

ALENDRONAATIN MÄÄRITTÄMINEN KORKEAN EROTUSKYVYN NESTEKROMATOGRAFIALLA

Menetelmän kehittäminen ja validointi

Mirva Järvelä-Stölting

Opinnäytetyö
Kesäkuu 2012
Laboratorioalan koulutusohjelma
Tampereen ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma

JÄRVELÄ-STÖLTING, MIRVA:

Alendronaatin määrittäminen korkean erotuskyvyn nestekromatografialla:
Menetelmän kehittäminen ja validointi

Opinnäytetyö 47 sivua, joista liitteitä 1 sivu
Kesäkuu 2012

Bisfosfonaatit ovat farmakologisesti aktiivisia kemiallisia yhdisteitä, joita käytetään osteoporoosin ehkäisyssä ja hoidossa. Rakenteensa puolesta bisfosfonaatit muistuttavat epäorgaanista pyrofosfaattia ja ovat polaarisia yhdisteitä. Bisfosfonaatit sitoutuvat voimakkaasti luuhun ja estävät luuta hajottavien osteoklastien toimintaa.

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia on yleisesti käytetty analyysimenetelmä, joka soveltuu useiden yhdisteiden yhtäaikaiseen analysointiin samasta näytteestä. Etuna on lisäksi sen muunneltavuus, joka mahdollistaa menetelmän käytön useissa erilaisissa sovelluksissa. Opinnäytetyössä käytettiin UV-Vis-detektorilla varustettua korkean erotuskyvyn nestekromatografia alendronaatin määrittämiseen.

Alendronaatti on kliinisessä käytössä oleva tyyppiä sisältävä bisfosfonaatti. Haasteita alendronaatin analysointiin tuo sen rakenteesta puuttuva kromofori, jonka vuoksi alendronaatti ei absorboi UV-alueella. Derivatisoimalla alendronaatti sopivalla yhdisteellä, kuten o-ftaalialdehydillä, voidaan muodostaa UV-alueella absorboiva kompleksi, joka on mahdollista havaita UV-Vis-detektorilla.

Opinnäytetyössä kehitettiin ja validoitiin menetelmä alendronaatin määrittämiseksi korkean erotuskyvyn nestekromatografialla. Määritysmenetelmän soveltuvuutta erilaisille näytematriiseille tutkittiin määrittämällä alendronaattia puskurista, mediumista ja seerumista. Työssä todettiin kehitetyn menetelmän soveltuvuus käyttötarkoitukseensa. Menetelmän osoitettiin soveltuvan alendronaatin analysointiin vesi- ja puskurinäytteistä. Kehitettyä menetelmää voidaan jatkossa hyödyntää alendronaatin määrittämiseen erilaisista biologisista näytteistä.

Avainsanat: Bisfosfonaatti, alendronaatti, derivatisointi, validointi, HPLC

ABSTRACT

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

JÄRVELÄ-STÖLTING, MIRVA: Determination of Alendronate Sodium by High Performance Liquid Chromatography: Method Development and Validation

Bachelor's thesis 47 pages, appendices 1 page
June 2012

Bisphosphonates are used in the prevention and treatment of osteoporosis. They are polar and ionic compounds, which structurally resemble inorganic pyrophosphate. Bisphosphonates bind strongly to the bone and suppress the function of bone-resorbing cells, osteoclasts.

High performance liquid chromatography is a commonly used analytical method suitable for analyzing many different compounds simultaneously in the same sample. Method can be easily modified making it suitable for a wide variety of applications. In the present study, a high performance liquid chromatography equipped with an UV-Vis-detector was used to analyze alendronate.

Alendronate is a clinically used nitrogen-containing bisphosphonate. The lack of chromophore, the absorbing part of the structure, creates challenges for analyzing alendronate. By derivatising alendronate with a suitable reagent, such as *ortho*-phthaldialdehyde, an absorptive complex for UV-detection can be formed.

In the present study, a method for determining alendronate by high performance liquid chromatography was developed and validated. The validated method was shown to be suitable for analyzing alendronate from water and buffer samples. In the future, the developed method can be utilized for determining alendronate in various biological samples.

Key words: Bisphosphonate, alendronate, derivatisation, validation, HPLC.

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	5
2 TEOREETTINEN TAUSTA.....	6
2.1 Bisfosfonaatit	6
2.1.1 Bisfosfonaattien rakenne.....	6
2.1.2 Vaikutusmekanismi	8
2.1.3 Imeytyminen, jakautuminen ja erittyminen	9
2.1.4 Käyttö ja haittavaikutukset	10
2.2 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia	11
2.2.1 Periaate yleisesti	11
2.2.2 HPLC-sovellutuksia.....	12
2.2.3 Kolonnit ja kolonnin valinta	14
2.2.4 Erottuminen ja detektio.....	16
2.2.5 Käänteisfaasinestekromatografia	17
2.3 Näytteen käsittely	19
2.3.1 Näytteelle asetetut vaatimukset	19
2.3.2 Näytteen derivatisointi	19
2.3.3 Sisäisen standardin menetelmä.....	20
3 TYÖN TAVOITTEET	22
4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	23
4.1 Kromatografia.....	23
4.2 Standardit ja tasokontrollit.....	24
4.3 Näytteen valmistaminen ja derivatisointi.....	24
4.4 Menetelmävalidointi.....	25
4.4.1 Lineaarisuus ja tarkkuus.....	25
4.4.2 Määritys- ja toteamisraja	26
4.4.3 Toistettavuus.....	26
4.4.4 Herkkyys ja selektiivisyys.....	27
5 TULOKSET	28
5.1 Menetelmän kehittäminen ja olosuhteiden muokkaaminen.....	28
5.1.1 Näytteen derivatisointi	28
5.1.2 Menetelmäparametrit ja niiden muokkaaminen.....	29
5.1.3 Näytteen komponenttien identifiointi	31
5.1.4 Kompleksin säilyvyys.....	32
5.2 Validointitulokset	33
5.2.1 Lineaarisuus ja tarkkuus.....	35
5.2.2 Toteamis- ja määritysraja.....	37
5.2.3 Toistettavuus.....	37
5.2.4 Herkkyys ja selektiivisyys.....	40
5.3 Alendronaatin määrittäminen biologisista näytteistä.....	40
6 TULOSTEN TARKASTELU JA JOHTOPÄÄTÖKSET	41
7 LÄHTEET	44
LIITE 1: SANASTO	47

1 JOHDANTO

Bisfosfonaatit ovat ryhmä farmakologisesti aktiivisia kemiallisia yhdisteitä, joita syntetisoitiin aluksi veden pehmentäjiksi. Tutkimukset bisfosfonaattien vaikutuksista luusairauksien hoidossa alkoivat 1960-luvulla. Nykyisin niiden tiedetään estävän luuta hajottavien solujen, osteoklastien, toimintaa. Bisfosfonaatteja käytetään osteoporoosin ja eräiden muiden luometaboliahäiriöiden ehkäisyssä ja hoidossa. Lääkkeellisen käytön haasteena on kuitenkin niiden heikko imeytyminen ruuansulatuskanavasta. Bisfosfonaatit ovat ominaisuuksiltaan vahvasti polaaraisia ja ionisia tuoden haasteita myös niiden analysointiin.

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia on yleisesti käytetty analyysitekniikka, jolla voidaan samanaikaisesti analysoida useita yhdisteitä. Se soveltuu niin epäorgaanisille kuin orgaanisillekin näytteille ollen korvaamaton menetelmä muun muassa lääkeaineiden analysoinnissa. Korkean erotuskyvyn nestekromatografia perustuu yhdisteiden erottumiseen niiden ominaisuuksien, kuten rakenteen, molekyylikoon, polaarisuuden tai ionisuuden mukaisessa järjestyksessä.

Työn tarkoituksena oli perustaa ja validoida menetelmä bisfosfonaattiryhmään kuuluvan lääkeaineen, alendronaatin, määrittämiseen korkean erotuskyvyn nestekromatografialla. Tavoitteena oli lisäksi selvittää menetelmän soveltuvuutta lääkeaineen määrittämiseen erilaisista näytematriiseista, jotta menetelmää voidaan tulevaisuudessa hyödyntää alendronaatin mittaamiseen biologisista näytteistä.

Opinnäytetyö toteutettiin kevään ja kesän 2011 aikana Tampereen yliopiston lääketieteen laitoksella lääketieteen yksikössä immunofarmakologian tutkimusryhmässä. Opinnäytetyön ohjaajina toimivat FT Mari Hämäläinen ja professori Eeva Moilanen (Tampereen yliopisto) sekä opettajaohjaaja Outi Heiniö (Tampereen ammattikorkeakoulu).

2 TEOREETTINEN TAUSTA

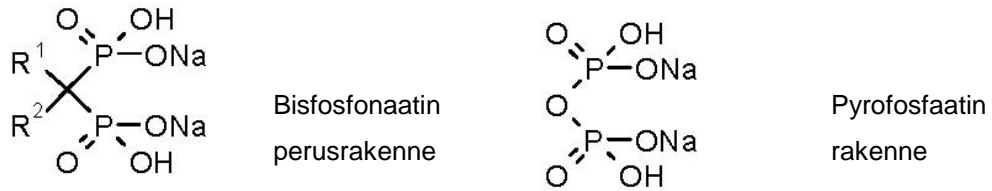
2.1 Bisfosfonaatit

Bisfosfonaatit ovat ryhmä farmakologisesti aktiivisia kemiallisia yhdisteitä, joiden on osoitettu vaikuttavan luometaboliaan. Niiden syntetisointi aloitettiin 1800-luvulla, jolloin niitä käytettiin veden pehmentäjinä. Ensimmäiset tutkimukset bisfosfonaattien vaikutuksista luusairauksien hoidossa alkoivat 1960-luvulla. Tutkimusten kautta pyrittiin selvittämään bisfosfonaattien mahdollisia vaikutuksia luumineraalin kiteisen hydroksiapatiitin hajoamiseen ja sitä kautta luukatoon. (Zacharis & Tzanavaras 2008)

Bisfosfonaatteja määritettiin aluksi lähinnä titraamalla. Kehityksen myötä nykytekniikka on mahdollistanut niiden määrittämisen modernein tekniikoin, kuten erilaisilla kromatografisilla menetelmillä. (Sparidans & den Hartigh 1999)

2.1.1 Bisfosfonaattien rakenne

Bisfosfonaatit ovat osteoporoosin ja joidenkin muiden kalsiumtasapaino- ja luometaboliahäiriöiden hoidossa käytettävien lääkeaineiden ryhmä. Rakenteensa puolesta ne muistuttavat epäorgaanista pyrofosfaattia. Erona labiilin eli pysymättömän pyrofosfaatin rakenteeseen verrattuna bisfosfonaateilla on happiatomin sijaan hiiliatomi fosfaattiryhmien välissä (kuvio 1). Tämä muutos mahdollistaa kahden uuden sivuketjun, R1 ja R2 (kuvio 1) liittymisen ja näin ollen bisfosfonaattien laajan kirjon (taulukko 1). Kovalenttisesti muodostunut stabiili P-C-P -rakenne on perustana bisfosfonaattien suurelle sitoutumistehokkuudelle luuhun. (Karamustafa & Çelebi 2006)



KUVIO 1. Bisfosfonaattien perusrakenne (vasemmalla), pyrofosfaatin rakenne (oikealla) (Turhanen & Vepsäläinen 2008 kuvaa mukailien Mirva Järvelä-Stölting)

Bisfosfonaatit jaetaan kahteen ryhmään: tyyppiä sisältäviin ja tyyttömiin bisfosfonaatteihin (taulukko 1). Bisfosfonaattien kemiallinen rakenne ja kemiallinen luonne aiheuttavat analyttisiä haasteita, sillä useiden bisfosfonaattien rakenteesta puuttuu UV-detektion kannalta välttämätön osa, kromofori. Lisäksi bisfosfonaatit ovat ominaisuuksiltaan vahvasti polaarisia ja ionisia. (Sparidans & den Hartigh 1999)

TAULUKKO 1. Bisfosfonaattien funktionaalisia ryhmiä (Catteral & Cawston 2002 kuvaa mukailien Mirva Järvelä-Stölting 2011)

