabiilisuudessa käytetyt näytevoiteet olivat Santen Oy:llä laboranttien itse valmistamia voiteita.

API:n kantaliuos valmistetaan tarkasti punnitsemalla 50,0 mg API:n in-house standardia 100,0 ml:n tummaan mittapulloon ja laimennetaan merkkiin 50 % metanolilla (tästä eteenpäin diluentti). Kantaliuoksen konsentraatioksi saadaan tällöin 0,5 mg/ml. API:n standardi saadaan laimentamalla kantaliuosta suhteessa 1:1 diluentilla, jolloin standardin pitoisuudeksi saadaan 0,25 mg/ml. Kalibrointi suoritettiin niin kutsutulla yksipistekalibroinnilla, jonka oikeellisuus varmistettiin ristitulon avulla toisella standardilla sekä %RSD-arvon avulla.

5.2 Spesifisyys

API:n retentioajan verifioimiseksi valmistettiin API:n kantaliuoksesta standardiliuos, joka injektoidiin kuusi (6) kertaa ja näytevoiteesta näytteenkäsittelymenetelmän mukainen näyte, joka injektoidiin kerran. Spesifisyyden varmentamiseksi ajettiin seuraavanlaiset näytteet; eluentti, diluentti, nollagradientti (injektointitilavuus on 0 µl, antaa kuvan vain gradientin muutoksista aiheutuvista pohjaviivan vaihteluista), API standardi, standardit kaikista kuudesta (6) hajoamistuotteesta pitoisuudella 0,1 mg/ml ja näistä valmistettu hajoamistuoteseos (n. 1 % pitoisuustasolla), plasebo, kontrollinäyte ja hajotuskokeiden näytteet. Näytteet analysoitiin analyysimenetelmän mukaisesti.

5.3 Hajotuskokeet

Lämmölle altistaessa API:n kantaliuosta pipetoitiin 5,0 ml:a erlenmeyeriin ja voiteita (näytevoide ja plasebo) punnittiin tarkasti 0,5 g, jonka jälkeen näytteet siirrettiin 80 °C:een lämpökaappiin. Näytteitä pidettiin lämpökaapissa 3 vuorokautta ja 1 viikko, jonka jälkeen voiteet valmistettiin loppuun näytteenkäsittelymenetelmän mukaisesti ja kantaliuos laimennettiin 5,0 millilitralla diluenttia, jolloin näytteen konsentraatioksi saatiin 0,25 mg/ml.

Valolla hajotettaessa API:n kantaliuosta pipetoitiin erlenmeyeriin 5,0 ml:a ja voiteita (näytevoide ja plasebo) punnittiin tarkasti 0,5 g. Näytteet altistettiin kolmelle erilaiselle olosuhteelle; ensimmäisiä näytteitä valotettiin 7226 luksin valaistusvoimakkuudella 166 tuntia (= 1,2 miljoonaa luksituntia), toinen näyte-erä sai UV-valoa ($\lambda = 365 \text{ nm}$) $802 \frac{\text{Wh}}{\text{m}^2}$:n verran ja kolmas erä näytteitä oli ensin yhdessä ensimmäisen näyte-erän kanssa (1,2 miljoonaa luksituntia), jonka jälkeen vielä UV-valossa $802 \frac{\text{Wh}}{\text{m}^2}$:n verran. Voidenäytteet käsiteltiin loppuun näytteenkäsittelymenetelmän mukaisesti. API:n kantaliuos laimennettiin 5,0 millilitralla diluenttia, jolloin näytteen konsentraatioksi saatiin 0,25 mg/ml.

Hapettaessa API:n kantaliuosta pipetoitiin 2,0 millilitraa erlenmeyeriin ja voiteita (näytevoide ja plasebo) punnittiin tarkasti 0,5 g. Voidevalmistukseen ja plaseboon lisättiin 15 % vetyperoksidia 2,0 ml:a ja kantaliuokseen 1,0 ml. Kaikki näytteet pidettiin valolta suojattuna 1,5 tuntia 80 °C lämpökaapissa, jonka jälkeen API:n kantaliuosta laimennettiin 1,0 millilitralla diluenttia, jolloin konsentraatioksi saatiin 0,25 mg/ml ja voidenäytteet käsiteltiin näytteenkäsittelymenetelmän mukaisesti.

Hapolla hajotettaessa voidevalmistetta ja plaseboa punnittiin tarkasti 0,5 g, joihin lisättiin happona käytettyä 1 mol/l vetykloridia 2,0 ml:a. API:n kantaliuosta pipetoitiin 2,0 millilitraa ja siihen lisättiin vetykloridia 1,0 ml, jonka jälkeen kaikkia näytteitä pidettiin huoneen lämmössä 0,5 ja 1 tuntia. Seisottamisen jälkeen näytteet neutralisoitiin ekvivalentilla määrällä 1 mol/l natriumhydroksidia. Voidenäytteet käsiteltiin näytteenkäsittelymenetelmän mukaisesti.

Emäksellä hajotettaessa voidevalmistetta ja plaseboa punnittiin tarkasti 0,5 g, joihin lisättiin emäksenä käytettyä 1 mol/l natriumhydroksidia 2,0 millilitraa. API:n kantaliuosta pipetoitiin 2,0 millilitraa ja siihen lisättiin natriumhydroksidia 1,0 ml, jonka jälkeen kaikkia näytteitä pidettiin huoneenlämmössä 20 tuntia. Seisottamisen jälkeen näytteet neutralisoitiin ekvivalentilla määrällä 1 mol/l vetykloridia.

Jokainen hajotuskokeen näyte injektoidiin duplikaattina ja analysoitiin UPLC:n TUV-detektorilla. Näytteet ajettiin myös PDA:lla aallonpituusalueella 190 – 400 nm API:n spektrin saamiseksi ja piikin puhtauden varmistamiseksi.

5.4 Toteamis- ja kvantitointiraja

Sopivat toteamis- ja kvantitointiliuosten konsentraatiot oli arvioitu jo menetelmän kehityksen aikana. Sopivaksi toteamisrajan liuoksen konsentraatioksi oli todettu 0,05 µg/ml ja kvantitointirajan vastaavaksi 0,15 µg/ml sekä API:lle, että hajoamistuote A:lle. Taulukossa 6 on esitettyinä API:n ja hajoamistuote A:n liuosten valmistus. Ensimmäisessä vaiheessa liuotettiin kiinteää standardia, jonka jälkeen laimennokset 2 ja 3 olivat liuoksen 1 jatkolaimennoksia. Jokainen laimennos laimennettiin diluentilla.

TAULUKKO 6. API:n ja hajoamistuote A:n liuosten valmistaminen

	API	Hajoamistuote A
1	50 mg / 100 ml	10 mg / 100 ml
2	1 ml / 100 ml	2,5 ml / 100 ml
3	10 ml / 50 ml	20 ml / 50 ml

Laimennosten jälkeen molempia liuoksia pipetoitiin 5 ml 100 ml:n mittapulloon LOD-liuosta varten ja 15 ml:a 100 ml:n mittapulloon LOQ-liuosta varten. Molemmat pullot täytettiin merkkiin diluentilla. LOQ-liuos injektoidiin kuudesti (6) ja LOD-liuos kerran.

5.5 Lineaarisuus ja määrittäsalue

APIsta valmistettiin viidellä eri konsentraatitasolla olevaa liuosta menetelmän standardiliuokseen nähden. Konsentraatitasot olivat 60 %, 80 %, 100 %, 120 % ja 140 %. Liuokset valmistettiin taulukon 7 mukaisesti.

TAULUKKO 7. Lineaarisuuden liuosten valmistaminen

Suhteellinen konsentraatitaso (%)	Konsentraatio (mg/ml)	Kantaliuoksen tilavuus (ml)	Laimennoksen lopputilavuus (ml)
60	0,15	3,0	10,0
80	0,20	4,0	10,0
100	0,25	5,0	10,0
120	0,30	6,0	10,0
140	0,35	7,0	10,0

Hajoamistuotteiden lineaarisuus ja määrittäsalue mitattiin API:n ja hajoamistuote A:n liuoksilla, joiden alin pitoisuus oli sama kuin LOQ-liuoksen pitoisuus (0,15 µg/ml) ja loput pitoisuuksilla 0,10 %, 0,25 %, 0,50 % ja 1,00 % peilaten API:n standardin konsentraatioon (taulukko 8).

TAULUKKO 8. Lineaarisuuden ja määrittäsalueen näytteiden valmistaminen APIlla ja hajoamistuote A:lla

Suhteellinen konsentraatitaso (%)	Konsentraatio (µg/ml)	Väilaimennoksen tilavuus (ml)	Laimennoksen lopputilavuus (ml)
LOQ	0,150	1,5	250,0
0,10	0,250	1,0	100,0
0,25	0,625	2,5	100,0
0,50	1,250	5,0	100,0
1,00	2,500	1,0	10,0

Kantaliuoksen väilaimennoksen konsentraatio oli 0,025 mg/ml ja se valmistettiin laimentamalla 10 ml:a kantaliuosta 100 ml:ksi diluentilla. Jokainen liuos valmistettiin duplikaattina ja ne injektoidiin kerran.

