

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Laboratoriotekniikka

2014

Jenni Mäkinen

ANALYYSIMENETELMÄ DEPOT-VALMISTEEN LIUOTINJÄÄMIEN MÄÄRITTÄMISEKSI



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Laboratoriotekniikka

2014 | Sivumäärä 38

Ohjaajat:

Mika Jokinen, yliopettaja | Taina Hovinen, lehtori

Jenni Mäkinen

ANALYYSIMENETELMÄ DEPOT-VALMISTEEN LIUOTINJÄÄMIEN MÄÄRITTÄMISEKSI

Opinnäytetyössä tutkittiin lääkeannosteluun kehitettävää keraamista biomateriaalia, joka valmistetaan sooli-geelimenetelmällä. Tavoitteena oli kehittää analyysimenetelmä uuden lääkeannosteluvalmisteen liuotinjäämien määrittämiseksi kaasukromatografilla. Uuden menetelmän kehittäminen oli tarpeen, koska kyseisen näytetriisiin liuotinjäämiä ei ole analysoitu aiemmin. Kehitystyön suuntaviivana käytettiin sekä Euroopan että Yhdysvaltojen farmakopeoiden mukaisia lääkevalmisteiden liuotinjäämien määrittämiseen tarkoitettuja kaasukromatografisia perusmenetelmiä.

Työssä keskityttiin kromatografiseen menetelmäkehitykseen, joka sisälsi myös näytteenkäsittelyn. Kromatografisen menetelmäkehityksen tavoitteena oli saavuttaa käyttötarkoitukseen sopiva menetelmä, joka voidaan myöhemmin myös validoida. Menetelmäkehityksen aikana suoritetuilla testeillä pyrittiin todentamaan menetelmän soveltuvuus valmisteen liuotinjäämien määrittämiseen. Menetelmästä haluttiin analyysin suhteen kvantitatiivinen ja toistettava sekä mahdollisimman nopea.

Opinnäytetyöhön kuului lisäksi erilaisten valmistekoostumusten analysointia kehitetyllä menetelmällä. Tutkittavana oli kaksi erilaista valmistemuotoa: monoliitit ja mikropallot. Monoliitit on tarkoitettu implantoitaviksi annostelijoiksi ja mikropallot injektoitavaksi nestesuspensionä. Analysoitujen näytteiden liuotinjäämäpitoisuudet olivat välillä 2,2 – 8,3 m-%. Liuotinjäämäanalyysien tuloksia hyödynnetään tutkittavan materiaalin jatkokehityksessä.

ASIASANAT:

analyysimenetelmät, kaasukromatografia, keraamiset materiaalit

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Laboratory Technology

2014 | Total number of pages 38

Instructors:

Mika Jokinen, Principal Lecturer | Taina Hovinen, Senior Lecturer

Jenni Mäkinen

ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF RESIDUAL SOLVENT IN DEPOT MATERIAL

The objective of the thesis was to develop an analysis method for determination of residual solvent in a new biomaterial by gas chromatography. The biomaterial is a ceramic silica polymer that is prepared through a sol-gel process and developed to be a carrier for different types of therapeutics. The new method was necessary since the matrix had not been analysed before. The existing chromatographic methods of the European and US Pharmacopoeias were used as guidelines for the development.

The main focus was on the chromatographic method development, which included also sample preparation. The aim was to achieve a method that would be appropriate for its intended use and that could be validated later on. The pre-validation tests carried out during the method development sought to prove the aptitude of the method for determination of residual solvent in this biomaterial.

The study included also determinations of residual solvent by the developed method in different material compositions. Two material forms were studied: monoliths for implantation and microspheres for injection. The results indicate that the material has solvent content of 2.2 to 8.3 m-% depending on the composition. These results will be used in the future development of the biomaterial.