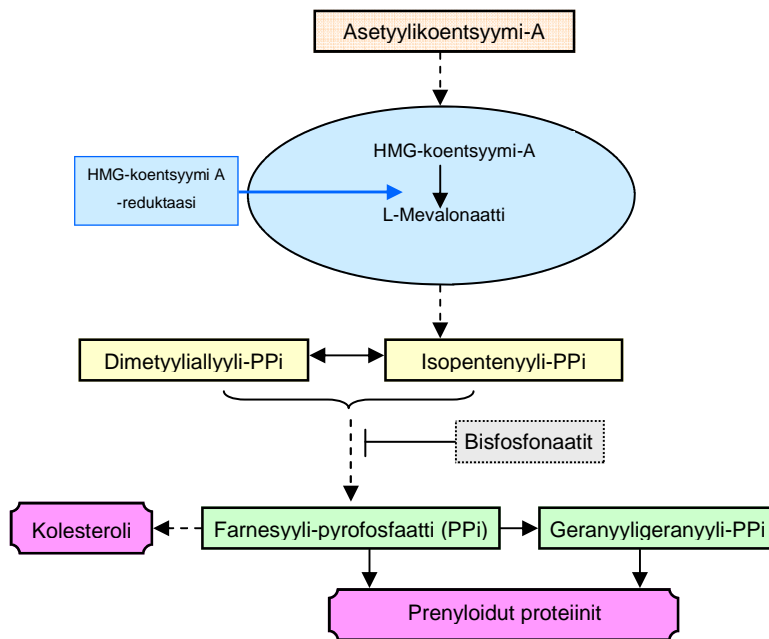
Bisfosfonaatti	R ₁ -sivuketju	R ₂ -sivuketju	
Etidronaatti	-OH	-CH ₃	} Typettömät bisfosfonaatit
Klodronaatti	-Cl	-Cl	
Tiludronaatti	-H	-S-C ₆ H ₄ -Cl	
Pamidronaatti	-OH	-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	} Tyypilliset bisfosfonaatit
Neridronaatti	-OH	-(CH ₂) ₅ -NH ₂	
Olpadronaatti	-OH	-(CH ₂) ₂ N(CH ₂) ₂	
Alendronaatti	-OH	-(CH ₂) ₃ -NH ₂	
Ibandronaatti	-OH	-CH ₂ -CH ₂ N(CH ₃)(CH ₂) ₄ CH ₃	
Risendronaatti	-OH		
Tsolendronaatti	-OH		

2.1.2 Vaikutusmekanismi

Bisfosfonaatit hakeutuvat voimakkaasti luuhun, jossa ne sitoutuvat hydroksiapatiittikiteisiin estäen niiden muodostumista ja liukenemistä. Luun resorptiossa osteoklastit aktivoituvat ja erittävät suolahappoa. Tämän seurauksena ympäristö happamoituu ja luuhun sitoutuneet bisfosfonaatit vapautuvat ja kertyvät osteoklasteihin endosytoosin avulla. (Hillilä 2007:749-754)

Bisfosfonaateilla on kaksi päävaikutusmekanismia. Typettömien bisfosfonaattien (etidronaatti, klodronaatti ja tiludronaatti) vaikutusmekanismi perustuu niiden metaboliaan solussa. Ne metaboloituvat ATP-analogeiksi, yhdisteiksi, jotka syrjäyttävät adenosiinitrifosfaatin (ATP) pyrofosfaatin puoleisen osan muodostaen ATP:n kanssa kilpailevan molekyylin. ATP-analogien kertyminen johtaa osteoklastien apoptoottiseen solukuolemaan ja luun hajoaminen vähenee. (Rogers 2010; Russel, Watts, Ebetino & Rogers 2008)

Typellisten bisfosfonaattien (muun muassa alendronaatti ja pamidronaatti) vaikutusmekanismi puolestaan perustuu niiden kykyyn estää farnesyylidifosfataasi-entsyymin (FPPS) toimintaa, mikä aiheuttaa häiriötä mevalonaattikierrossa (kuvio 2). Mevalonaattikierron tuotteina syntyy farnesyylipyrofosfaattia (FPP) ja geranyyligeranyyli-pyrofosfaattia (GGPP). Bisfosfonaatit estävät näiden prenyloivien metaboliittien, FPP:n ja GGPP:n muodostumista estäen samalla prenylaatiota, proteiinien transkription jälkeistä modifikaatiota. Eston seurauksena prenyloitujen proteiinien määrä vähenee ja/tai ei-prenyloitujen proteiinien määrä soluissa kasvaa. Tämän johdosta osteoklastien toiminta häiriintyy, ne ajautuvat apoptoosiin ja luun hajoaminen vähenee. Toisaalta FPPS-entsyymin eston seurauksena isopentenyylidifosfaatin (IPP) määrä soluissa kasvaa, ja muodostuu isopentenyyliä sisältäviä ATP-analogeja (Apppl). Ne estävät osteoklastien toimintaa indusoimalla niiden apoptoosia, mikä johtaa luun hajoamisen vähenemiseen. (Rogers 2010; Russel ym. 2008)



KUVIO 2. HMG-CoA-reitti (mevalonaattikierto) (Navarro, Cau & Lévy 2006; Roelofs, Thompson, Gordon & Rogers 2006 kuvia mukailien Mirva Järvelä-Stölting 2011)

2.1.3 Imeytyminen, jakautuminen ja erittyminen

Farmakologisten vaikutusten kannalta oleellisia ovat bisfosfonaattien molemmat fosfaattiryhmät. Muutokset näissä fosfaattiryhmissä vähentävät sitoutumista luumineraaliin. Jo yhden fosfaattihydroksyyli ryhmän metylaatio eli korvaaminen metyyli ryhmällä vähentää sekä luuhun sitoutumistehokkuutta että antiresorptiivista vaikutusta. Molempien fosfaattiryhmien metylaatio sen sijaan aiheuttaa kummankin ominaisuuden häviämisen. Bisfosfonaattien vaikutuksen voimakkuus vaihtelee eri yhdisteiden välillä. (Karamustafa & Çelebi 2006; Sparidans & den Hartigh 1999; Russel ym. 2008)

Bisfosfonaatit imeytyvät huonosti ruuansulatuskanavasta (taulukko 2) ja kalsium heikentää niiden imeytymistä entisestään. Ruuan ja joidenkin juomien, kuten kahvin ja appelsiinimehun, on myös raportoitu heikentävän selvästi bisfosfonaattien imeytymistä. Myös muut lääkeaineet saattavat vähentää bisfosfonaattien imeytymistä. (Hillilä 2007:749-754)

TAULUKKO 2. Bisfosfonaattien imeytyminen ruuansulatuskanavasta
(Hillilä 2007:749-754)

Bisfosfonaatti	Imeytyneen lääkeaineen osuus suun kautta otetusta annoksesta
Alendronaatti	0,6-0,8 %
Klodronaatti	1-2 %
Etidronaatti	3-4 %
Tiludronaatti	2-11 %

Imeytymisen jälkeen osa bisfosfonaattiannoksesta hakeutuu luuhun ja luuhun sitoutumaton osa eliminoituu muuttumattomana muutaman tunnin tai vuorokauden kuluessa virtsaan. Luuhun sitoutuneen bisfosfonaatin puoliintumisaika on tavallisesti useita vuosia ja sen eliminaationopeus riippuu luun metabolian aktiivisuudesta. Tästä syystä plasman bisfosfonaattipitoisuuden ja terapeuttisen vaikutuksen välillä ei ole korrelaatiota. (Hillilä 2007:749-754)

2.1.4 Käyttö ja haittavaikutukset

Bisfosfonaatteja käytetään osteoporoosin ja Pagetin luutaudin hoitoon sekä pahanlaatuisiin kasvaimiin liittyvän hyperkalsemian ja osteolyyttisten metastaasien hoitoon. Joillakin bisfosfonaateilla on esitetty olevan myös suoria syöpää ehkäiseviä vaikutuksia. Bisfosfonaatteja voidaan käyttää myös niin kutsuttuina luuskannereina määritettäessä muun muassa luun metastaaseja. Menetelmä perustuu bisfosfonaattien voimakkaaseen sitoutumiseen luumineraaliin sekä niiden kykyyn sitoa Tc-99-isotooppia. Bisfosfonaattien on todettu estävän glukokortikoidien luun haurastumista lisäävää vaikutusta sekä vähentävän glukokortikoidihoitoon liittyviä nikama- ja lonkkamurtumia. (Hillilä 2007:749-754; Karamustafa & Çelebi 2006; Väänänen 1996).

Tavallisimpia bisfosfonaattien haittavaikutuksia ovat erilaiset ruuansulatuskanavan oireet sekä lihas-, nivel- ja luusäryt. Tyypeä sisältävien bisfosfonaattien on todettu aiheuttavan oraalisesti annosteltuna myös esofagiittia ja ruokatorven haavaumia. (Zacharis & Tzanavaras 2008)

Pääasiallisesti bisfosfonaatit annostellaan oraalisesti, mutta joitakin bisfosfonaatteja, kuten tsolendronaattia voidaan antaa myös suonensisäisenä lääkehoitona (Hillilä 2007:749-754).

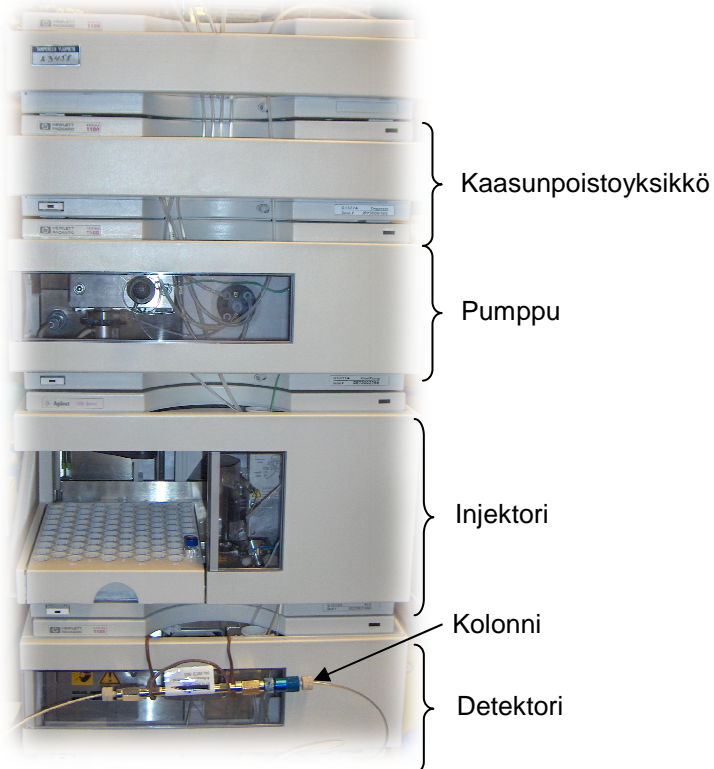
2.2 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC; High Performance Liquid Chromatography) on yleisesti käytetty analyysitekniikka, jolla voidaan samanaikaisesti analysoida useita yhdisteitä samasta näytteestä. Se soveltuu niin epäorgaanisille kuin orgaanisillekin näytteille ollen korvaamaton menetelmä muun muassa proteiinien, aminohappojen, lipidien ja lääkeaineiden analysoinnissa. Menetelmän käytön vaatimuksena on, että analysoitava näyte saadaan liukenemaan. Optimaalisin tilanne on, mikäli näyte voidaan liuottaa ajoliuokseen, eluenttiin, tai sen kaltaiseen matriisiin, kuten eluentin komponenttiin (Dong 2006:2,78-87).

2.2.1 Periaate yleisesti

HPLC -laitteisto koostuu pumpusta, injektorista, kolonnista ja detektorista sekä näitä yhdistävistä kapillaareista (kuva 1). Pumpun vaatimuksena on, että se pystyy pumppaamaan eluenttia tasaisella virtausnopeudella toistettavasti. Injektori puolestaan vastaa näytteen syöttämisestä korkeapaineiseen nestevirtaan. Injektointi voidaan suorittaa joko käsi-injektoinnilla tai automaattisen injektorin avulla. Nykyisin autoinjektorit ovat hyvin yleisesti käytössä taaten tasaisen ja toistettavan injektoinnin. (Dong 2006:2,78-87)

Injektorilta näyte etenee näytesilmukan kautta kapillaareja pitkin kolonniin, jossa erottuminen tapahtuu. Näytteen erottuessa sen komponentit etenevät kolonnissa eri nopeudella saapuen detektorille eluoitusjärjestyksessä. Ilmaisin eli detektori tunnistaa signaalin ja välittää sen tietokoneelle, jossa se muutetaan ohjelmiston avulla graafiseen muotoon, kromatogrammiksi, tulosten analysointia varten. (Dong 2006:2,78-87)



KUVA 1. HP 1100-nestekromatografi (Mirva Järvelä-Stöltzing 2011)

2.2.2 HPLC-sovellutuksia

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia on monipuolinen analyysimenetelmä mahdollistaen suuren määrän erilaisia sovellutuksia. Laitteen ominaisuuksia ja komponentteja sekä analyysiolosuhteita muuttamalla voidaan menetelmää soveltaa hyvinkin erilaisille näytteille. HPLC-sovelluksien etuna moniin muihin menetelmiin verrattuna on niiden kyky määrittää yhtä aikaa samasta näytteestä useita eri analyyttejä.