5.6 Toistettavuus

5.6.1 Systeemin toistettavuus

APIlle systeemin toistettavuuden tutkimiseksi valmistettiin standardi ja vanhasta voidevalmisteesta näytteet. Standardia varten APIa punnittiin 25 mg 100 ml:n mittapulloon laimentaen merkkiin diluentilla. Vanhaa voidenäytettä punnittiin tarkasti 0,5 g erlenmeyeriin. Vanhasta voidenäytteestä käsiteltiin näytteenkäsittelymenetelmän mukainen näyte, jonka jälkeen käsitelty näyte ja standardi molemmat injektoitiin kuudesti.

5.6.2 Menetelmän ja laboratorion sisäinen toistettavuus

Menetelmän toistotarkkuutta varten valmistettiin kuusi rinnakkaista näytettä vanhasta voidevalmisteesta punnitsemalla näytettä 0,5 g, jonka jälkeen ne käsiteltiin näytteenkäsittelymenetelmän mukaisesti. Jokainen näyte injektoitiin kerran.

Laboratorion sisäisen toistotarkkuuden osoittamiseksi eri analysoijat valmistivat eri päivinä kuusi rinnakkaista näytettä samasta vanhasta voidevalmisteesta analysoiden eri kolonneilla (taulukko 9).

TAULUKKO 9. Laboratorion sisäisen toistotarkkuuden olosuhteet

Olosuhde	Päivä	Analysoija	Kolonne
1	Päivä 1	Analysoija 1	Kolonne 1
2	Päivä 2	Analysoija 2	Kolonne 1
3	Päivä 3	Analysoija 1	Kolonne 2

Vanhaa voidenäytettä punnittiin kussakin tapauksessa 0,5 g ja ne käsiteltiin näytteenkäsittelymenetelmän mukaisesti. Jokainen näyte injektoitiin kerran.

5.7 Oikeellisuus ja saanto

Oikeellisuutta ja saantoa varten valmistettiin näytevoiteet, joissa konsentraatitiasot vaikuttavalle lääkeaineelle olivat 80 %, 100 % ja 120 % verrattuna todelliseen tuotteeseen. Näytevoidetta punnittiin tarkasti 0,5 g ja ne käsiteltiin näytteenkäsittelymenetelmän mukaisesti. Jokaisesta konsentraatitiasosta valmistettiin näytteet triplikaatteina ja ne injektoidiin kerran. Hajoamistuotteille näytteitä ei valmistettu, sillä oli tiedossa, ettei oikeellisia näytteitä pystytä valmistamaan riittävällä tarkkuudella halutulle konsentraatitiasolle (0,1 %, 0,5 % ja 1,0 % API:n nähden).

5.8 Haavoittuvuus

Jokainen olosuhdemuutos on kappaleessa 4.2.2 esitettyyn analysointimenetelmään verrattuna. Testattavat olosuhdemuutokset olivat:

- Eluentin konsentraation muutos $\pm 2,0$ %
- Virtausnopeuden muutos $\pm 0,05$ ml/min
- Aallonpituuden muutos ± 1 nm
- Kolonniuunin lämpötilan muutos ± 3 °C

Jokaista olosuhdemuutosta varten valmistettiin referenssinäyte ja näytteenkäsittelymenetelmän mukaisesti vanha voidenäyte. Referenssinäytteenä käytettiin API:n standardia. Jokainen referenssinäyte injektoidiin kuudesti (6) ja vanha voidenäyte kerran. Ajanpuutteen ja resurssien vuoksi haavoittuvuudesta jäi testaamatta eluentin konsentraation muutos.

5.9 Liuosten säilyvyys

API:n standardista ja voidevalmisteesta valmistettiin kaksi näytteenkäsittelymenetelmän mukaista näytettä ja ne analysoitiin heti valmistuksen jälkeen. Ensimmäinen standardi ja näyte säilytettiin huoneenlämmössä (n. 25 °C), toinen standardi ja näyte säilytettiin jääkaapissa (5 °C \pm 3 °C), molemmissa tapauksissa valolta suojattuina. Molemmat standardit ja näytteet analysoitiin 6, 24, 30 ja 48 tunnin säilytyksen jälkeen.

5.10 Suhteellinen vastekerroin

API:n standardista ja API:n hajoamistuotteista valmistettiin 0,1 mg/ml vahvuiset liuokset punnitsemalla kiinteitä tuotteita tarkasti 10 mg:aa 100 ml:n mittapulloon. Jokainen näyte injektoidiin kerran. Saatuja vasteita verrattiin toisiinsa ja laskettiin hajoamistuotteen saantokerroin.

6 TULOKSET JA TULOSTEN TULKINTA

6.1 Systeemin ja menetelmän toistettavuus, identifiointi

Systeemin toistettavuudessa API:n piikkien pinta-alat ja niiden retentioajat standardissa ja voidenäytteessä tulisivat olla %RSD:ltään $\leq 2,0$ %. Hajoamistuote A:n piikkien pinta-alat ja retentioajat tulisivat olla %RSD:ltään $\leq 5,0$ %. Lisäksi API:n identifiointia varten tarkastellaan standardin ja voidenäytteen antamia retentioaikoja. Mikäli retentioajat poikkeavat toisistaan vähemmän kuin ± 5 %, voidaan todeta API identifioiduksi. Tulokset systeemin toistettavuudelle ovat esitettyinä taulukossa 10, jossa lyhenne RT tarkoittaa retentioaikaa.

TAULUKKO 10. Systeemin toistettavuuden tulokset

	Standardi		Voide		Hajoamistuote A	
	Piikin pinta-ala	RT (min)	Piikin pinta-ala	RT (min)	Piikin pinta-ala	RT (min)
1	2021097	7,721	2119244	7,705	3625	1,231
2	2013520	7,722	2116623	7,702	3733	1,227
3	2021003	7,718	2116786	7,699	3735	1,228
4	2015568	7,716	2118984	7,704	3843	1,229
5	2011505	7,720	2116429	7,696	3898	1,224
6	2019711	7,715	2119703	7,699	4015	1,224
Keskiarvo	2017067	7,719	2117962	7,701	3808	1,227
%RSD	0,200	0,035	0,071	0,043	3,65	0,21

Kaikki vaatimukset täyttyivät systeemin toistettavuuden osalta ja näin ollen systeemi voitiin todeta kyseisen analyysin kohdalla toistettavaksi. Lisäksi API:n retentioajat poikkesivat toisistaan 0,23 %, jolloin voidaan API todeta identifioiduksi.

Menetelmän toistettavuudessa tulosten %RSD:n raja API:lle oli alkuperäisessä protokollassa $\leq 2,0$ %, mutta haastavasta matriisista johtuen vaatimusta korotettiin API:lle $\leq 2,5$ %:in. Hajoamistuotteille vaatimus %RSD:lle oli $\leq 15,0$ %. Tulokset menetelmän toistettavuudelle ovat esitettyinä taulukossa 11.

TAULUKKO 11. Menetelmän toistettavuuden tulokset

	API %LC	Hajoamistuote A %LC	Hajoamistuote B %LC
1	100,20	0,161	0,133
2	99,91	0,163	0,124
3	101,64	0,164	0,132
4	100,84	0,156	0,127
5	100,89	0,159	0,130
6	101,52	0,165	0,126
Keskiarvo	100,83	0,160	0,130
%RSD	0,69	2,10	2,70

Menetelmän toistettavuudessa oli ensimmäisessä analyysissä ongelmia, jonka juurisyitä ei saatu selvitettyä. Tuloksena oli vaatimusten ylittävä tulos, mutta sama näyte aikaisemmasta näytteenkäsittelyvaiheesta uudelleen analysoituna tuotti huomattavasti oletetumman tuloksen, joten menetelmän toistettavuus päätettiin tehdä uudestaan korotetulla vaatimuksella. Uusinta-analyysi tuotti huomattavasti toistettavamman tuloksen ja näin ollen täytti vaatimukset.

Laboratorion sisäiselle hajonnalle hyväksymisrajat APIlle oli %RSD \leq 2,5 % ja hajoamistuotteille \leq 15,0 %, ja joidenka lisäksi esitettiin näiden %LC. Lisäksi laskettiin tulosten keskiarvo ja %RSD jokaiselle olosuhteelle erikseen ja kaikille olosuhteille yhteensä.

TAULUKKO 12. Laboratorion sisäisen hajonnan tulokset APIlle

	Olosuhde 1 %LC	Olosuhde 2 %LC	Olosuhde 3 %LC
1	100,20	103,18	100,60
2	99,91	103,22	98,35
3	101,64	103,92	99,90
4	100,84	104,35	99,95
5	100,89	105,34	99,97
6	101,52	103,47	99,65
Keskiarvo	100,83	103,90	99,74
%RSD	0,69	0,80	0,75
Totaalikeskiarvo (%)		101,50	
%RSD		1,9	

Laboratorion sisäisen hajonnan tulokset APIlle täyttivät vaatimukset (taulukko 12), vaikka olosuhteessa 2 prosentuaalinen nimellispitoisuus poikkeaa trendistä.