KEYWORDS:

analytical methods, gas chromatography, ceramic materials

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET (TAI SANASTO)	6
1 JOHDANTO	7
2 LÄÄKINNÄLLISET BIOMATERIAALIT	8
2.1 Säädellysti lääkeainetta vapauttavat valmisteet	8
2.2 Liuotinjäämät lääkevalmisteissa	10
3 SOOLI-GEELIMENETELMÄ	11
3.1 Mikropallot	12
3.2 Monoliitit	13
4 KROMATOGRAFIA	14
4.1 Kaasukromatografia	14
4.2 Injektointi hörytilasta	17
5 MENETELMÄKEHITYS	20
5.1 GC-menetelmä Etanoli5	20
5.2 GC-menetelmä 180512JM	21
5.3 GC-menetelmä 250512JM	22
5.4 Headspace-yksikön parametrit	23
5.5 Näytteenkäsittely	27
6 VALMISTEANALYYSIT	29
6.1 Näytteet	29
6.2 Tulosten käsittely	29
6.3 Analyysitulokset	30
7 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	35
7.1 Menetelmäkehitys	35
7.2 Valmisteanalyysit	36
LÄHTEET	37

LIITTEET

- Liite 1. Etanolijäämäanalyysi.
- Liite 2. Menetelmä 250512JM
- Liite 3. Esimerkit kromatogrammeista

KUVAT

Kuva 1. Tutkitut valmisteet: monoliitit (vas.) ja mikropallot (oik.).	13
Kuva 2. Difenyylidimetyylipolysiloksaanin molekyyli rakenne (Harris)	15
Kuva 3. Injektioportin toiminta a) jakoinjektiossa, b) jakamattomassa injektiossa ja c) suoraan kolonniin injektiossa. (Harris)	16
Kuva 4. Tasapainotila näytepullossa (Hinshaw)	18
Kuva 5. Esimerkki standardiliuoksen kromatogrammista (ajo 29.08.2012).	41
Kuva 6. Esimerkki näyteliuoksen kromatogrammista (ajo 29.08.2012).	41

KUVIOT

Kuvio 1. Tasapainotusajan optimointi (80 °C)	24
Kuvio 2. Tasapainotuslämpötilan optimointi (15 min)	25
Kuvio 3. Tasapainotusajan optimointi (90 °C)	26
Kuvio 4. Standardisuora ajosta 1.	32
Kuvio 5. Standardisuora ajosta 2.	33
Kuvio 6. Standardisuora ajosta 3.	34

TAULUKOT

Taulukko 1. Analyysitulokset.	31
Taulukko 2. Tulokset standardiliuoksille ajosta 1.	32
Taulukko 3. Tulokset standardiliuoksille ajosta 2.	33
Taulukko 4. Tulokset standardiliuoksille ajosta 3.	34
Taulukko 5. Analyysitulokset.	39
Taulukko 6. Menetelmän 250512JM parametrit	40
Taulukko 7. Headspace-yksikön parametrit	40

KÄYTETYT LYHENTEET (TAI SANASTO)

Lyhenne	Lyhenteen selitys
ESB	European Society of Biomaterials, Euroopan biomateriaaliliyhdistys
Eur.Ph.	European Pharmacopeia, Euroopan farmakopeia
FID	flame ionization detector, liekki-ionisaatiodektektori
GC	gas chromatograph(y), kaasukromatografi(a)
HS	headspace, kaasutila
ICH	The International Conference on Harmonisation, kansainvälinen harmonisointikonferenssi, jossa mukana Yhdysvallat, Eurooppa ja Japani
USP	United States Pharmacopeia, Yhdysvaltojen farmakopeia

1 JOHDANTO

Opinnäytetyössä tutkittiin lääkeannosteluun kehitettävää keraamista biomateriaalia, joka valmistetaan sooli-geelimenetelmällä. Tavoitteena oli kehittää analyysimenetelmä uuden lääkeannosteluvalmisteen liuotinjäämien määrittämiseksi kaasukromatografilla. Uuden menetelmän kehittäminen oli tarpeen, koska kyseistä näytematriisia ei ole analysoitu aiemmin. Kehitystyön suuntaviivana käytettiin sekä Euroopan että Yhdysvaltojen farmakopeoiden (Eur. Ph. / USP) mukaisia lääkevalmisteiden liuotinjäämien määrittämiseen tarkoitettuja kaasukromatografisia perusmenetelmiä.