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia voidaan muunnella kolonnityyppejä vaihtamalla. Yleisimmät sovellutukset ovat normaalifaasinestekromatografia (NPLC, Normal Phase Liquid Chromatography), käänteisfaasinestekromatografia (RPLC, Reversed Phase Liquid Chromatography), ioninvaihtokromatografia (IEC, Ion-Exchange Chromatography) ja kokoeksklusiokromatografia (SEC, Size-Exclusion Chromatography). (Harris 2007:556-557)

Analysointimenetelmä voi olla isokraattinen tai gradienttinen. Isokraattisessa menetelmässä ajo-olosuhteet pidetään vakiona koko analyysin ajan. Tällöin ajoliuoksena on valmis liuotinkeos, jonka koostumus ei muutu analyysin aikana. Myös muut olosuhteet, kuten virtausnopeus ja lämpötila pysyvät muuttumattomina. Gradienttimenetelmässä ajon aikana muutetaan ajo-olosuhteita kuten eluentin koostumusta tai analyysin lämpötilaa joko liukuvasti tai portaittain. Gradienttimenetelmän etuna on sen soveltuvuus näytteille, joiden komponenttien erottuminen tuottaa vaikeuksia. Tällaisia ovat esimerkiksi näytteet, joiden komponentit eluoituvat niin lähekkäin, että piikkien erottuminen on vaikeaa. Toisaalta myös näytteet, joiden komponentit eluoituvat hyvin etäällä toisistaan aiheuttavat ongelmia kokonaisajoaikojen pidentyessä kohtuuttomiksi. Gradienttiajolla voidaan vaikuttaa niin eluoitumiseen kuin resoluutioonkin ja sitä kautta luoda optimaaliset ajo-olosuhteet. (Harris 2007:565)

Yleisimpiä HPLC-laitteistoon liitettäviä detektoreita ovat UV-Vis-detektori, fluoresenssidetektori ja massaspektrometri. UV-Vis-detektori on edullinen ja moniin tarkoituksiin soveltuva vaihtoehto. Käytön vaatimuksena on, että näyte absorboi näkyvän tai ultraviolettivalon aallonpituusalueella 190-900nm. UV-Vis-detektorin toiminta perustuu Lambert-Beerin lakiin, jossa absorbanssi on suoraan verrannollinen valon aineessa kulkemaan matkaan ja aineen konsentraatioon. (Jaarinen & Niiranen 2005:165-166)

Fluoresenssidetektori nostaa menetelmän herkkyyttä jopa 1000-kertaiseksi UV-Vis-detektoriin verrattuna. Fluoresenssidetektorin käyttö edellyttää näytteeltä fluoresoivaa ominaisuutta. Vain harvat yhdisteet ovat luonnostaan fluoresoivia, joten näytteiden derivatisointi fluoresoiviksi yhdisteiksi on tavallista fluoresenssidetektoria käytettäessä. (Harris 2007:613-615)

Kehityksen ansiosta massaspektrometrien koko on pienentynyt ja hinta alentunut mahdollistaen niiden yleistymisen HPLC-detektorina. Massaspektrometrin käytön edellytyksenä on näytteen ionisoituminen sekä faasin muutos nestemäisestä kaasuksi. Massaspektrometrin etuna on sen kyky tuottaa sekä kvalitatiivista että kvantitatiivista informaatiota näytteestä. (Harris 2007:488-495)

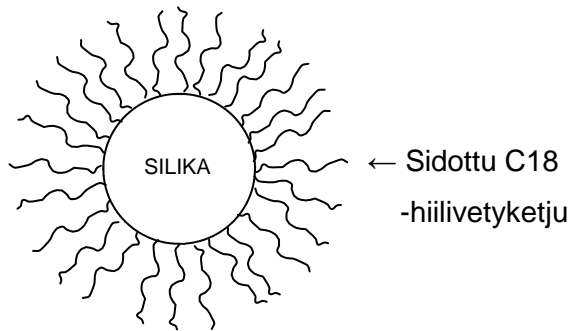
Uusin HPLC-sovellus on ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia. UHPLC-sovellus on jopa 40 kertaa tavallista HPLC-menetelmää nopeampi ja kuluttaa vain murto-osan tavanomaisesta eluenttimäärästä. Menetelmä perustuu kolonnin pienempään partikkelikokoon ja/tai suurempaan ajoliuoksen virtausnopeuteen ja korkeampaan paineeseen. Laitteistojen käyttö on yleistynyt ja sen myötä ovat yleistyneet myös kolonnit, joiden avulla tavanomainen HPLC-laitteisto voidaan muuntaa UHPLC-laitteeksi. (Desai, Andreae, Mullen, Holl & Baker 2011)

2.2.3 Kolonnit ja kolonnin valinta

Kolonneja on kolmea päätyyppiä: perinteisiä adsorptiofaaseja, kemiallisesti sidottuja faaseja sekä ioninvaihtofaaseja. Niiden käyttökohteet eroavat toisistaan siten, että perinteisiä adsorptiofaaseja käytetään yleensä normaalifaasikromatografiassa, kemiallisesti sidottuja faaseja käänteisfaasikromatografiassa ja ioninvaihtofaaseja ioninvaihtokromatografiassa.

Normaali- ja käänteisfaasikolonnit eroavat toisistaan niiden stationäärifaasimateriaalin poolisuuden perusteella. Normaalifaasikolonneissa stationäärifaasi on poolisempi kuin liikkuva faasi (ajoliuos), jonka vuoksi poolittomat aineet eluoituvat ensimmäisenä poolittomamman eluentin mukana. Käänteisfaasikolonnissa eluoitusjärjestys on päinvastainen. (Harvey 1999:579-580)

Normaalifaasikolonnien täytemateriaalina käytetään yleisesti silikaa ja siihen sidottuja poolisia yhdisteitä. Käänteisfaasikolonnien täytemateriaalina puolestaan on pooliton kemiallisesti sidottu faasi, kuten silikaan sidotut hiilivetyketjut (kuvio 3), joista yleisimpiä ovat oktyyli-C8 ja oktadekyyli-C18-pinnoitukset. Nimitys (C₈, C₁₈) viittaa hiilivetyketjun pituuteen ilmaisten ketjun hiiliatomien lukumäärän. Pidempien hiilivetyketjujen etu on niiden suurempi retentiovoimakkuus lyhyempiin ketjuihin verrattuna. (Harvey 1999:579-580)



KUVIO 3. Käänteisfaasikolonnin täytemateriaalin rakenne

Myös ioninvaihtofaasin täytemateriaalina käytetään pinnoitettua silikapohjaista materiaalia. Stationäärifaasiksi voidaan valita joko kationi- tai anionivaihdin tutkittavan näytteen ominaisuuksien mukaisesti. Sitoutumisvoimakkuus on riippuvainen yhdisteen varaustiheydestä. Ioni, jolla on suurempi varaus, pidättäytyy pidempää kolonnissa, jolloin sen retentioaika pitenee. (Harris 2007:589-590)

Esikolonne

Esikolonnin tarkoituksena on suojata varsinaista, analyttistä kolonnia epäpuhtauksilta ja muilta analyysiä haittaavilta tekijöiltä ja pidentää analyttisen kolonnin käyttöikä (Harris 2007:559; Harvey 1999:578-579). Esikolonne liitetään analyysikolonnin edelle. Sen tehtävänä on kerätä liukenemattomat ja eluoitumattomat näytekomponentit, jotka muutoin kertyvät analyttisen kolonnin alkupäähän (Jaarinen & Niiranen 2005:155). Esikolonne antaa suojan lisäksi niin ajoliuoksesta, näytteestä kuin itse laitteestakin peräisin oleville epäpuhtauksille. Ajoliuoksen suodattamisesta huolimatta se voi sisältää erilaisia partikkeleita, kuten ilmasta peräisin olevia pienhiukkasia. Esimerkiksi pöly voi tukkeuttaa kolonnin ja lyhentää olennaisesti sen käyttöikä. Näyte voi sisältää erilaisia suurimolekyylisiä komponentteja, kuten proteiineja, jotka voivat tukkia kolonnin. Laitteesta peräisin olevia kolonnin uhkaavia tekijöitä ovat muun muassa erilaiset tiivisteistä irronneet hiukkaset. (Neue 2002; Harris 2007:559)

Kolonnin valinta

Kolonnin valintaan vaikuttaa pääasiallisesti kolonnin täytemateriaali, sen partikkelikoko sekä kolonnin pituus. Kolonneja verrattaessa tärkeitä tekijöitä ovat myös täytemateriaalin rakenne, muoto, huokoskoko, aktiivinen pinta-ala sekä kokojakauma. Ratkaisevasti vaikuttavat lisäksi täytemateriaalin valmistustapa ja hiilivetyketjun pituus. Pienempi partikkelikoko parantaa erotuskykyä, mutta ongelmaksi voi muodostua korkea vastapaine ajettaessa suuremmilla virtausnopeuksilla. Kolonnin pituus on suoraan verrannollinen retentioaikaan: mitä lyhyempi kolonni, sitä lyhyempi retentioaika. Kolonnia valittaessa tulee huomioida käyttötarkoituksen lisäksi määritettävän analyytin ominaisuudet, kuten sen kemiallinen rakenne, funktionaaliset ryhmät ja molekyylikoko. Analyytin kemiallinen rakenne vaikuttaa oleellisesti sen eluotumiseen ja näin ollen myös kolonnin valintaan. Esikolonnia valitessa tulee huomioida, että sen täytemateriaali on sama kuin analyytissä kolonnissa. (Harris 2007:559)

2.2.4 Erottuminen ja detektio

Korkean erotuskyvyn nestekromatografiassa yhdisteet erottuvat kolonnissa suhteessa niiden erilaisiin affiniteetteihin stationääri- ja liikkuvaan faasiin. Näin ollen erilaiset yhdisteet kulkeutuvat kolonnissa eri nopeuksilla, mikä mahdollistaa niiden erottumisen. (Harris 2007:559-565)

Erottumisella tarkoitetaan yksittäisen analysoitavan yhdisteen erottumista muista samalla aallonpituudella havaittavista yhdisteistä. Erottumiseen voidaan olennaisesti vaikuttaa eluentin koostumuksella. Normaalifaasikromatografiassa eluentin poolisuuden lisääminen kasvattaa poolisten yhdisteiden eluutiovoimakkuutta vähentäen niiden pidättymistä eli retentiota. Käänteisfaasikromatografiassa poolisuuden lisääminen puolestaan vähentää eluutiovoimakkuutta lisäten poolisten yhdisteiden retentiota. (Harris 2007:559-565)

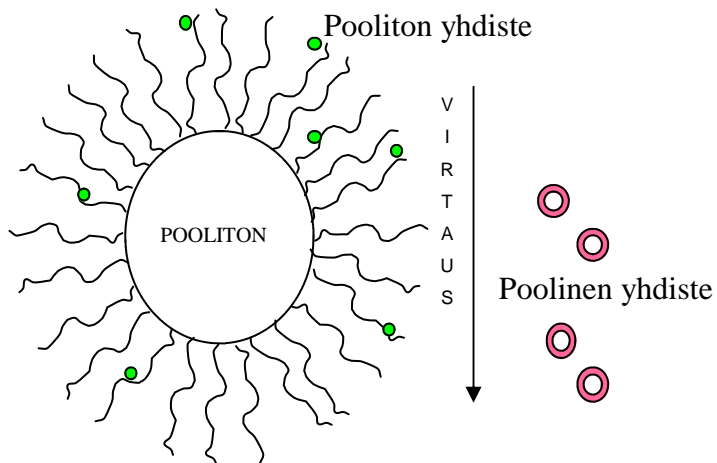
Erottumiseen voidaan vaikuttaa lisäksi injektointimäärällä ja virtausnopeudella. Myös kolonnin ikä ja lämpötila vaikuttavat oleellisesti erottumiseen. (Barwick 1999) Virtausnopeutta laskemalla saadaan yleensä resoluutiota kasvatettua (Harris 2007:559-565). Samoin injektointimäärää pienentämällä resoluutio kasvaa piikin pienentyessä, terävöityessä ja sen pohjan leveyden kaventuessa (Barwick 1999).