Taulukossa 13 ovat esitettyinä tulokset kahdelle eri hajoamistuotteelle, jotka ovat nimettyinä hajoamistuote A:ksi ja hajoamistuote B:ksi. Tulokset ovat esitettyinä prosentuaalisena nimellispitoisuutena.

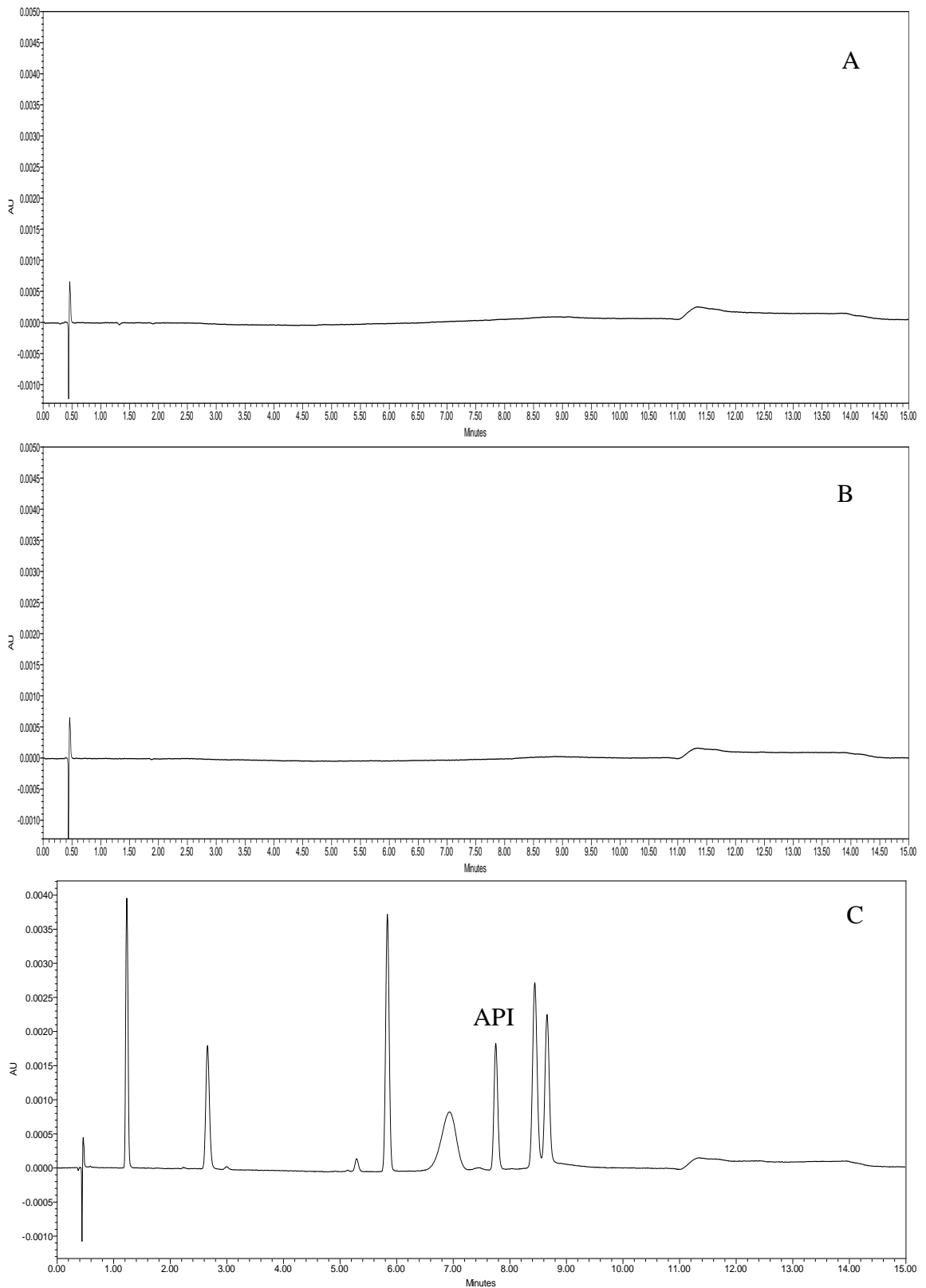
TAULUKKO 13. Laboratorion sisäinen hajonta hajoamistuotteet A ja B

	Olosuhde 1		Olosuhde 2		Olosuhde 3	
	Haj. tuote	Haj. tuote	Haj. tuote	Haj. tuote	Haj. tuote	Haj. tuote
	A	B	A	B	A	B
	%LC	%LC	%LC	%LC	%LC	%LC
1	0,161	0,133	0,203	0,123	0,113	0,123
2	0,163	0,124	0,192	0,127	0,145	0,122
3	0,164	0,132	0,186	0,129	0,147	0,123
4	0,156	0,127	0,200	0,128	0,166	0,121
5	0,159	0,130	0,251	0,124	0,158	0,121
6	0,165	0,126	0,193	0,126	0,178	0,127
Keskiarvo	0,160	0,130	0,200	0,126	0,151	0,123
%RSD	2,1	2,7	11,6	1,9	14,8	1,7
			Hajoamistuote A		Hajoamistuote B	
Totaalikeskiarvo			0,172		0,127	
%RSD			17,2		2,84	

Hajoamistuote B:n %RSD täyttää vaatimukset niin jokaisessa erillisessä olosuhteessa kuin jokaisessa olosuhteessa yhteensä. Myös hajoamistuote A täyttää kriteerit jokaisessa olosuhteessa yksinään, mutta huomioitaessa kaikki tulokset %RSD:hen, ei se täytä kriteeriä. Toisaalta hajoamistuote A on hydrolyysistä aiheutuva, jolloin sitä muodostuu heti API:n ollessa kosketuksissa veden kanssa.

6.2 Spesifisyys ja hajotuskokeet

Spesifisyydessä pääpiikin ja seuraavan piikin resoluution tuli olla $\geq 1,5$ ja yksikään tunnettu hajoamistuote ei saisi eluoitua API:n piikin kanssa samaan aikaan. Todentamiseen riittää UV-spektri.



KUVIO 8. Kromatogrammissa A nollagradietti, B eluentti, C API ja tunnetut hajoamistuotteet

Kuviossa 8 on esitettyinä nollagradientin, eluentin ja hajoamistuotesekoksen kromatogrammit. API:n piikki on merkittynä kromatogrammi C:ssä, API:n standardi,

hajoamistuotestandardit ja kontrollinäytteiden tulokset yhdistettynä. Kromatogrammista nähdään resoluution olevan yli 1,5. Liitteissä 1 ja 2 on esitetty diluentin ja plasebon kromatogrammit, jotka vastaavat kuvion 8 A ja B kromatogrammeja.

Hajotuskokeista ajanpuutteen vuoksi pystyttiin suorittamaan vain valottamalla, hapolla, hapettamalla ja lämmittämällä hajottamiset. Hajottaessa saanto-% tuli olla 70 – 90 % tasolla kontrollinäytteeseen verrattuna. Myös massabalanssia tarkkailtiin.

TAULUKKO 14. Hajotuskokeiden tulokset voide- ja kontrollinäytteellä

	API:n pitoisuus (mg/ml)				
	Hapetus	Happo	Lämpö	Vis- valo	UV+Vis- valo
Kontrolli	10,207476	10,100883	-	-	10,280836
Hajotettu näyte	7,500626	9,455005	-	-	9,299914
Saanto-%	73,5	93,6	-	-	90,5

Taulukossa 14 ovat esitettyinä näytevoiteen hajotuksen tulokset ja sille kontrollinäyte, jonka tuloksiin verrattaessa saatiin saanto-%. Voidenäytteelle ei saatu tuloksia lämmöllä, eikä Vis-valolla hajotettaessa, koska näyte ei hajonnut. UV-valolla tulos oli sama kuin UV+Vis-valolla hajotettaessa. Hapetus- ja happohajotukset tulisi uusita, happohajottaessa hajoamistaso ei ollut riittävä ja hapettaessa massabalanssi ei ollut toivottu. Lämpöhajotusta ei uusita, sillä hajoamista ei todettu viikon lämmityksen aikana.

TAULUKKO 15. API:n standardin hajotuskokeiden tulokset standardista ja kontrollistandardista

	Pinta-ala-%				
	Hapetus	Happo	Lämpö	Vis- valo	UV+Vis- valo
Kontrollistandardi	99,72	99,69	99,7	99,7	-
API:n standardi	96,18	98,95	8,87	79,44	-
Saanto-%	96,5	99,3	8,9	79,7	-

Taulukossa 15 esitettyinä API:n kantaliuoksen hajottamisen tuloksen pinta-alan prosentteina, sekä saanto-% kontrollistandardiin nähden. UV-valolla hajottaessa näyte hajosi lähes täysin ja näin ollen siitä ei ole tuloksia. UV-valotus tulisi uusita. Hapettaessa ja happohajottaessa hajoamistaso oli liian vähäinen ja näin ollen tulokset tulisi uusita. Vaikka lämmöllä hajottaessa tuloksena oli selkeä hajoaminen ei hajotusta tarvitse uusita,

koska tiedetään, että API hajoaa todella herkästi hajoamistuote A:ksi vesiliuosta lämmittäessä, joten kokeen uusimisesta ei saataisi uutta informaatiota.

6.3 Oikeellisuus ja saanto, lineaarisuus ja määritysalue

Oikeellisuudessa ja saannossa saantoprosentti laskettiin jokaiselle konsentraatiotasolle ($n = 3$) ja keskiarvo saantoprosentille ($n = 9$) sekä %RSD:t kaikista yhdeksästä injektioinnista. API:n pitoisuus tuli alun perin olla jokaisella konsentraatiotasolla alle $\pm 2,0$ % teoreettiseen arvoon nähden. Johtuen haasteellisesta matriisista, korotettiin rajaa $\pm 3,0$ %:iin. Kolmen näytteen pitoisuuden %RSD:lle tuli olla $\leq 2,5$ % ja retentioajalle pienempi kuin $\leq 2,0$ %. Taulukossa 16, 17 ja 18 ovat esitettyinä tulokset kolmelle eri konsentraatiotasolle.

TAULUKKO 16. Oikeellisuuden ja saannon tulokset 100 % konsentraatiotason voiteella

100 %	Pitoisuus (mg/g)	%LC (%)	RT (min)
1	10,138551	99,40	7,690
2	10,281138	100,80	7,686
3	10,229470	100,29	7,687
Keskiarvo	10,216386	100,16	7,688
%RSD	-	0,71	0,021

Taulukossa 16 esitetty 100 % konsentraatiotason tulokset täsmäsivät teoreettiseen pitoisuuteen, joka oli 10,24565 mg/ml ja näin ollen tulokset täyttivät kaikki vaatimukset.

TAULUKKO 17. Oikeellisuuden ja saannon tulokset 80 % konsentraatiotason voiteella

80 %	Pitoisuus (mg/g)	%LC (%)	RT (min)
1	8,495855	102,36	7,688
2	8,609831	103,73	7,690
3	8,519777	102,65	7,691
4	8,518240	102,95	7,651
5	8,522132	103,00	7,649
6	8,309247	100,42	7,648
7	8,575327	108,19	7,649
Keskiarvo	8,507201	103,33	7,667
%RSD	-	2,3	0,28

Taulukossa 17 ovat esitettyinä tulokset 80 % konsentraatiotasolle ja teoreettinen pitoisuus kyseiselle voidenäytteelle oli 8,27425 mg/ml. Yksi kolmesta ensimmäisestä tuloksesta ei täyttänyt vaatimusta saannon suhteen, joten näytteitä valmistettiin neljä lisää SOP:n ohjeiden mukaisesti. Uusinnan neljästä näytteestä yksi ei täyttänyt vaatimuksia. Näin ollen seitsemän (7) tuloksen keskiarvo ei täytä saannon kriteereitä. %RSD näytteille täytti vaatimukset kummassakin analyysissä.

TAULUKKO 18. Oikeellisuuden ja saannon tulokset 120 % konsentraatiotason voiteella

120 %	Pitoisuus (mg/g)	%LC (%)	RT (min)
1	12,150799	98,79	7,687
2	11,752155	95,55	7,685
3	12,093585	98,32	7,681
4	12,114371	98,27	7,645
5	11,971102	97,11	7,644
6	12,071919	97,92	7,645
7	12,246660	99,34	7,640
Keskiarvo	12,057227	97,90	7,661
%RSD	-	1,3	0,29

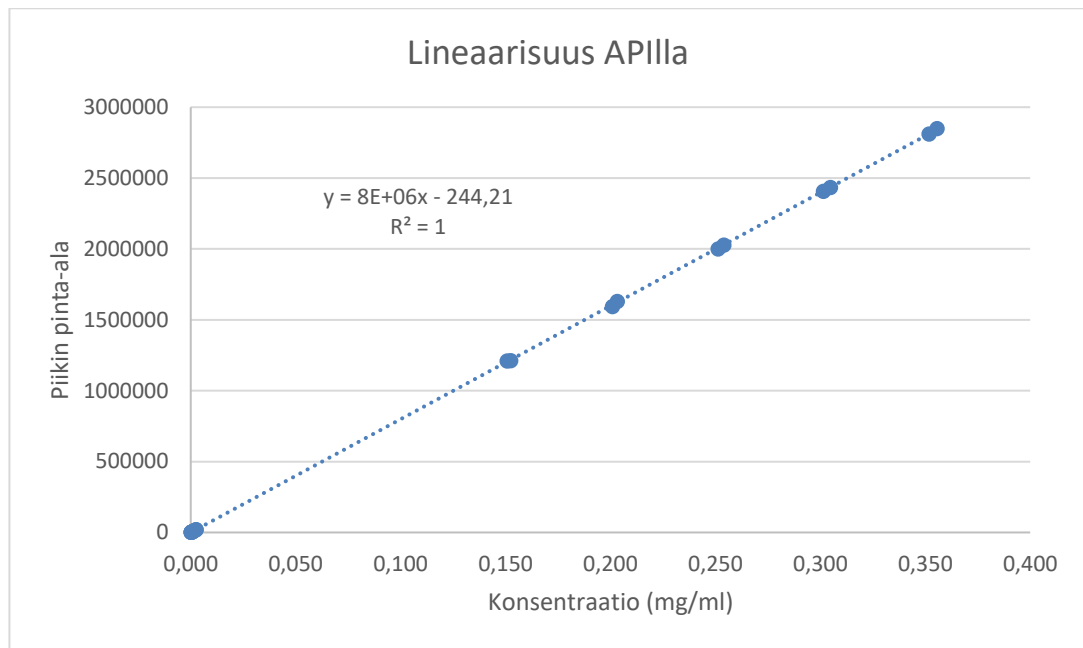
Taulukossa 18 ovat esitettyinä tulokset 120 % konsentraatiotasolle ja voidenäytteen teoreettiseksi pitoisuudeksi saatiin 12,32772 mg/ml. Myös tällä konsentraatiotasolla oli ongelmia ensimmäisten kolmen näytteen kanssa, jossa yksi näytteistä oli yli hyväksymiskriteerien. Analyysi uusittiin tehden neljä uutta näytettä. Neljä uutta näytettä saavuttivat kriteerit. %RSD näytteille täytti vaatimukset kummassakin analyysissä.

Lineaarisuudessa korrelaatiokerroin lääkeaineen pitoisuudelle tuli olla $\geq 0,999$ ja hajoamistuotteille $\geq 0,99$. Regressioanalyysissä %y-leikkauspiste tuli olla alle $\pm 3,0$ %. Koko määrittelyalueelle LOQ-tasolta aina 140 % korrelaatiokertoimen tuli olla APIn pitoisuudelle $\geq 0,99$. Taulukossa 19 ovat esitettyinä koko määrittelyalueen näytteiden konsentraatiot, mitatut piikkien pinta-alat ja näille lasketut residuaalit.

TAULUKKO 19. Lineaarisuuden standardien teoreettiset pitoisuudet, saadut piikkien pinta-alat ja lasketut residuaalit APIlle