Detektiolla tarkoitetaan määritettävän analyysin tuottaman signaalin havaitsemista. Detektio tapahtuu eluotumisjärjestyksen mukaisesti laitteistoon liitetyn detektorin avulla. Detektori havaitsee näytteen komponentin tuottaman signaalin, joka on verrannollinen sen konsentraatioon ja injektioilavuuteen. Detektointi ei yleensä muuta näytettä, joten tarvittaessa näyte voidaan kerätä talteen mahdollisia jatkotutkimuksia varten. (Jaarinen & Niiranen 2005:165-166)

Ominaisuuksiltaan detektorin tulee olla mahdollisimman herkkä havaitakseen pienetkin muutokset analyysin pitoisuuksissa. Toisaalta detektori ei kuitenkaan saa olla herkkä virtauksen tai lämpötilan muutoksille. Näin ollen herkkää yleisdetektoria on lähes mahdotonta löytää ja detektorin valintaan vaikuttaa olennaisesti tutkittava analyysi. Toisinaan detektointiin käytetään jopa kahta tai useampaa detektoria. (Jaarinen & Niiranen 2005:165-166)

2.2.5 Käänteisfaasinestekromatografia

Käänteisfaasinestekromatografiassa stationäärifaasi on pooliton ja eluentti poolinen, joten pooliset yhdisteet, kuten karboksyylihapot eluotuvat ensimmäisenä (kuvio 4). Mitä hydrofobisempi yhdiste on, sitä suurempi on sen retentio ja sitä pidempään yhdiste pidättäytyy kolonnissa. Esimerkkeinä hydrofobisista yhdisteistä ovat alifaattiset hiilivedyt, jotka eluotuvat viimeisenä. (Harvey 1999:580-582)



KUVIO 4. Käänteisfaasinestekromatografian periaate (mukaillen Harris 2007:563 Mirva Järvelä Stölting 2011)

Pooliton stationäärifaasi on yleisimmin oktadekyylipinnoitettu silika (C18, RP-18) mutta myös oktyylipinnoitusta (C8) käytetään. Stationäärifaasilla on eluentin ohella suuri vaikutus erottumiseen. Pidemmät hiilivetyketjupinnoitteet, kuten C18 ovat materiaalina hydrofobisempia ja näin ollen niiden retentiovoimakkuus on suurempi. Myös silikapohjaisen materiaalin vapaiden hydroksyyliyhdyntien määrä vaikuttaa erottumiseen. Vaikutus kasvaa hiilivetyketjun lyhetessä. Vapaiden hydroksyyliyhdyntien vaikutusta pyritään vähentämään endcapping-käsittelyllä, jossa vapaat hydroksyyliyhdyntien suojataan pienikokoisella organosilaanilla, kuten trimetyylisilaanilla. (Harris 2007:575-580)

Tavallisesti käänteisfaasikromatografiassa eluentti koostuu vesi- tai puskuriliuoksesta sekä siihen lisätyistä orgaanisista komponenteista. Vesi- tai puskuriliuoksella on käänteisfaasimenetelmässä heikoin liuotuvoimakkuus, jota voidaan lisätä orgaanisen komponentin avulla. Yleissääntönä voidaan todeta, että kun orgaanisen komponentin määrää lisätään, kaikkien yhdyntien retentio heikkenee, kun eluentin liuotuvoimakkuus kasvaa. (Harris 2007:575-580)

2.3 Näytteen käsittely

HPLC-analytiikassa vaaditaan usein jonkinlaista näytteen käsittelyä ennen määrittystä. Vähimmäisvaatimus on yleensä suodattaminen, jotta näytteen sisältämät mahdolliset liukenemattomat hiukkaset saadaan poistettua.

2.3.1 Näytteelle asetetut vaatimukset

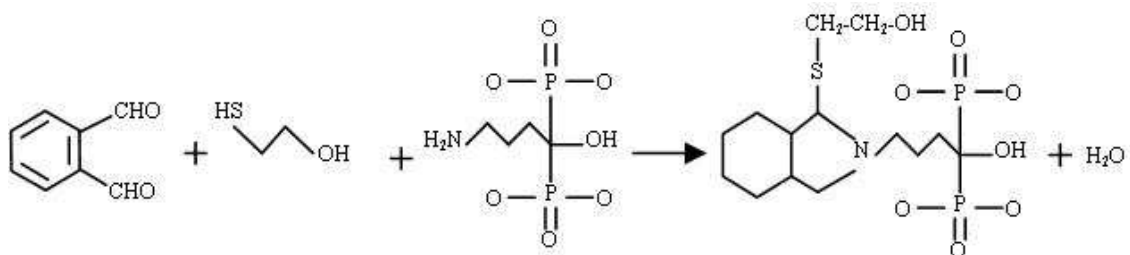
Näytteelle asetettu perusvaatimus HPLC-analytiikassa on, että se saadaan liukenemaan. Näytteen saostumisen välttämiseksi valitaan liuottamiseen eluentti tai sitä heikompi liuotin. Käänteisfaasikromatografiassa liuotin valitaan niin, että se on eluentin orgaanista komponenttia laimeampi liuotinomaisuudeltaan. Liuennut näyte voidaan suodattamisen sijaan myös sentrifugoida liukenemattomien hiukkasten eliminoimiseksi ennen injektointia. Joskus näyte vaatii lisäksi esikäsittelyn, kuten esimerkiksi proteiinien saostamisen. Kuitenkin aina ennen analyysin aloittamista tulee varmistaa, ettei näyte muodosta sakkaa käytettävän eluentin kanssa. Gradienttimenetelmää käytettäessä ei riitä, että näyte ei muodosta sakkaa ajoliuoksen komponenttien kanssa vaan on myös tarkistettava, ettei näyte saostu minkään ajon aikaisen ajoliuoskoostumuksen kanssa. (Jaarinen & Niiranen 2005:170)

2.3.2 Näytteen derivatisointi

Derivatisoinnilla tarkoitetaan jonkin yhdisteen ominaisuuksien muokkaamista halutunlaisiksi (Sparidans & den Hartigh 1999). Derivatisointi perustuu usein aktiivisen vedyn korvaamiseen alkyyli ryhmällä eli alkylaatioon tai asyyli ryhmän lisäämiseen eli asylaatioon. Derivoinnilla voidaan helpottaa erilaisten yhdisteiden eristystä, analysointia tai identifiointia. Derivatisoinnilla voidaan parantaa retentiota yhdisteitä erotettaessa sekä vahvistaa detektiovastetta, esimerkiksi leimaamalla analysoitava yhdiste absorboivilla tai fluoresoivilla ryhmillä. Derivatisoitu näyte voidaan tämän jälkeen havaita tavalliseen tapaan UV-Vis tai fluoresenssidetektorilla. Derivatisoinnista on apua erityisesti

analysoitaessa isomeerisiä yhdisteitä, joiden erottaminen toisistaan on muutoin hyvin hankalaa. (Sparidans & den Hartigh 1999; Sirén, Perämäki & Laiho 2009:340-342)

Derivatisointiin käytettäviä yhdisteitä on useita, esimerkkinä mainittakoon OPA (orto-ftaaldialdehydi), FMOc (9-fluorenyylimetyylikloroformaatti), NDA (2,3-naftaleenidikarboksialdehydi) ja erilaiset metalli-ionit. Kuviossa 5 on kuvattu OPA-reagenssin (orto-ftaaldialdehydi + β -merkptoetanoli) reaktio alendronaatin kanssa. OPA reagoi ensin β -merkptoetanolin kanssa ja tämän jälkeen alendronaatin amiiniryhmän kanssa muodostaen kompleksin. Kompleksin muodostuminen on nopea ja kvantitatiivinen reaktio, joka tapahtuu huoneenlämpötilassa. Emäksiset olosuhteet (pH>9) ovat edellytyksenä kompleksin muodostumiselle. (Jones 1986:121-151)



KUVIO 5. OPA-reagenssin reaktio alendronaatin kanssa

Hyvältä leimayhdisteeltä vaaditaan kvantitatiivisuutta, spesifisyyttä ja nopeaa reaktiokykyä muodostaessaan johdoksen analysoitavan aineen kanssa. Edellytyksenä onnistuneelle derivatisoinnille on menetelmän toistettavuus ja optimoidut olosuhteet. Usein sisäisen standardin käyttö onkin suositeltavaa virhelähteiden minimoimiseksi. (Sparidans & den Hartigh 1999; Sirén ym. 2009:340-342)

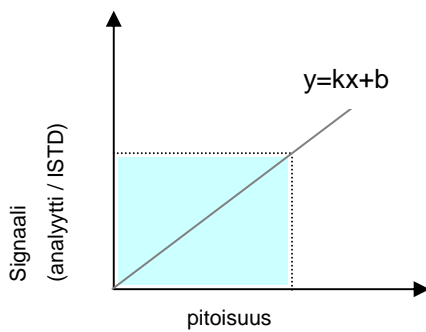
2.3.3 Sisäisen standardin menetelmä

Sisäisellä standardilla (ISTD, internal standard) tarkoitetaan näytteeseen vakiopitoisuutena lisättävää yhdistettä, jonka käytön tarkoituksena on minimoida määritysten välistä eroavaisuutta sekä muiden tekijöiden, kuten pipetoinnin tai

injektoinnin tuomaa virhettä. Sisäistä standardia käytettäessä voidaan esimerkiksi lämpötilan aiheuttamat vaihtelut retentioajoissa tai vasteissa eliminoida. (Harris 2007:90-91; Sirén ym. 2009:193)

Sisäisen standardin tulee olla kyllin samankaltainen näytteen analyytin kanssa ja eluoitua mahdollisimman lähellä itse analyytin retentioaikaa erottuen siitä kuitenkin selvästi. Lisäksi on varmistettava, etteivät näyte ja sisäinen standardi sisällä toisiaan analysoimalla ne erikseen. (Harvey 1999:115-117; Sirén ym. 2009:193)

Tuloksia laskettaessa analyytin piikin pinta-alan tai korkeuden arvon sijaan käytetään analyytin ja sisäisen standardin pinta-alojen tai korkeuksien suhdetta kuvion 6 mukaisesti. (Harvey 1999:119; Sirén ym. 2009:193)



KUVIO 6. Tulosten laskenta ISTD-menetelmässä

3 TYÖN TAVOITTEET

Työn tarkoituksena oli perustaa ja validoida menetelmä käytössä olevalle Hewlett Packard 1100 -laitteelle alendronaatin määrittämistä varten. Kirjallisuuden perusteella tiedettiin, että OPA-reagenssilla derivatisoitu alendronaatti voidaan määrittää UV-Vis-detektorilla. Tavoitteena oli tutkia menetelmän soveltuvuutta alendronaatin määrittämiseen erilaisista näytematriiseista, jotta tulevaisuudessa menetelmää voitaisiin hyödyntää laajemmin lääkeaineanalysointiin.

Tavoitteena oli

- 1) kehittää ja validoida menetelmä alendronaatin määrittämiseen Hewlett Packard 1100 -laitteella
- 2) tutkia validoidun menetelmän soveltumista alendronaatin määrittämiseen erilaisista näytematriiseista.

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1 Kromatografia

Alendronaatin määrittämiseksi korkean erotuskyvyn nestekromatografialla valittiin analyttiseksi kolonniksi Hitachi LaChrom Ultra 4.6x100mm, 3 μ m – käänteisfaasikolonne (kuva 2). Analyttisen kolonnin suojaamiseksi ja käyttöiän pidentämiseksi siihen liitettiin Chromolith® 5-4,6mm RP18e -esikolonne. Määrittämiin käytettiin Hewlett Packard 1100 –laitetta (kuva 1) ja laitteiston hallintaan sekä tulosten analysointiin ChemStation -ohjelmaa.



KUVA 2. Hitachi LaChrom Ultra 4.6x100mm, 3 μ m (Mirva Järvelä-Stölting, 2011)

Kirjallisuutta mukailien valittuja ajo-olosuhteita (taulukko 3) kehitettiin työhön soveltuviksi muokkaamalla jokaista yksitellen. Aluksi tutkittiin ajoliuoksen erilaisia koostumuksia muuttamalla orgaanisten komponenttien, metanolin ja asetonitriliin, suhdetta puskuriliuoksen (natriumsitraatti, pH=4,9) määrän pysyessä vakiona. Ajoliuoksen koostumusta (natriumsitraatti-metanoli-asetonitrili, 60:20:20, v/v/v) lähdettiin muuttamaan siten, että poolisemmän komponentin, metanolin, suhteellista määrää nostettiin asteittain 30 prosenttiin saakka kokonaistilavuudesta, jolloin samanaikaisesti asetonitriliin määrää laskettiin samassa suhteessa.

TAULUKKO 3. Lähtöparametrit

Laitteisto	HPLC (HP-1100)
Menetelmä	RPLC-ISTD
Kolonni	Hitachi LaChrom Ultra 4.6x100mm, 3µm (RP-18)
Ajoliuos	0,25 M Na-sitraatti/metanoli/asetonitrili (60:20:20 v/v/v)
Ajoaika	ei määritelty
Virtausnopeus	0,8 ml/min
Injektio­tilavuus	10 ul
Aallonpituus	334nm
Retentioaika	ei määritelty
Detektori	UV-Vis

Menetelmän virtausnopeuden ja injektio­tilavuuden vaikutuksia yhdisteiden erottumiseen tutkittiin muuttamalla virtausnopeutta välillä 0,6-0,8ml/min ja injektio­tilavuutta välillä 5-10ul. Analyysiaallonpituus määritettiin kirjallisuutta mukailleen analysoimalla derivatisoidun alendronaatin kokonaisspektri spektrofotometrisesti aallonpituudella 250-400nm (kuvio 7).