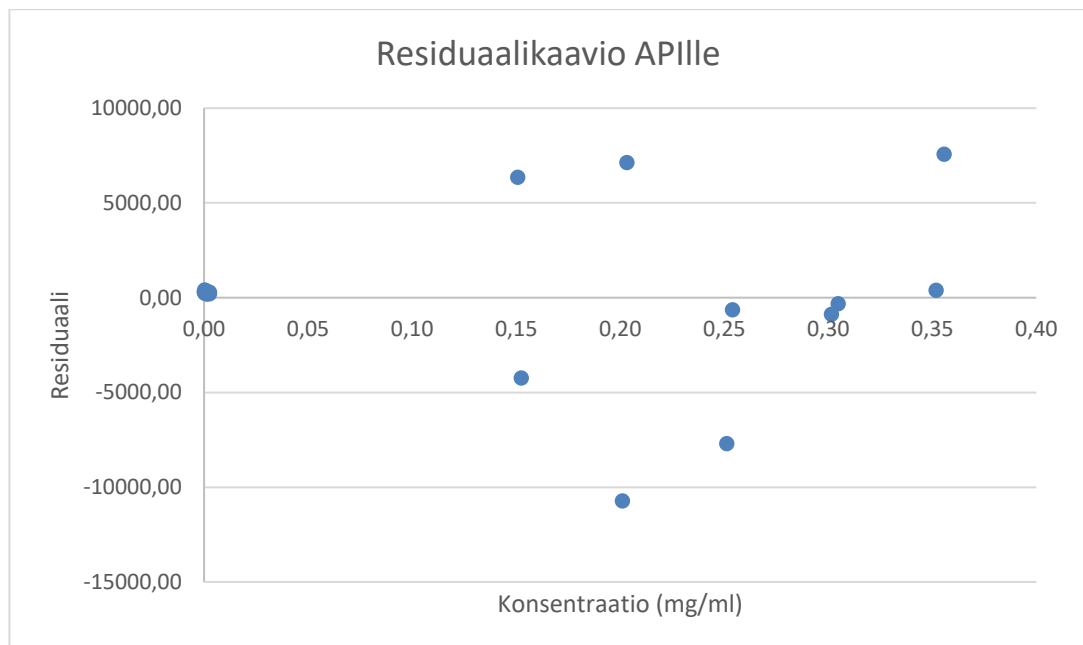
Suhteellinen pitoisuustaso (%)	Konsentraatio (mg/ml)	Piikin pinta-ala	Residuaali
0,06	0,000151	1290,0233300	329,444
0,06	0,000152	1281,1422380	307,397
0,10	0,000251	2186,0003530	422,227
0,10	0,000254	2037,9066520	252,190
0,25	0,000628	5074,5487340	298,797
0,25	0,000635	5144,8583730	314,249
0,50	0,001256	10143,3038970	347,588
0,50	0,001270	10095,8585990	190,427
1,00	0,002513	20137,5484970	301,904
1,00	0,002540	20262,7897770	207,715
60	0,150764	1210899,3799260	6352,171
60	0,152411	1213484,3141680	-4228,706
80	0,201018	1595434,5579490	-10709,792
80	0,203215	1630837,2300310	7138,465
100	0,251273	2000053,9681150	-7687,522
100	0,254018	2029048,2572290	-636,252
120	0,301527	2408464,3737680	-874,257
120	0,304822	2435359,1026760	-311,150
140	0,351782	2811336,8492770	401,078
140	0,355626	2849240,0241310	7584,027
Korrelaatiokerroin		0,99999	
Kulmakerroin		7991266	
y-leikkauspiste		-244	
%y-leikkauspiste		-0,01	

Kulmakerroin ja leikkauspiste laskettiin Excel:n avulla, joka käyttää laskemiseen pienimmän neliösumman menetelmää (OLS). Myös korrelaatiokertoimen arvo saatiin Excel:n avulla. Leikkauspisteen osuus prosentteina työskentelykonsentraation vasteesta (%y-leikkauspiste) laskettiin jakamalla y-leikkauspiste 100 %:sten standardien pinta-alojen keskiarvolla ja kertomalla tulos 100 %:lla. Korrelaatiokerroin ja %y-leikkauspiste täyttivät vaatimukset.



KUVIO 9. Lineaarisuus APiIIe konsentraatioväliltä LOQ - 140 %

Kuviossa 9 on esitettyä lineaarisen regression avulla suoralle sovitettuja kalibrointipisteitä koko määrittämisalueelta. Kuviossa esitetään myös suoran yhtälö ja korrelaatiokerroin, jotka ovat tarkemmin esitettyinä taulukossa 19.



KUVIO 10. Residuaalikaavio lineaarisuuden tuloksista APiIIa

Kuviossa 10 on esitettyä residuaalikaavio APiIIe, joka on piirretty käyttäen Excel:ä. Residuaali lasketaan mitattujen pisteiden ja pienimmän neliösumman suoran pisteiden erotuksena. Kun verrataan lineaarista regressiota (kuvio 9) ja residuaalikaaviota, voidaan

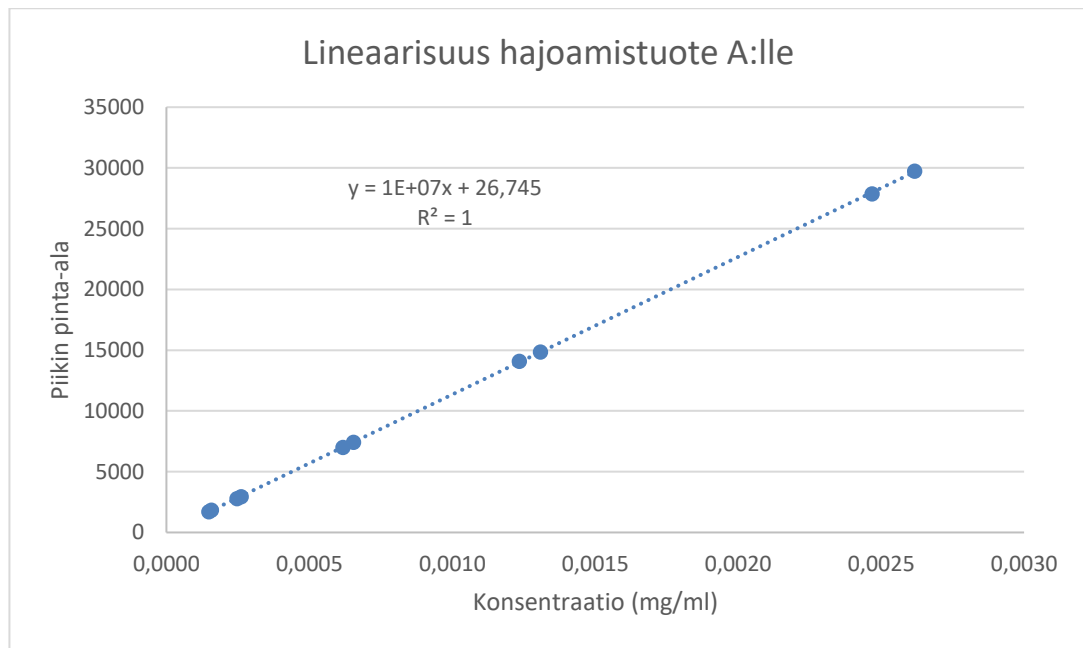
todeta kalibroitaisuoran olevan lineaarinen residuaalien keskittyessä tasaisesti molemmille puolille keskilinjaa.

Taulukossa 20 vastaavasti on esitettyä hajoamistuote A:n teoreettiset konsentraatiot, jotka saatiin huomioimalla punnitukset, sekä näille piikkien pinta-alat ja residuaalit.

TAULUKKO 20. Lineaarisuuden standardien teoreettiset pitoisuudet, saadut piikkien pinta-alat ja lasketut residuaalit hajoamistuote A:lle

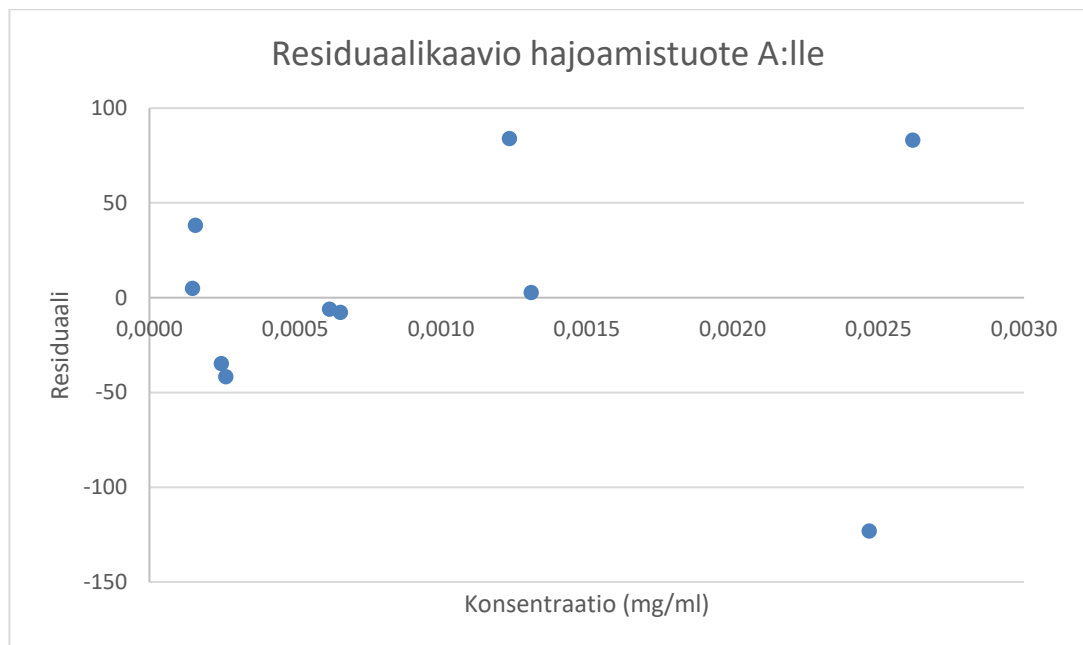
Suhteellinen pitoisuustaso (%)	Konsentraatio (mg/ml)	Piikin pinta-ala	Residuaali
0,06	0,000148	1709,342007	5
0,06	0,000157	1843,893533	38
0,10	0,000247	2788,114555	-35
0,10	0,000262	2950,929245	-42
0,25	0,000617	7011,008280	-6
0,25	0,000654	7431,280632	-8
0,50	0,001234	14091,420209	84
0,50	0,001309	14854,954353	3
1,00	0,002469	27865,076135	-123
1,00	0,002617	29759,679942	83
Korrelaatiokerroin		0,99998	
Kulmakerroin		11327227	
y-leikkauspiste		27	
%y-leikkauspiste		0,09	

Taulukkoon 20 on piikkien pinta-alojen ja residuaalien lisäksi lisätty korrelaatiokerroin, kulmakerroin, y-leikkauspiste ja %y-leikkauspiste, jotka saatiin Excel:llä laskemalla. Korrelaatiokerroin ja %y-leikkauspiste molemmat täyttivät hajoamistuotteiden vaatimukset.



KUVIO 11. Lineaarisuus hajoamistuote A:lle konsentraatioväliltä LOQ – 1,0 %

Kuviossa 11 esitettynä lineaarinen regressio hajoamistuote A:n tapauksessa konsentraatioalueelle LOQ – 1,0 %. Kuviossa näkyy myös suoran yhtälö, sekä korrelaatiokerroin, jotka molemmat ovat tarkemmin esitettyinä taulukossa 20.



KUVIO 12. Residuaalikaavio hajoamistuote A:lle

Kuten API:n tapauksessa, myös hajoamistuote A:n olevan lineaarinen verrattaessa lineaarista regressiota ja residuaalikaaviota yhdessä. Kuvion 12 residuaalit levittyvät tasaisesti keskilinjan molemmille puolille.

6.4 LOQ/LOD ja suhteellisen vastekerroin

Toteamisrajalle signaali/kohina-suhde (S/N) tuli olla $\geq 3:1$ ja kvantitointirajalle $\geq 10:1$. Pinta-alojen %RSD:t tulivat olla $\leq 10,0\%$. Tulokset esitettyinä taulukoissa 21 ja 22.

TAULUKKO 21. Kvantitointirajan liuoksen pinta-alat ja signaali/kohina-suhteet (S/N)

	API		Hajoamistuote A	
	Pinta-ala	(S/N)	Pinta-ala	(S/N)
	1266,551021	22	1676,583294	50
	1248,812679	25	1682,198052	57
	1280,784610	26	1698,255543	61
	1300,239566	28	1718,163495	63
	1264,321807	24	1687,502865	54
	1261,663440	24	1705,384259	54
Keskiarvo	1270,395521	25	1694,681251	57
%RSD	1,405	-	0,919	-

Kvantitointirajan tulokset täyttivät kriteerit niin signaali/kohina-suhteessa, kuin %RSD:nkin osalta.

TAULUKKO 22. Toteamisrajan liuoksen tulokset

	Pinta-ala	(S/N)
API	436	8
Hajoamistuote A	579	18

Myös toteamisrajan tulos täytti annetut kriteerit. Molemmissa tapauksissa liuosten konsentraatiota voitaisiin jopa pienentää.

Suhteellinen vastekerroin (RRF) laskettiin jakamalla hajoamistuotteen regressiosuoran kulmakerroin (esitettyinä taulukossa 21) API:n regressiosuoran kulmakertoimella (esitettyinä taulukossa 22), jotka molemmat ovat laskettuja lineaarisuuden validoinneista. Kaavassa 4 esitettyinä suhteellisen vastekertoimen laskeminen

$$\begin{aligned}
 RRF &= \frac{\text{Hajoamistuote A:n kulmakerroin}}{\text{API:n kulmakerroin}} \\
 &= \frac{11327227}{7958502} \\
 &= 1,432
 \end{aligned} \tag{4}$$

Suhteelliseksi vastekertoimeksi saatiin hajoamistuote A:lle 1,432. Suhteelliselle vastekertoimelle ei ollut kriteereitä.

6.5 Liuosten säilyvyys ja haavoittuvuus

Liuosten säilyvydessä jokainen muutos kromatogrammissa huomioitiin ja API:n sekä hajoamistuotteiden pitoisuudet (%LC) laskettiin jokaisessa aikapisteessä. Tuloksia verrattiin nollassaikapisteen tuloksiin. Jotta voitiin sanoa näytteiden olevan stabiileja, ei konsentraatio saanut muuttua yli $\pm 2,0$ % API:n pitoisuudessa ja yli $\pm 10,0$ % hajoamistuotteiden pitoisuudessa. Taulukoissa 23 ja 24 ovat esitettyinä tulokset API:lle ja hajoamistuotteille.

TAULUKKO 23. API:n pitoisuuden muutos standardissa ja voidenäytteessä 48 tunnin ajalta

		Standardi 5 °C	Standardi 25 °C	Voidenäyte 5 °C	Voidenäyte 25 °C
Alkuperäinen	Pitoisuus (mg/ml)	0,26261	0,24704	10,18853	10,14002
6 tuntia	Pitoisuus (mg/ml)	0,26433	0,25135	10,31661	10,18386
	Muutos (%)	100,7	101,7	101,3	100,4
24 tuntia	Pitoisuus (mg/ml)	0,25920	0,24618	10,15075	10,03490
	Muutos (%)	98,7	99,7	99,6	99,0
30 tuntia	Pitoisuus (mg/ml)	0,26407	0,25078	10,32443	10,15079
	Muutos (%)	100,6	101,5	101,3	100,1
48 tuntia	Pitoisuus (mg/ml)	0,26628	0,25185	10,29483	10,22916
	Muutos (%)	101,4	102,0	101,0	100,9

Taulukossa 23 ovat esitettyinä API:n pitoisuuksien muutokset 48 tunnin ajalta niin standardissa, kuin näytteenkäsittelyn läpi käyneessä voidenäytteessä. Muutos prosentteina on laskettu API:n tulokset täyttävät kriteerit jokaisessa aikapisteessä niin huoneenlämmössä kuin jääkaapissakin säilytettynä ja näin ollen voidaan sanoa sen olevan stabiili testatuissa olosuhteissa.

TAULUKKO 24. Hajoamistuotteiden määrien muutokset 48 tunnin aikana voidenäytteessä

		Haj. tuote A 5 °C	Abs. ero	Haj. tuote totaali 5 °C	Abs. ero	Haj. tuote A 25 °C	Haj. tuote totaali 25 °C
Alkuperäinen	Pitoisuus (mg/ml)	0,15407	NA	0,425	NA	0,15370	0,330
6 tuntia	Pitoisuus (mg/ml)	0,17202	0,02	0,410	0,02	0,24531	0,374
	Muutos (%)	111,7	NA	94,5	NA	159,6	113,3
24 tuntia	Pitoisuus (mg/ml)	0,19425	0,04	0,373	0,05	0,50026	0,625
	Muutos (%)	126,1	NA	87,8	NA	325,5	189,4
30 tuntia	Pitoisuus (mg/ml)	0,20721	0,05	0,390	0,04	0,61210	0,737
	Muutos (%)	134,5	NA	91,8	NA	398,2	223,3
48 tuntia	Pitoisuus (mg/ml)	0,23392	0,08	0,415	0,01	0,87761	1,000
	Muutos (%)	151,8	NA	97,7	NA	571,0	304,2

Taulukossa 24 esitetään pitoisuuden ja suhteelliset muutokset hajoamistuote A:lle, sekä hajoamistuotteiden kokonaismäärälle. Tulosten perusteella voidaan sanoa näytteiden olevan stabiileja API:n osalta, mutta hajoamistuotteiden määrät eivät täytä kriteerejä ja näin ollen liuoksille ei voida antaa säilymisaikaa, vaan tutkittaessa hajoamistuotteita tulee näyteliuokset valmistaa tuoreeltaan.

Haavoittuvuudessa API:n pitoisuus sai muuttua $\pm 2,0$ % ja hajoamistuotteiden pitoisuudet $\pm 15,0$ %. API:n resoluutio tuli olla $\geq 1,5$. Pitoisuudet lasketaan prosentuaalisina nimellispitoisuuksina (%LC).

TAULUKKO 25. Hajoamistuote A:n ja API:n pitoisuuden muutos suhteessa virtausnopeuden muutokseen

Virtausnopeus (ml/min)	Hajoamistuote A		API	
	Pitoisuus (mg/g)	%LC (%)	Pitoisuus (mg/g)	%LC (%)
0,45	0,021772	-	10,352042	-
0,40	0,016513	75,85	10,344780	99,93
0,50	0,026314	120,86	10,375931	100,23

Taulukossa 25 esitettynä virtausnopeuden muutos hajoamistuote A:n ja API:n prosentuaalisiin nimellispitoisuuksiin. Virtausnopeuden muutos ei tuonut suurta muutosta API:n %LC:n täyttäen kriteerin, mutta hajoamistuote A:n pitoisuuden vaihdellessa 75 – 120 % välillä alkuperäiseen olosuhteeseen nähden, ei se täytä kriteereitä ja virtausnopeuden muutos voidaan todeta olevan yksi analyysimenetelmän haavoittuvuuksista.