4.2 Standardit ja tasokontrollit

Määrittämiä varten valmistettiin alendronaatista ja pamidronaatista pitoisuudeltaan 1mM kantaliuokset veteen. Kantaliuoksia valmistettiin yhdellä kertaa suurempi määrä, joka jaettiin käytön kannalta sopiviin eriin ja pakastettiin. Samalla valmistettiin alendronaatista tasokontrollinäytettä veteen, joka jaettiin eriin ja pakastettiin.

4.3 Näytteen valmistaminen ja derivatisointi

Alendronaatin ja pamidronaatin rakenteista puuttuvan kromoforin vuoksi näytteet derivatisoitiin OPA-reagenssilla ennen injektointia. OPA-reagenssi valmistettiin liuottamalla 5mg *o*-ftaalialdehydiä 5 millilitraan milliQ-vettä. OPA-reagenssiin lisättiin β -merkaptotaetania suhteessa 1:200.

Alendronaattia laimennettiin näytteeksi eriin jaetusta standardikannasta ja siihen lisättiin vakioilavuus sisäistä standardia, jonka loppupitoisuus näytteessä oli 60µM. Tämän jälkeen näyte alkalisoitiin emäksisten olosuhteiden saavuttamiseksi. Lopuksi näytteeseen lisättiin OPA-reagenssia (o-ftaaldialdehydi 1mg/ml, 0,5% β-merkaptotetanolia) muodostamaan absorboivan kompleksin. Derivatisoidusta näytteestä pipetoitiin näyteputkeen 100µl määritystä varten.

4.4 Menetelmävalidointi

4.4.1 Lineaarisuus ja tarkkuus

Menetelmän lineaarisuus voidaan määrittää standardisuoran avulla. Validoitaessa menetelmää lineaarisuuden määrittämiseksi kukin standardi tulee määrittää vähintään kolme kertaa. Lineaarisuutta kuvataan sekä standardisuoran korrelaatiokertoimen että standardien residuaalien avulla. Residuaali tarkoittaa näytteen laskennallisen ja todellisen arvon erotusta. (Dong 2006:231-232; Harvey 1999:118)

Lineaarisuus määritettiin sekä veteen että puskuriin (Sörensen: 0,0546M Na₂HPO₄*H₂O, 0,0121M KH₂PO₄, pH=7,4) tehdyistä standardeista käyttäen kymmentä alendronaattipitoisuutta (1.95-1000uM) sekä nollanäytettä. Saaduista tuloksista piirrettiin kuvaajat, jossa x-akselilla on standardien laskennalliset pitoisuudet ja y-akselilla analyytin piikin pinta-alan suhde sisäisen standardin piikin pinta-alaan. Menetelmän lineaarisuutta määritettiin laskemalla kuvaajien korrelaatiokertoimet sekä standardien residuaaliarvot. (Dong 2006:231-232)

Tarkkuudella tarkoitetaan mitatun ja laskennallisen arvon välistä yhteyttä systemaattinen ja satunnaisvirhe huomioiden. Tarkkuutta ilmaistaan yleensä mittaustuloksen (±hajonta) luotettavuustasolla, joka määritellään menetelmästä riippuen välille 95-99% todellisesta arvosta. (Dong 2006:232)

4.4.2 Määritys- ja toteamisraja

Määritys- eli kvantitointirajalla tarkoitetaan analyytin pienintä pitoisuustasoa matriisia vastaan mitattuna, joka tietyllä luotettavuustasolla voidaan mitata kvantitatiivisesti.

Toteamis- eli detektoriraja ilmaisee sellaista analyytin pitoisuutta, jota vastaava mittalaitteen antama signaalitaso on luotettavasti todettavissa eroten merkittävästi nollanäytteiden antamasta signaalivaihtelusta. (Dong 2006:232)

4.4.3 Toistettavuus

Toistettavuudella tarkoitetaan menetelmän yhteneväisyyttä määrityskertojen välillä. Menetelmän toistettavuutta voidaan mitata valmistamalla tietyn pitoisuuden sisältämää näytettä ja jakamalla se yhtä suuriin eriin tasokontrollinäytteiksi. Toistettavuusnäytteitä analysoidaan useita peräkkäin mahdollisimman identtisellä tavalla mitään muuttamatta. Sama toistetaan myös eri ajojen välillä. Näin ollen voidaan arvioida sekä yhden yksittäisen ajon että useiden erillisten ajojen yhteneväisyyttä. Toistettavuustestauksella voidaan osoittaa analysoitujen näytteiden tulosten olevan vertailukelpoisia keskenään ja se mahdollistaa suurienkin aineistojen määrittäminen. CV% (coefficient of variation) eli variaatiokerroin on määritettyjen näytteiden keskihajonnan suhde keskiarvoon prosentteina. Yksittäisen ajon sisäistä variaatiokerrointa kutsutaan intraCV%:ksi ja erillisten ajojen variaatiokerrointa interCV%:ksi. (Dong 2006:234)

Toistettavuuden varmistamiseksi joka ajossa analysoitiin kolme tasokontrollinäytettä (ajon alussa, keskellä ja lopussa), jotta voitiin osoittaa saman ajon yhteneväisyys ja eri ajojen vertailukelpoisuus tuloksia vertailtaessa. Toistettavuusnäytteistä laskettiin sekä intra- että interCV% -arvot.

4.4.4 Herkkyys ja selektiivisyys

Herkkyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä havaita näytepitoisuuksien pieniä eroja. HPLC:llä herkkyys tarkoittaa mitatun signaalin arvomuutoksen suhdetta analyytin pitoisuuden muutokseen. Linearisella alueella herkkyuden arvo on vakio eli standardisuoran kulmakertoimen suuruinen. Pienen pitoisuuden muutoksen aiheuttama suuri muutos detektorin vasteessa osoittaa menetelmän herkkyuden. (Jaarinen & Niiranen 2005:11-13)

Selektiivisyydellä kuvataan sitä, kuinka hyvin analyytit voidaan erottaa matriisista ja muista yhdisteistä. Menetelmän voidaan todeta olevan selektiivinen, mikäli analyytit voidaan spesifisesti määrittää muiden piikkien joukosta. (Harvey 1999:40)

5 TULOKSET

5.1 Menetelmän kehittäminen ja olosuhteiden muokkaaminen

Menetelmän kehittäminen aloitettiin keräämällä kirjallisuudesta erilaisia tapoja ja parametrejä alendronaatin määrittämiseksi HPLC:llä. Olosuhteisiin sopivia parametrejä kerättiin yhteen ja niitä muokkaamalla määritettiin lähtöparametrit (taulukko 3). Parametrejä valitessa huomioitiin niin kolonnille asetetut pH-raja-arvot kuin näytekompleksinkin vaatimat olosuhteet. Nämä tekijät vaikuttivat erityisesti eluentin valinnassa. Kirjallisuuden perusteella valittuja lähtöparametrejä kehitettiin ja muokattiin edelleen työhön sopiviksi.

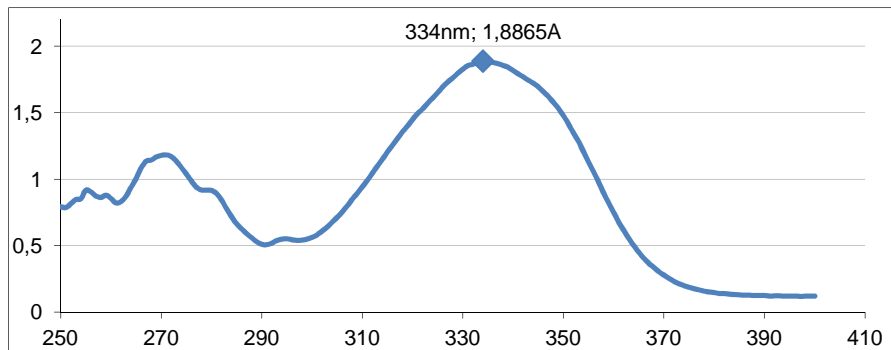
5.1.1 Näytteen derivatisointi

Haasteita alendronaatin määrittämiseen UV-Vis-detektorilla tuo sen rakenteesta puuttuva kromofori. Kirjallisuuden perusteella tiedettiin, että derivatisoimalla alendronaatti esimerkiksi *orto*-ftaalialdehydillä sen määrittäminen UV-Vis –detektorilla on mahdollista.

Määrittystä varten pipetoitiin eppendorf-putkeen 136ul näytettä, johon lisättiin 9ul 1mM pamidronaattikantaliuosta sisäiseksi standardiksi. Tällöin sisäisen standardin loppupitoisuudeksi saatiin 60uM. Näyte alkalisoitiin kompleksin muodostumiselle välttämättömien olosuhteiden (pH>9) saavuttamiseksi lisäämällä näytteeseen 2ul 10M natriumhydroksidia ja vorteksoitiin huolellisesti. Näyte derivatisoitiin lisäämällä siihen 13ul OPA-reagenssia (1mg/ml *o*-ftaalialdehydi + 0,5% β -merkaptetaanoli). Näyte vorteksoitiin kevyesti ja sekoitettiin vielä pipetoimalla 100ul:n tilavuutta edestakaisin muutaman kerran. Näytteestä pipetoitiin 100ul näyteputkeen välittömästi ennen injektointia.

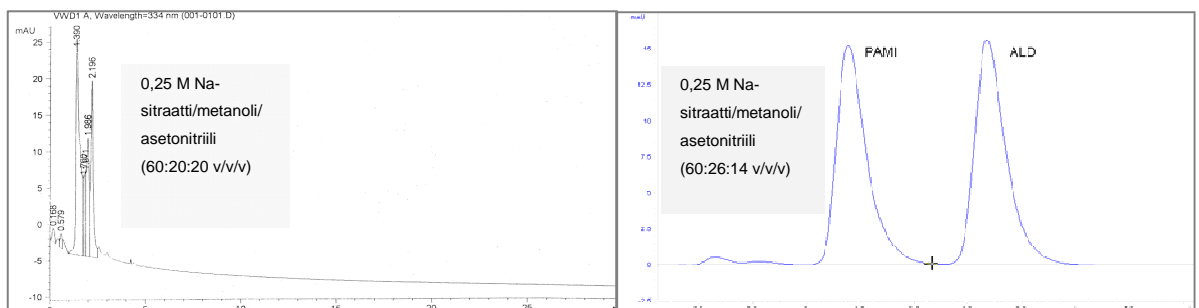
5.1.2 Menetelmäparametrit ja niiden muokkaaminen

Analyysiaallonpituus määritettiin alendronaattiderivaatan kokonaisspektrin (kuvio 7) perusteella kirjallisuutta mukaillen. Menetelmän detektioaallonpituudeksi valittiin 334nm.



KUVIO 7. Alendronaattiderivaatan kokonaisspektri aallonpituudella 250-400nm

Menetelmän lähtöparametrejä (taulukko 3) muokkaamalla pyrittiin löytämään sellaiset ajo-olosuhteet, joissa sekä erottuminen että resoluutio olisivat mahdollisimman hyvät. Eluentin koostumusta muokattiin orgaanisten komponenttien, metanolin ja asetonitriliin suhdetta muuttamalla. Lopulliseksi eluentin koostumukseksi valittiin: natriumsitraattipuskuri (pH=4,9) – metanoli – asetonitrili (60:26:14, v/v/v), jossa 0,05% trifluorietikkahappoa. Eluentin koostumuksen muutoksella saavutettiin pamidronaatin ja alendronaatin erottuminen toisistaan (kuvio 8). Muutoksen seurauksena eluentin poolisuus lisääntyi (taulukko 4) kasvattaen retentiota ja aiheuttaen retentioaikojen pidentymisen. Muutoksella voitiin vaikuttaa lisäksi piikkien häntimiseen ja resoluutioon.



KUVIO 8. Eluentin koostumuksen vaikutukset kromatogrammiin

TAULUKKO 4. Nestekromatografian eluenttien poolisuusindeksejä (mukailen Jaarinen & Niiranen 2005:162 Mirva Järvelä-Stölting 2011)

Eluentti	Poolisuusindeksi
heksaani	0,0
heptaani	0,0
dikloorimetaani	3,4
dikloorietaani	3,7
tetrahydrofuraani	4,2
trikloorimetaani	4,3
etyyliasetatti	4,3
isopropanoli	4,3
dioksaani	4,8
etanoli	5,2
asetoni	5,4
asetonitrilli	6,2
metanoli	6,6
vesi	9,0

Injektointimäärää pienentämällä saatiin piikkien kokoa ja pohjalukua vielä pienennettyä ja täten lähekkäin eluoituvien yhdisteiden, analyysin ja sisäisen standardin erottuvuus paremmaksi. Virtausnopeuden muutoksella voitiin vaikuttaa piikin pinta-alaan, korkeuteen ja leveyteen sekä terävyyteen ja retentioaikaan. (Barwick 1999) Menetelmän virtausnopeudeksi asetettiin 0,6ml/min ja injektioilavuudeksi 5ul.

Lämpötilan tiedettiin kirjallisuuden perusteella vaikuttavan merkittävästi yhdisteiden eluotumiseen ja sitä kautta niiden erottumiseen. Laitteistoon ei kuulunut lämpötilan vakioivaa kolonniuunia, joten lämpötilaa seurattiin määritysten aikana kolonnin ulkopuolelle asetetulla lämpömittarilla.

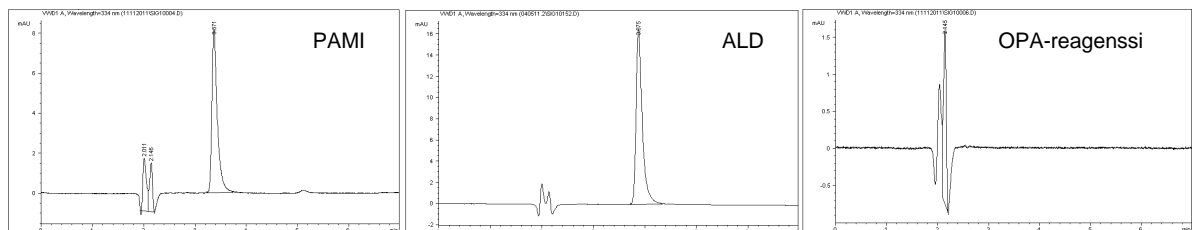
Taulukossa 5 on esitetty muokatut menetelmäparametrit, joita käytettiin menetelmän validointiin. Menetelmän ajoaikaa valitessa huomioitiin mahdollisten kolonnijäämien, kuten kompleksin hajoamistuotteiden eluotuminen. Näin ollen ajoajaksi määritettiin seitsemän minuuttia, jolloin mahdolliset jälkipiikit ehtivät eluotua ennen seuraavan näytteen injektointia, eivätkä näin ollen aiheuta virhettä seuraavan näytteen analysointiin.

TAULUKKO 5. Muokatut menetelmäparametrit

Laitteisto	HPLC (HP-1100)
Menetelmä	RPLC-ISTD
Kolonne	Hitachi LaChrom Ultra 4.6x100mm, 3µm
Ajoliuos	0,25 M Na-sitraatti-metanoli-asetonitrili (60:26:14 v/v/v)
Ajoaika	7 minuuttia
Virtausnopeus	0,6 ml/min
Injektioilavuus	5 ul
Aallonpituus	334nm
Retentioaika	3.2-3.4 min (PAMI); 3.8-4.0 min (ALD)
Detektori	UV-Vis

5.1.3 Näytteen komponenttien identifiointi

Näytteen komponentit identifioitiin määrittämällä näytteen jokainen komponentti erikseen (kuvio 9). Lisäksi analysoitiin sekä sisäisen standardin sisältävä nollanäyte että nollanäyte ilman sisäistä standardia. Eluentista peräisin olevien piikkien havaitsemiseksi myös eluentti määritettiin näytteenä. Kromatogrammin kahden piikin osoitettiin olevan peräisin OPA-reagenssista analysoimalla OPA-reagenssi (OPA+2ME) näytteenä. Näytematriisi yksinään ei aiheuttanut pohjaviivasta eroavia piikkejä.



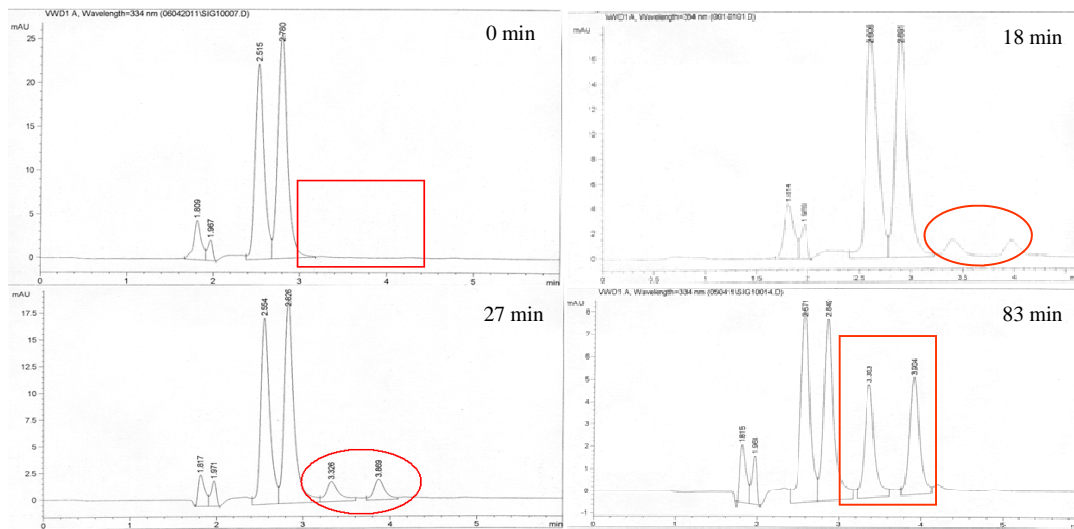
KUVIO 9. Näytteen komponenttien ajo erillään

Identifioinnin avulla voitiin määrittää lisäksi näytteen komponenttien retentioajat. Taulukon 5 mukaisilla ajo-olosuhteilla alendronaatin retentioajaksi saatiin 4.0 minuuttia ja pamidronaatin 3.4 minuuttia. OPA-reagenssista peräisin olevien piikkien retentioajat asettuivat välille 1.8-2.0 minuuttia. Muita signaaleja ei analyysiaallonpituudella havaittu.

5.1.4 Kompleksin säilyvyys

Alendronaattiderivaatan pysyvyyttä tutkittiin analysoimalla näyte eri ajan kohdissa derivatisoinnin jälkeen. Kompleksin säilyvyydellä on suuri merkitys automaattista näytteensyöttäjää käytettäessä etenkin pitkissä analyysiajoissa.

Näyte derivatisoitiin kohdassa 5.1.1. kuvatun mukaisesti, jonka jälkeen sama näyte analysoitiin yhdeksän minuutin välein. Injektointien välillä näyte säilytettiin huoneenlämmössä valolta suojattuna.



KUVIO 10. Kompleksin säilyvyys

Aikasarjan perusteella voitiin todeta kompleksin hajoamisen olevan merkittävää jo 18 minuutin jälkeen derivatisoinnista (kuvio 10). Kompleksin hajoaminen voitiin osoittaa kromatogrammista hajoamistuotteiden aiheuttamien signaalien perusteella. Aikasarjan perusteella havaittiin hajoamistuotteiden piikkien koon kasvavan samanaikaisesti kompleksin piikkien koon pienetessä. Tuloksen perusteella todettiin, että kompleksin hajoamisesta aiheutuvan virheen minimoimiseksi näyte tulee analysoida välittömästi derivatisoinnin jälkeen.

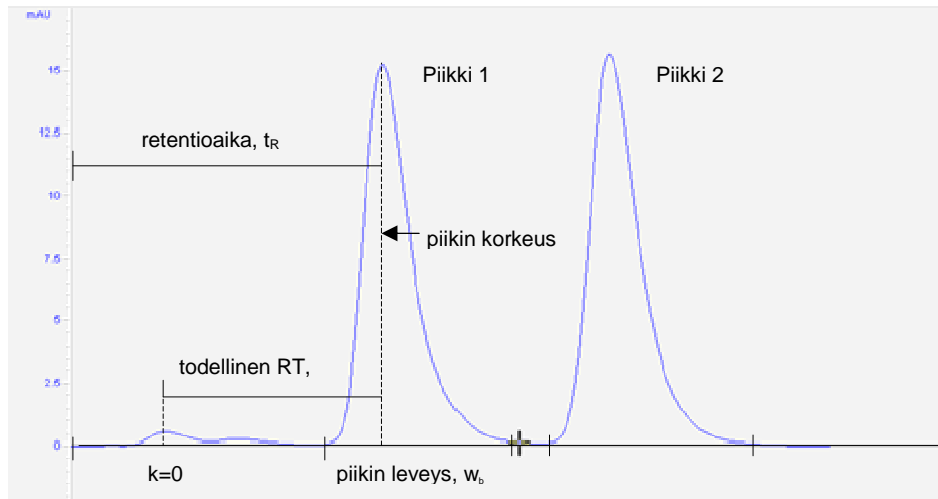
5.2 Validointitulokset

Menetelmä validoitiin määrittämällä validointiparametrejä, arvoja, joiden perusteella voitiin analysoida kehitetyn menetelmän validiutta. Validi menetelmä on toistettava, herkkä ja selektiivinen. Lisäksi sille on määritelty raja-arvot, joiden välillä menetelmä on lineaarinen ja sen tarkkuus on tietyllä luotettavuustasolla. Validointiin käytettiin taulukossa 5 esitettyjä ajo-olosuhteita.

Taulukossa 6 on koottuna työssä kehitetylle alendronaattiderivaatan määritysmenetelmälle laskettuja kromatografisia parametreja. Kolonnista osittain riippuvaisia parametreja ovat kokonaisretentiotilavuus ja -aika (V_R , t_R), viivetilavuus ja -aika (V_M , t_M), todellinen retentiotilavuus ja -aika (V'_R , t'_R) sekä erotustekijä (α) ja retentiotekijä (k). Kuviossa 11 on esitetty kromatogrammista määritettäviä parametreja.

TAULUKKO 6. Kromatografisia parametrejä työssä kehitetylle alendronaattiderivaatalle (kaavat Dong 2006 mukaan)

Validointitekijä	Symboli	Kaava	Laskettu arvo
Tilavuusvirtausnopeus	F_C	$A_C \epsilon U$	11,6ml/min
Kokonaisretentiotilavuus	V_R	$V_R = t_R F_C$	ALD=46,4ml PAMI=39,4ml
Kokonaisretentioaika	t_R	$t_R = \frac{V_R}{F_C}$	ALD=4,0min PAMI=3,4min
Viivetilavuus	V_M	$V_M = t_M F_C$	4,64ml
Viiveaika	t_M	$t_M = \frac{V_M}{F_C}$	0,4min
Todellinen retentiotilavuus	V'_R	$V'_R = V_R - V_M$	ALD=41,8ml PAMI=34,8ml
Todellinen retentioaika	t'_R	$t'_R = t_R - t_M$	ALD=3,6min PAMI=3,0min
Erotustekijä	α	$\alpha = \frac{V'_{R2}}{V'_{R1}} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$	1,2
Retentiotekijä	k	$k = \frac{V'_R}{V_M} = \frac{t'_R}{t_M}$	ALD=9,0 PAMI=7,5
Pohjaluku	N	$N = 16 \left(\frac{V'_R}{w_b} \right)^2 = 16 \left(\frac{t'_R}{w_b} \right)^2$	ALD=1600 PAMI=1156
Resoluutio	R_s	$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{1}{2} w_{b1} + w_{b2}}$	1,5



KUVIO 11. Eräitä kromatogrammista määritettäviä parametrejä

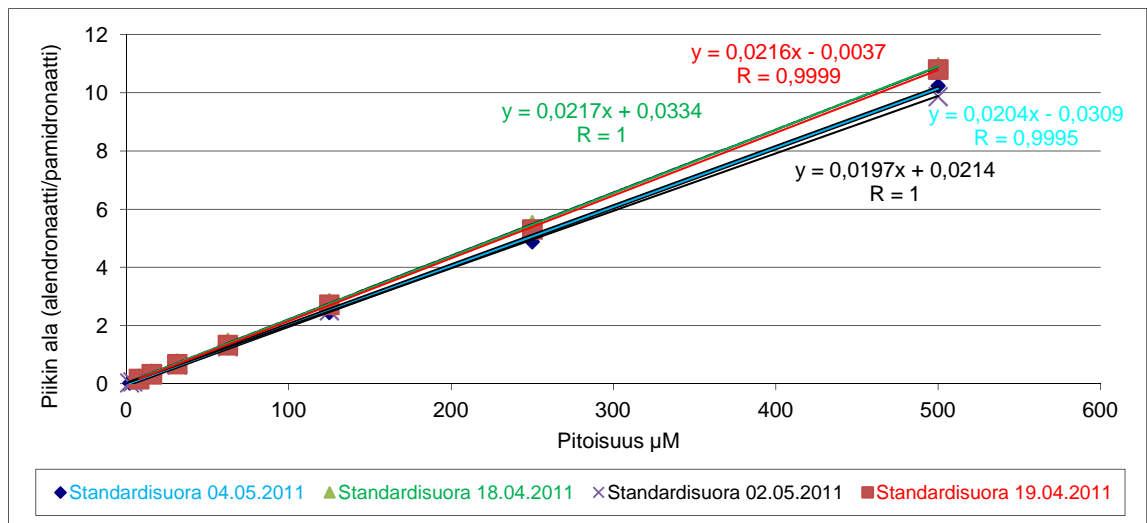
Näytteen komponenttien kromatografista erottumista kuvaavan erotustekijän (α) tulee olla vähintään 1, jotta erottuminen on mahdollista. Mitä suurempi erotustekijän arvo on, sitä paremmin signaalit eroavat toisistaan. Alendronaatin ja pamidronaatin erotustekijäksi saatiin taulukon 6 kaavan mukaisesti laskemalla 1,2.