TAULUKKO 26. Hajoamistuote A:n ja API:n pitoisuuden muutos suhteessa aallonpituuden muutokseen

Aallonpituus (nm)	Hajoamistuote A		API	
	Pitoisuus (mg/g)	%LC (%)	Pitoisuus (mg/g)	%LC (%)
280	0,026968	-	10,565119	-
279	0,023131	85,77	10,553041	99,89
281	0,018053	66,94	10,553199	99,89

Aallonpituuden muutoksen vaikutus pitoisuuksiin on esitettynä taulukossa 26. Kuten taulukosta voidaan todeta, niin aallonpituuden muutos ei vaikuta kriittisesti API:n pitoisuuden havaitsemiseen, mutta selvä vaikutus hajoamistuote A:n pitoisuuteen on havaittavissa. Aallonpituudella 279 nm tulos juuri ja juuri täyttää kriteerit hajoamistuote A:n tapauksessa, mutta aallonpituudella 281 nm tulos selvästi ylittää kriteerit. Näin ollen aallonpituusalueeksi voidaan antaa 279 – 280 nm, jolloin käytetty menetelmä ei kärsi muutoksesta.

TAULUKKO 27. Hajoamistuote A:n ja API:n pitoisuuden muutos suhteessa kolonniuunin lämpötilan muutokseen

Kolonniuunin lämpötila (°C)	Hajoamistuote A		API	
	Pitoisuus (mg/g)	%LC (%)	Pitoisuus (mg/g)	%LC (%)
30	0,022039	-	10,692842	-
27	0,017968	81,53	10,688357	99,96
33	0,025762	116,89	10,704934	100,11

Kolonniuunin lämpötilan muutoksien vaikutukset ovat esitettyinä taulukossa 27. Kolonniuunin lämpötilan muutokset eivät juurikaan vaikuttaneet API:n prosentuaaliseen nimellispitoisuuteen, mutta kummassakin tapauksessa hajoamistuote A:n määrä ylittää kriteerit.

7 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA

Näytteenkäsittelymenetelmän parantaminen ja analyysimenetelmän kehitys ja optimointi saatiin tyydyttävään vaiheeseen ja validoitavaksi. Näytteenkäsittelymenetelmien ongelmakohdat saatiin ratkaistua optimoidulla menetelmällä ja näin ollen tehostettua näytteenkäsittelyä ja lisättyä turvallisuutta. Analyysimenetelmää saatiin paranneltua ja nopeutettua gradienttimenetelmän ansiosta useita kymmeniä minuutteja, joka on edullista näytteiden säilyvyyden kannalta. Myös sopimusvalmistajalle siirtämistä ajatellen analyysimenetelmän skaalaus UHPLC:lle oli jatkoon kannalta kannattavaa, sillä trendinä on tällä hetkellä siirtyä UHPLC-laitteisiin ja siirto tuo huomattavaa taloudellista hyötyä.

Taulukkoon 28 on koottuna validoinnin osa-alueiden tulokset asteikolla kriteereiden täyttävä, kesken, ei täytä kriteereitä. Yhdestätoista osa-alueesta saatiin saatettua loppuun hyväksytysti seitsemän, kaksi jäi kesken ja yksi ei täyttänyt kriteereitä. Oikeellisuuden ja saannon tulosten kanssa ongelmia esiintyi 80 % ja 120 % pitoisuustasoilla. Analyysit uusittiin neljällä lisänäytteellä, jolloin %RSD täytti vaatimuksen, mutta 80 % pitoisuudella %LC:n keskiarvo edelleen ylitti kriteerin. Tulokset käsiteltiin poikkeamana, sillä käsintehtyjen voidenäytteiden homogeenisuutta ei voida varmistaa, eikä homogeenisuuden varmistamiseksi ole minkäänlaista ohjeistusta.

Laboratorion sisäisessä hajonnassa API:n osuus täytti kriteerit, mutta kaikki kolme olosuhdetta yhdistettynä hajoamistuote A:n %RSD ylitti kriteerin. On kuitenkin yleisesti tiedossa, että hajoamistuote A:ta alkaa heti hydrolysoitua API:n ollessa kosketuksissa veden kanssa, josta johtuen tulos vaihtelee enemmän. Tuloksissa rinnalle on otettu tarkasteluun hajoamistuote B, jonka %RSD täyttäisi vaatimuksen. Toisaalta dataa syvemmin tarkasteltaessa minimin ja maksimin prosentuaalinen ero on 0,1 %, joka osaltaan täyttäisi menetelmän siirrossa käytettävän vaatimuksen. Mahdollinen uusiminen tai uusimatta jättäminen jää kuitenkin tutkijoille harkinnanvaraiseksi.

TAULUKKO 28. Validoinnin tulokset koostettuna

Validoinnin osa	Tulos
Menetelmän toistettavuus	Täyttää kriteerit
Systeemin toistettavuus	Täyttää kriteerit
Laboratorion sisäinen hajonta	Ei täytä kriteereitä, hajoamistuotteen %RSD ylittää vaatimuksen
Hajotuskokeet	Kesken
Spesifisyys	Täyttää kriteerit
Oikeellisuus ja saanto	Täyttää kriteerit, käsitelty poikkeamana
Lineaarisuus ja määrittäminen	Täyttää kriteerit
Suhteellinen vastekerroin	Täyttää kriteerit
Toteamis- ja määrittämissuhteet	Täyttää kriteerit
Haavoittuvuus	Kesken
Liuosten säilyvyys	Täyttää kriteerit

Validoinnista jäljelle jäävät osat ovat analyysiohjeen spesifioimista varten ja jo saatujen tulosten perusteella on voitu osoittaa kehitellyn näytteenkäsittelymenetelmän olevan oikeellinen ja toistettava, sekä analyysimenetelmän sopivan käytetyille laitteistolle.

Validoinnin loppuun saattamisen ja hyväksymisen jälkeen menetelmät olisi tarkoitus siirtää sopimusvalmistajalle. Menetelmien siirtoihin on olemassa omat kriteerinsä, jotka sopimusvalmistajan tulee täyttää. Heikkouksia siirrossa tulee todennäköisesti olemaan kouluttaminen, joka tapahtuu lähtökohtaisesti sähköisesti esimerkiksi sähköpostin avulla, mutta myös tarvittaessa paikan päällä. Muina ongelmina ovat muun muassa työskentelytavat laboratoriossa, jotka hieman vaihtelevat maittain, sekä laitteiston parametrit (esimerkiksi viivästystilavuuden muutos), kolonnierän muuttuminen sekä erityyppinen välineistö. Menetelmän siirto tulee vaatimaan erityistä tarkkuutta ja huomion kiinnittämistä tiedostettuihin heikkouksiin.

Muita seurattavia asioita kehitetyissä menetelmissä oli jo ennen tämän opinnäytetyön aloittamista todettu kolonnierien vaihtelevuus. Validoinnin aikana kolonnierän

vaihtaminen antoi kriteerit täyttävät tulokset, mutta jatkon kannalta tähän tulisi kiinnittää huomiota.

Opinnäytetyön aikana nousi kysymykseksi työnantajan osalta menetelmien soveltuvuus myös muille vastaavan matriisiin sisältävien tuotteiden analysointiin. Alustavien tutkimusten perusteella ainakin analyysimenetelmä sopii toiselle lääkeaineelle pienellä optimoinnilla. Tosin pesuliuokset tulee valita erittäin huolella, sillä testausvaiheessa laite kontaminoitui riittämättömän pesun seurauksena. Oletusarvona on näytteenkäsittelymenetelmän sopivuus toisille tuotteille, sillä voiteiden formulaatiot ovat pääsääntöisesti samoja lääkeaineen vaihtuessa.

Vaikka näytteenkäsittelystä saatiin toistettava ja oikeellinen tulisi jatkossa jatkaa sen kehitystä mahdollisesti pois liuottimella uuttamisesta. Yksi esimerkki vaihtoehtoiseksi näytteenkäsittelyksi olisi kiinteäfaasiuutto (SPE, solid phase extraction), jossa etuna on näytteen tuhoutumattomuus, kustannustehokkuus, yksinkertaisuus ja tehokkuus. Toisaalta kiinteäfaasiuutto vaatii yleensä näytteen olemista liuosmuodossa, joten voiteelle jouduttaisiin todennäköisesti tekemään hajotus orgaanisella liuottimella joka tapauksessa.

Vuonna 2016 Alshirifin ja Alhameedin työryhmä testasi uuden tyyppistä erotusmenetelmää, niin kutsuttua samepisteuttoa (cloud point extraction, CPE) ja tulokset olivat lupaavia ainakin silmätippojen, voiteiden ja kapseleiden kanssa. Tutkimus jatkui vuoden 2017 lokakuuhun asti projektiluontoisesti. (Alshirifi, Alhameedi 2016) Menetelmän etuina ovat muun muassa yksinkertaisuus, kustannustehokkuus ja ympäristöystävällisyys ja mahdollisuuksia menetelmän käyttöön tulisi tutkia.