Retentiotekijällä (k) kuvataan tutkittavan yhdisteen viipymistä stationäärifaasissa verrattuna sen pidättäytymiseen liikkuvassa faasissa. Mitä kauemmin yhdisteen eluoituminen kestää, sitä suuremmaksi retentiotekijä kasvaa. Retentiotekijän jäädessä liian pieneksi, erottumista ei tapahdu ja yhdiste eluoituu hyvin nopeasti. Taulukossa 6 esitetyn kaavan mukaisesti alendronaatin retentiotekijäksi saatiin 9,0 ja pamidronaatin retentiotekijäksi 7,5.

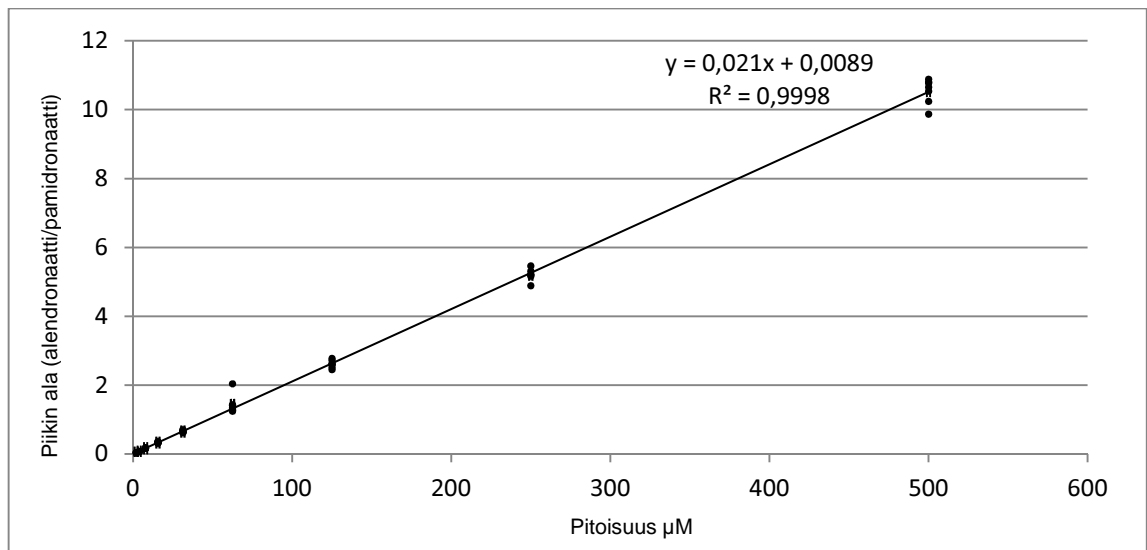
Erottumistehokkuutta ilmaisevat piikin resoluutio (R_s) ja kolonnin tehokkuutta kuvaava pohjaluku (N). Resoluutio eli piikkien erottuminen toisistaan on kromatografian perusvaatimus. Resoluutio määritetään jakamalla piikkien huippujen erotus piikkien pohjaviivasta mitatulla leveyksien keskiarvolla (taulukko 6). Arvon ollessa 1,5 tai suurempi piikit erottuvat toisistaan. Alendronaatin ja pamidronaatin resoluutioksi saatiin taulukon 6 mukaisella kaavalla 1,5. Pohjaluku kuvaa piikin leveyttä kertoen, kuinka monta kertaa yhdiste kiinnittyy ja irtoaa stationäärifaasista kolonnin matkalla. Mitä suurempi arvo on, sitä useammin prosessi (kiinnittyminen/irtoaminen) tapahtuu ja sitä kapeampia piikit ovat. Alendronaatin pohjaluvuksi määritettiin 1600 ja pamidronaatin 1156 (taulukko 6).

5.2.1 Lineaarisuus ja tarkkuus

Määrittäessä lineaarisuutta kymmenellä standardilla välillä 1,95-1000 μ M, osoitettiin menetelmän olevan lineaarinen 500 μ M pitoisuuteen saakka. Standardisuorien perusteella korrelaatiokerrointen (R) arvoiksi sekä vedestä että puskurista määritettynä saatiin aina vähintään 0,9995 (kuvio 12). Lineaarisuutta kuvaavien residuaaliarvojen perusteella voitiin vahvistaa menetelmän olevan lineaarinen välillä 1,95-500 μ M, millä alueella residuaaliarvot sijoittuivat tasaisesti standardisuoran molemmin puolin (kuvio 13).



KUVIO 12. Eri ajoissa määritettyjen standardisuorien kuvaajat yhtälöineen



KUVIO 13. Residuaalit standardisuoraan suhteutettuna

Menetelmän tarkkuutta tutkittiin lisäämällä standardisuoran näytteeseen tunnettu pitoisuus analysoitavaa näytettä. Tätä näytettä (taulukko 7: A ja A') laimennettiin 1:2 yhteensä viisi laimennosta (taulukko 7: B-F ja B'F').

TAULUKKO 7. Menetelmän tarkkuuden arviointia

Näyte	c (laskennall.)	c (määritetty)
A	290	309,4
B	145	150,8
C	72,5	74,0
D	36,3	35,8
E	18,1	16,8
F	9,1	7,9
A'	71,3	79,6
B'	35,6	41,4
C'	17,8	19,7
D'	8,9	9,7
E'	4,5	3,8
F'	2,2	1,2

Taulukon 7 tulosten perusteella voidaan havaita näytteen mitatun ja laskennallisen arvon olevan lähellä toisiaan, paitsi pienillä pitoisuuksilla.

5.2.2 Toteamis- ja määrittäysraja

Toteamis- ja määrittäysrajan laskemiseen voidaan hyödyntää määritetyn standardisuoran kulmakertoimen sekä y-akselin leikkauspisteen arvoja kuviossa 14 esitettyjen kaavojen mukaisesti.

$$\text{Toteamisraja} = \frac{3 \cdot \text{kulmakertoimen keskihajonta}}{\text{y-akselin leikkauspisteiden keskiarvo}} \quad \text{Kaava 1}$$

$$\text{Määrittäysraja} = \frac{10 \cdot \text{kulmakertoimen keskihajonta}}{\text{y-akselin leikkauspisteiden keskihajonta}} \quad \text{Kaava 2}$$

KUVIO 14. Yhtälöt toteamis- ja määrittäysrajan laskemiseksi (United States Food and Drug Administration 2005)

Laskemalla toteamisraja kuviossa 14 esitetyn kaavan 1 mukaisesti saatiin toteamisrajan arvoksi 0,57uM, joka on pienin menetelmällä todettava pitoisuus joka eroaa selvästi nolasta. Menetelmän määrittäysraja laskettiin kuviossa 14 esitetyn kaavan 2 mukaisesti, ja sen arvoksi saatiin 1,92uM. Määrittäysrajan arvo on menetelmän pienin pitoisuus, joka voidaan luotettavasti määrittää. Yleensä tulos, joka jää tämän arvon alapuolelle, merkitään 'Tulos alle määrittäysrajan', vaikka sen arvo olisikin mahdollista määrittää numeerisena.

5.2.3 Toistettavuus

Menetelmän toistettavuutta määritettiin analysoimalla tasokontrollinäytteitä jokaisen ajon alussa, keskellä ja lopussa. Lisäksi määritettiin yhden ajon toistettavuutta analysoimalla tasokontrollinäytettä peräkkäin 18 kertaa. Yhden ajon sisäistä ja eri ajojen väistä toistettavuutta arvioitiin määrittämällä intra- ja interCV%:t.

Yhden ajon sisäisen toistettavuuden tulokset on kirjattu taulukkoon 8. Näytteet määritettiin mahdollisimman samankaltaisesti saman tekijän toimesta. OPA-reagenssin lisäyksestä kulunut aika injektioon alkuun pyrittiin säilyttämään vakiona.

TAULUKKO 8. Yhden ajon sisäisen toistettavuuden arvoja (n=18)

Näyte	Piikin ala (ALD)	Piikin ala (PAMI)	Piikin ala (ALD/PAMI)	c (määritetty) pitoisuus / μM
1	141,20	63,58	2,22	103,00
2	130,65	60,06	2,18	100,88
3	147,14	65,71	2,24	103,83
4	142,38	67,27	2,12	98,16
5	147,90	68,03	2,17	100,82
6	152,68	69,41	2,20	102,02
7	148,80	68,67	2,17	100,49
8	147,34	68,44	2,15	99,84
9	147,03	68,01	2,16	100,25
10	147,74	66,55	2,22	102,96
11	157,45	71,03	2,22	102,79
12	140,99	67,73	2,08	96,55
13	152,03	70,72	2,15	99,69
14	147,09	67,76	2,17	100,67
15	146,63	68,41	2,14	99,40
16	149,01	68,13	2,19	101,44
17	135,67	63,30	2,14	99,39
18	145,35	67,55	2,15	99,79
KA	145,95	67,40	2,06	100,67
SD	6,16	3,16	0,04	1,83
CV%	4,22	4,68	1,92	1,82

Taulukossa 9 on esitetty eri ajojen välisiä tasokontrollipitoisuuksia ajon alussa, keskellä ja lopussa määritettynä. Oikeanpuoleisimmassa sarakkeessa on laskettu kaikkien tasokontrollinäytteiden keskiarvo, suhteellinen keskihajonta ja CV-prosentti. Kaikkien ajojen variaatiokertoimeksi saatiin 5,2%. Näytteiden derivatisointi on todennäköinen menetelmän toistettavuutta heikentävä tekijä.

TAULUKKO 9. Tasokontrollinäytteille määritetyt pitoisuudet, niiden keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet

Ajo	TK alussa (μM)	TK keskellä (μM)	TK lopussa (μM)	
1	80,950	81,836	75,425	
2	96,971	95,537	96,203	
3	96,349	95,402	94,417	
4	96,428	95,905	94,129	
5	89,474	95,018	93,515	
6	94,497	97,216	92,977	
7	92,806	92,103	91,670	
8	93,607	94,150	91,839	
9	92,281	92,766	90,857	
10	93,939	94,870	94,450	
11	97,132	97,049	96,686	
KA	93,13	93,80	92,02	92,98
SD	4,662	4,267	5,792	4,850
CV%	5,006	4,549	6,294	5,216

Tasokontrollinäytteitä määrittämällä voitiin osoittaa menetelmän toistettavuus sekä se, ettei jälkieluoitumista ole havaittavissa. Näytekomponenttien havaittiin eluoituvan määritetyssä ajoajassa.

5.2.4 Herkkyys ja selektiivisyys

Menetelmän herkkyys määritettiin standardisuorien kulmakertoimien, b avulla, sillä menetelmän todettiin olevan lineaarinen määrittämisalueella. Menetelmän herkkyudeksi saatiin määritettyjen standardisuorien kulmakertoimien keskiarvon perusteella $0,021\mu\text{M}$.

Analyysiaallonpituudella ei havaittu muita kuin analyytistä, sisäisestä standardista ja OPA-reagenssista aiheutuvia signaaleja, joten menetelmän selektiivisyyttä ei voida arvioida tämän perusteella.

5.3 Alendronaatin määrittäminen biologisista näytteistä

Menetelmävalidoinnin perusteella menetelmän todettiin soveltuvan näytteille, joiden matriisina on vesi. Validoidun menetelmän soveltuvuutta tutkittiin lisäksi puskuriin (Sörensen) laimennetuille näytteille. Määritysten perusteella voitiin osoittaa menetelmän soveltuvuus myös näytteille, joiden matriisina on puskuriliuos.

Työssä tarkasteltiin kahden eri kirjallisuudessa esitetyn esikäsitelymenetelmän soveltuvuutta medium- ja seerumipohjaisille näytteille (Al Deeb, Hamdan & Al Najjar 2004; Meng, Meng & Zheng 2010). Alustavien tulosten mukaan havaittiin Al Deeb ym. mukaisen esikäsitelysoveltuvan mediumpohjaisille näytteille ja Meng ym. mukaisen seerumipohjaisille näytteille. Esikäsitelysoveltuvan jälkeen näytteet analysoitiin validoituja määrittämisparametreja käyttäen. Kvantitatiivista analyysiä varten tulee määrittää standardisuorat matriisi ja esikäsitelysoveltuvien huomioiden.