Investointeja vaativa vaihtoehto näytteenkäsittelylle olisi näytteenkäsittelyn automatisointi näytteenkäsittelyrobotilla, jolloin näytteenkäsittelyssä suurimmasta osasta vaiheita saataisiin pois suljettua inhimillinen virhe ja työntekijöiden altistus vaarallisille kemikaaleille vähenisi. Tämä vaihtoehto vapauttaisi työtunteja muihin analyyseihin, toimiessaan lisäksi laboratorion tehokkuutta ja teoriassa vähentäisi työtaturmien riskiä.

LÄHTEET

Agilent Technologies. 2016. The LC Handbook: Guide to LC Columns and Method Development. [PDF]. Luettu 16.4.2018.

<https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/LC-Handbook-Complete-2.pdf>

Ahuja, S., & Dong, M. W. 2005. Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. Amsterdam: Boston: Elsevier Academic Press.

Alshirifi A., Alhameedi, D. Y. 2016. Separation and Pre-Concentration for the Spectrophotometric Determination of Chloramphenicol in Pharmaceutical Preparations. International Journal of PharmTech Research 9(9) 281–293.

Behnoush, B., Sheikhasadi, A., Bazmi, E., Fattahi, A., Sheikhasadi, E., Anary, S. H. S. 2015. Comparison of UHPLC and HPLC in Benzodiazepines Analysis of Postmortem Samples: A Case-Control Study. Medicine 94 (14), 640.

Choi, H. N.d. Advantages of Photodiode Array. [PDF]. Luettu 24.04.2018.

http://www.hwe.oita-u.ac.jp/kiki/ronnbunn/paper_choi.pdf

Fanali, S. H., Poole, P. R., Colin F., Riekkola, M. (2017). Liquid Chromatography - Fundamentals and Instrumentation, Volume 1 (2nd Edition). Amsterdam: Elsevier.

Global Optosigma. N.d. Aspherical Lenses. [Kuva]. Luettu 15.03.2018.

https://www.global-optosigma.com/en/page_img/agl_aspherical_il.jpg?v=1415215554

Guillarme, D. & Veuthey, J. 2012. UHPLC in life sciences. Cambridge, U.K.: Royal Society of Chemistry.

Grinias, J. P., Wong, J., Kennedy, R. T. 2016. Repeatability of Gradient UHPLC-MS/MS Methods in Instrument-Controlled Thermal Environments. Journal of chromatography A 1461, 42–50.

Hassan, B., A., R. 2012. HPLC Uses and Importance in the Pharmaceutical Analysis and Industrial Field. Pharmaceutica Analytica Acta. 3(9).

International Labmate Limited. 2014. What is the Difference Between UHPLC and UPLC? Chromatography Today. Julkaistu 04.07.2014. Luettu 21.2.2018.

<https://www.chromatographytoday.com/news/hplc-uhplc/31/breaking-news/what-is-the-difference-between-uhplc-and-uplc/30754>

International Labmate Limited. 2015. The Evolution of UHPLC in Pharmaceutical Analysis. Chromatography Today. Julkaistu 19.11.2015. Luettu 26.04.2018.

<http://www.chromatographyonline.com/evolution-uhplc-pharmaceutical-analysis>

Jaarinen S., Niiranen J. 2005. Laboratorion analyysiteknikka. 5. painos. Helsinki: Edita Publishing Oy.

MacNair, J. E., Lewis, K. C., Jorgenson, J. W. 1997. Ultrahigh-Pressure Reversed-Phase Liquid Chromatography in Packed Capillary Columns. Analytical Chemistry. 69(6), 983-989.

Meyer, V. 2010. Practical high-performance liquid chromatography 5. painos. Chichester: Wiley.

Moldoveanu, Ş. & David, V. 2012. Essentials in modern HPLC separations. Amsterdaessem: Elsevier.

Nikolaropoulos, S. S., Arvanitopoulou, E., Katsanos, N. A. 1995. Diffusion coefficients in liquids by HPLC and the respective calibration factors. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 352 (7–8), 639–642.

Nikolin, B., Imamović, B., Medanhodžić-Vuk S., Sober, M. 2004. High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences. 4(2), 5–9.

Parris, N. A. 1984. Chapter 9 Liquid-liquid (partition) chromatography. Journal of Chromatography Library 27, 193–202.

Taleuzzaman, M., Ali, S., Gilani, S. J., Imam, S. S. & Hafeez, A. 2015. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review. Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry 2(6), 1056.

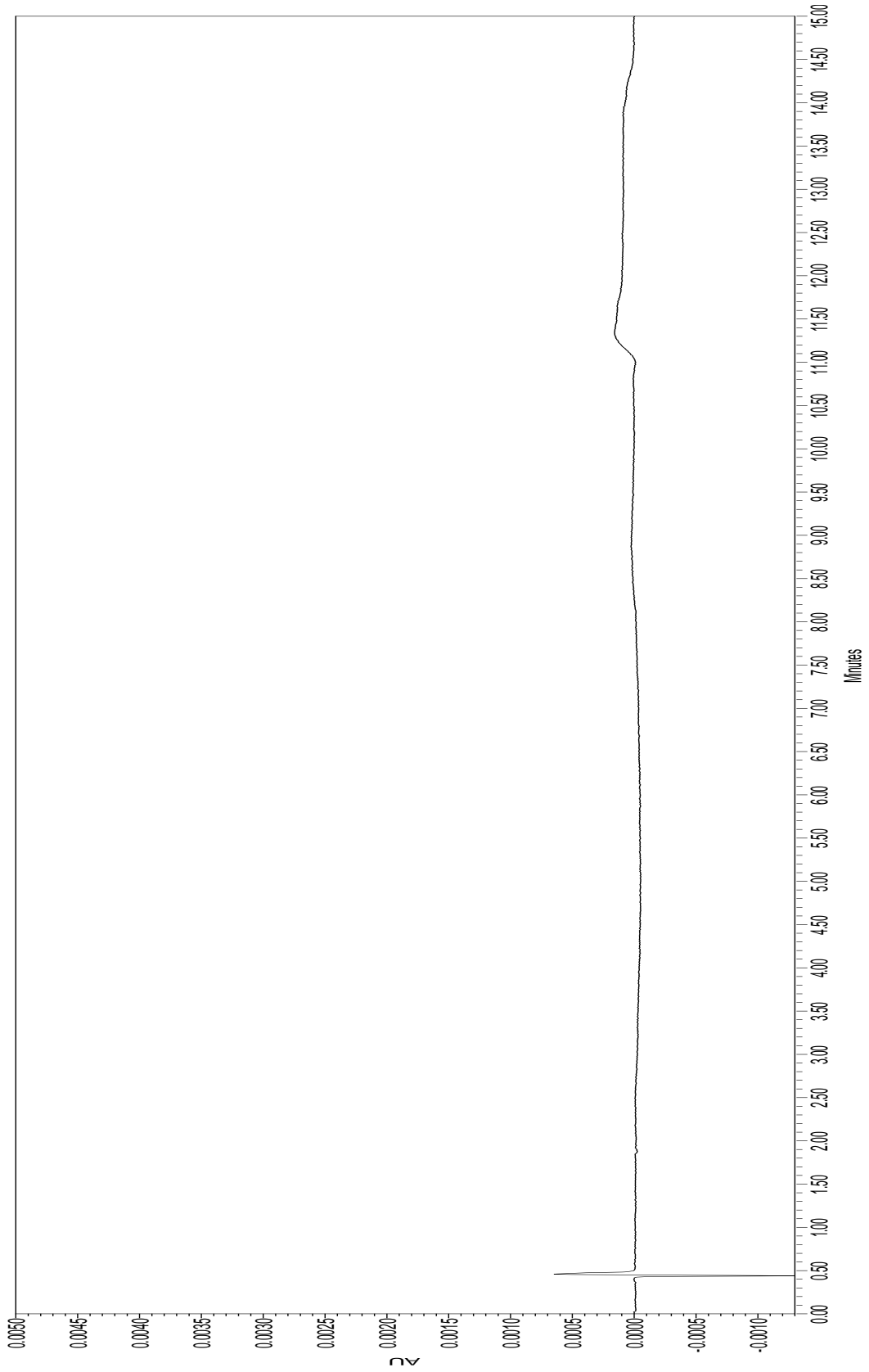
Vailaya, A., Horváth, C. 1998. Retention in reversed-phase chromatography: partition or adsorption? Journal of Chromatography. A. 829 (1–2), 1–27.

Walter, T. H., Andrews, R. W. 2014. Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation. Trends in Analytical Chemistry. 63, 14–20.

Wilson, I. D. & Poole, C. F. 2009. Handbook of Methods and Instrumentation in Separation Science. Boston: Elsevier.

LIITTEET

Liite 1. Plasebon kromatogrammi spesifisyyttä varten



Liite 2. Diluentin kromatogrammi spesifisyyttä varten