6 TULOSTEN TARKASTELU JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Alendronaatin määrittämiseen vesipohjaisista näytteistä kehitettiin menetelmä korkean erotuskyvyn nestekromatografialla. Menetelmä validoitiin ja sen soveltuvuutta tutkittiin myös biologisille näytteille.

Menetelmää kehitettiin kirjallisuudesta valittuja parametrejä muokkaamalla työhön sopiviksi. Ensimmäisen ajon tuloksena kaikki piikit havaittiin alle viidessä minuutissa. Nopeasta eluotumisesta johtuen piikit eivät erottuneet toisistaan lainkaan. Erottumisen parantamiseksi eluentin koostumusta muutettiin poolisemmaksi, jotta analyytin ja sisäisen standardin piikit saatiin erottumaan toisistaan. Ajoliuoksen poolisuutta lisättiin orgaanisten komponenttien, metanolin ja asetonitriilin suhdetta muuttamalla. Poolisemmän metanolin määrää eluentissa lisättiin ja asetonitriilin määrää vähennettiin. Lopullisen eluentin koostumukseksi määritettiin 0,25M natriumsitraatti-metanoli-asetonitriili suhteessa 60:26:14 (v/v/v). Eluentin optimoinnilla saavutettiin parempi resoluutio ja samalla piikkien häntiminen väheni. Virtausnopeutta laskemalla ja injektointimäärää pienentämällä voitiin vaikuttaa hieman piikkien muotoon ja terävyyteen.

Näytteiden valmistamisesta aiheutuvien virhelähteiden minimoimiseksi valmistettiin 1mM alendronaattikantaliuosta, jota jaettiin eriin, pakastettiin ja josta edelleen laimennettiin analysoitavat näytteet. Pamidronaatista valmistettiin 1mM kantaliuos lisättäväksi vakiopitoisuutena näytteisiin sisäiseksi standardiksi. Sisäisen standardin tarkoituksena on vähentää näytteen pipetoinnista tai muusta näytteen käsittelystä aiheutuvaa virhettä.

Näytteen sekoittamisella OPA-reagenssin lisäyksen jälkeen havaittiin olevan vaikutusta kompleksin muodostumiseen. Sekoittaminen edistää osaltaan kompleksin muodostumista, mutta liian voimakkaalla sekoittamisella havaittiin olevan myös heikentävä vaikutus kompleksimuodostumiseen. Vaikutus voitiin havaita määrittämällä peräkkäin saman pitoisuuden sisältävää näytettä eri tavalla sekoitettuna. Sekoittamaton näyte ei tuottanut toistettavaa kromatogrammia, joten sekoittamisen todettiin olevan välttämätöntä OPA-

reagenssin lisäämisen jälkeen. Voimakkaan sekoituksen havaittiin alentavan merkittävästi samanpitoisen näytteen signaalivastetta. Kevyen sekoituksen sekä muutaman edestakaisen pipetoinnin yhdistelmän todettiin olevan paras tapa näytteen sekoittamiseksi OPA-lisäyksen jälkeen.

Laitteistoon ei kuulunut kolonniuunia, minkä vuoksi lämpötilaa tarkkailtiin ajojen aikana laitteiston läheisyydessä olevan lämpömittarin avulla. Lämpötilan on osoitettu vaikuttavan merkittävästi retentioon. Jo muutaman asteen lämpötilan nousu vaikuttaa selvästi retentioaikojen lyhentymiseen. (Barwick 1999) Työssä havaittiin lämpötilan vaikuttavan retentioaikoihin siten, että asteen muutos lämpömittarilla mitatussa lämpötilassa kolonnin ulkopuolella vastasi noin 0,4 minuuttia lyhyempää retentioaikaa. Vaikutuksen todettiin olevan sama sekä analyttiin että sisäiseen standardiin. Näytteiden pitoisuudet laskettiin sisäisen standardin menetelmällä, jolloin lämpötilan vaikutus voitiin minimoida.

Kirjallisuudessa on esitetty menetelmiä, joissa OPA-reagenssilla derivatisoituja näytteitä on inkuboitu tunti huoneenlämmössä valolta suojattuna ennen analysointia. Tässä työssä kompleksin havaittiin hajoavan merkittävästi tunnin inkuboinnin aikana. Kompleksin säilyvyyden tutkimiseksi määritettiin aikasarja, jossa samaa näytettä analysoitiin peräkkäin, jolloin peräkkäisten injektointien väliksi muodostui noin yhdeksän minuuttia. Kompleksin hajoamisen havaittiin olevan merkittävää jo noin 18 minuutin jälkeen OPA-reagenssin lisäyksestä (kuvio 10). Kun OPA-lisäys tehtiin välittömästi ennen injektointia ei kompleksin hajoamistuotteiden piikkejä havaittu. Tulosten perusteella työssä päädyttiin derivatisoimaan jokainen näyte välittömästi ennen analyysiä, jolloin inkubaatioaika OPA-reagenssin kanssa saatiin mahdollisimman hyvin vakioitua.

Menetelmän havaittiin olevan toistettava ja selektiivinen niin vesi- kuin puskurimatriisinäytteillekin. Määritettäessä alendronaattia medium- ja seeruminäytteistä voitiin todeta menetelmän soveltuvan myös biologisten näytteiden määrittämiseen. Biologisia näytteitä määritettäessä tulee näytteet esikäsitellä. Lisäksi näytteiden analysointia varten tulee määrittää kyseiseen matriisiin valmistetut standardisuorat.

Työn tuloksena validoitiin menetelmä alendronaatin määrittämiseen korkean erotuskyvyn nestekromatografialla. Validointiparametrien tulokset saavuttivat kirjallisuudessa annetut viitearvot, joten menetelmän todettiin olevan validi määritettyjen validointitulosten perusteella. Jatkossa menetelmää on mahdollista hyödyntää laajemmin lääkeaineanalysointiin mukaillemalla sitä analyysikohtaisesti.

7 LÄHTEET

Al Deeb, S., Hamdan, I. & Al Najjar, S. 2004. Spectroscopic and HPLC methods for the determination of alendronate in tablets and urine. *Talanta* 64, 695-702.

Bartolomeo, M. & Maisan, F. 2006. Validation of a Reversed-Phase HPLC Method for Quantitative Amino Acid Analysis. *Journal of Biomolecular Techniques* 17, 131-137.

Barwick, V. 1999. Sources of uncertainty in gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 849 (1999), 13-33.

Catteral, J. & Cawston, T. 2002. Drugs in development: bisphosphonates and metalloproteinase inhibitors. *Arthritis Research and Therapy* 5 (1).

Desai AM, Andrae M, Mullen DG, Holl MM & Baker JR Jr. 2011. Acetonitrile shortage: use of isopropanol as an alternative elution system for ultra/high performance liquid chromatography. *Analytical Methods* Jan 3 (1), 56-58.

Dong, M. 2006. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey.

Harris, D. 2007. *Quantitative chemical analysis*. 7. painos. USA: W.H. Freeman and Company.

Harvey, D. 1999. *Modern analytical chemistry*. New York: McGraw-Hill.

Hillilä, M. 2007. Osteoporoosin lääkehoito. Hormonit ja vitamiinit: Aineenvaihduntaan vaikuttavat lääkeaineet. Teoksessa *Farmakologia ja toksikologia*. Kuopio: Medicina Oy 48, 749-754.

Huupponen, R. 2003. Endokriiniseen järjestelmään vaikuttavat lääkeaineet. Teoksessa *Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 559-564.

Hämäläinen, H. & Kauppi, Markku. 2007. Osteoporoosin lääkehoito. *Duodecim*. Reuma.

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. *Laboratorion analyysitekniikka*. 5. Uudistettu painos. Helsinki: Edita Prima Oy.

Jones, B & Gilligan J. 1983. o-phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *Journal of Chromatography A* 266, 471-482.

Jones, B. 1986. Amino acid analysis by o-phthaldialdehyde precolumn derivatization and reverse-phase HPLC. *Methods of Protein Microcharacterization*. Springer, 121-151.

Karamustafa, F. & Celebi, N. 2006. Bisfosfonates and Alendronate. Scientific review. Gazi University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology. Ankara. FABAD Journal of Pharmaceutical Science 31, 31-42.

Katz, E. 1998. Handbook of HPLC [Elektroninen aineisto]. Chromatographic science series 78. New York: Dekker, M.

Lamprecht, G. 2009. In vitro determination of the release of alendronic acid from alendronate tablets of different brands during deglutition. Journal of Pharmaceutical Sciences 98, 3575-3581.

Meng, J., Meng, Q. & Zheng, L. 2010. A simple and rapid high-performance liquid chromatography method for determination of alendronate sodium in beagle dog plasma with application to preclinical pharmacokinetic study. Biomedical Chromatography 24, 169-173.

Neue, U. 2002. HPLC trouble shooting. Waters Corporation. Tulostettu 15.11.201. www.waters.com/webassets/cms/library/docs/wa20769.pdf

Nurminen, M-L. 2001 Lääkehoito. WSOYpro Oy. 415-419.

Palva, E. 2007. Lääkkeiden haittavaikutukset. Teoksessa Farmakologia ja toksikologia. Kuopio: Medicina Oy. 971-980.

Pelkonen, O. RH. 2003. Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Prutthiwanasan, B. & Suntornsuk, L. 2009. Rapid analysis of alkylphosphonate drugs by capillary zone electrophoresis using indirect ultraviolet detection. Journal of separation science. 33 (2010), 228-234.

Rang, H. & Dale, M. 2011. Rang and Dale's pharmacology. 7. ed. Edition. Edinburgh: Churchill Livingstone.

Rogers, M., Crockett, J., Coxon, F. & Mönkkönen, J. 2010. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. Bone 49 (2011), 34-41.

Russel, R., Watts, N., Ebetino, F. & Rogers, M. 2008. Mechanisms of action of bisfosfonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. Osteoporos Int (2008) 19, 733-759.

Samdancioglu, S., Calis, S., Kir, S. & Sumnu, M. 2003. The Determination of Alendronate Sodium in Microparticulate Systems by High Performance Liquid Chromatography. FABAD Journal of Pharmaceutical Science 28, 183-192.

Scheinin, M. 2007. Lääkeaineiden vaikutusmekanismit: reseptorit. Teoksessa Farmakologia ja toksikologia. Kuopio: Medicina Oy 2, 27-66.

Sirén, H., Perämäki, P. & Laiho, J. 2009. Esikäsittelyn käsikirja ohjeita vesi-, ympäristö- ja prosessitekniikan sekä lääketeollisuuden laboratorioille. Ylöjärvi: Kemia Kustannus Oy.

Sparidans, R. & den Hartigh, J. 1999. Chromatographic analysis of bisfosfonates. Netherlands. Pharmacy World & Science 1:1999.

Tuomisto, J. 2007. Johdanto farmakologiaan. Teoksessa Farmakologia ja toksikologia. Kuopio: Medicina Oy. 19-94.

Turhanen, P. & Vepsäläinen, J. 2008. Unexpected degradation of the bisphosphonate P-C-P -bridge under mild condition. Beilstein Journal of Organic Chemistry 4 (7).

United States Food and Drug Administration. 2005. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Q2(R1) Validation of Analytical Procedures:Text and Methodology. Tulostettu 8.5.2012. <http://private.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>

van Iterson, R. A Guide to Validation in HPLC. Drenthe College. Emmen Holland. Tulostettu 22.7.2011. www.standardbase.com

Väänänen K. 1996. Luun elämänkaari. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim 112 (22), 2087.

Yun, M. & Kwon, K. 2006. High-performance liquid chromatography method for determining alendronate sodium in human plasma by detecting fluorescence: Application to a pharmacokinetic study in humans. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 40, 168-172.

Zacharis, C. & Tzanavaras, P. 2008. Determination of bisphosphonate active pharmaceutical ingredients in pharmaceuticals and biological material: A review of analytical methods. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 48, 483-496.

LIITE 1: SANASTO

ALD	alendronaatti (alendronate)
BF	bisfosfonaatti (bisphosphonate)
CV%	keskihajonnan suhde keskiarvoon prosentteina (coefficient of variation)
IEC	ioninvaihtokromatografia (ion-exchange chromatography)
ISTD	sisäisen standardin menetelmä (internal standard method)
KA	keskiarvo
NPLC	normaalifaasinestekromatografia (normal phase liquid chromatography)
OPA	<i>orto</i> -ftaalialdehydi (<i>ortho</i> -phthaldialdehyde)
PAMI	pamidronaatti (pamidronate)
RPLC	käänteisfaasinestekromatografia (reversed phase liquid chromatography)
RT	retentioaika (retention time)
SD	keskihajonta (standard deviation)
TFA	trifluorietikkahappo (trifluoroacetic acid)
TK	tasokontrolli
UV-Vis	ultravioletti- ja näkyvä valo (ultraviolet and visible light)
2-ME	β -merkaptetaanoli