Uuden valmistematriisin haasteena oli erityisesti analyysin saattaminen analysoitavaan muotoon. Analyyyti on pääosin suljettuna huokosrakenteessa valmisteen sisällä, joten se on tuotava esiin näytettä käsittelemällä. Valmistetta käsiteltiin uuttamalla ja liuottamalla erilaisin koostumuksin ja näitä menetelmiä vertailtiin keskenään. Näytteenkäsittelyn tavoitteina olivat toistettavuus sekä koko menetelmän kvantitatiivisuus. Näytteenkäsittelyn olisi tarkoitus olla sujuva ja mahdollisimman yksinkertainen eli mahdollisimman tehokas.

Kromatografisen menetelmäkehityksen tavoitteena oli saavuttaa käyttötarkoitukseen sopiva menetelmä käytössä olevalle laitteistolle. Menetelmäkehityksen aikana suoritetuilla testeillä pyrittiin todentamaan menetelmän soveltuvuus valmisteen liuotinjäämien määrittämiseen.

Opinnäytetyöhön kuului lisäksi erilaisten valmistekoostumusten analysointia kehitetyllä menetelmällä.

2 LÄÄKINNÄLLISET BIOMATERIAALIT

European Society for biomaterials (ESB) on määritellyt biomateriaalin olevan ”materiaali, joka on tarkoitettu käytettäväksi biologisen systeemin rajapinnassa arvioimaan, hoitamaan, lisäämään tai korvaamaan mitä tahansa kudosta, elintä tai toimintoa” (Williams 1999). Biomateriaalit voivat olla synteettisiä tai luontoperaisiksi ja esimerkiksi polymeerejä, metalleja, keraameja tai erilaisia komposiitteja. Lääkinnälliset biomateriaalit jaetaan pääosin kolmeen eri luokkaan: kudosten tukirakenteisiin, kirurgisiin sovellutuksiin sekä lääkeannostelumenetelmiin. Lisäksi ne jaetaan ominaisuuksiensa perusteella biotolerantteihin, bioinertteihin, biohajoaviin ja bioaktiivisiin materiaaleihin. (Korteso 2001)

Lääkeannosteluvalmisteita tarvitaan, sillä monia lääkkeitä ei voida annostella ruuansulatuskanavan kautta. Syynä ovat usein lääkkeen heikot fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, alkureitin metabolia tai mahalaukun hapan ympäristö. Lääkkeen ennenaikainen hajoaminen ja potilaskohtaiset erot vaikeuttavat oikean annoskoon määrittämistä, jolloin elimistön lääkeainepitoisuuteen saattaa aiheutua vaihteluita perinteisemmällä lääkemuodoilla. Lääkeannosteluvalmisteilla parannetaan hoitomyöntyvyyttä ja lääkityksen turvallisuutta. Näistä syistä annosteluun käytetään valmisteita, jotka vapauttavat lääkkeen säädellysti tietyllä aikavälillä. (Korteso 2001)

2.1 Säädellysti lääkeainetta vapauttavat valmisteet

Säädellysti lääkeainetta vapauttavat valmisteet (*controlled release formulations, drug delivery systems*) voidaan jakaa monilla tavoilla. Ensimmäinen jaottelu jakaa valmisteet kolmeen päätyyppiin lääkkeen vapautumisnopeuden perusteella:

- säädellyllä nopeudella lääkeainetta vapauttavat valmisteet (*depot, sustained release*)
- viivästetysti lääkeainetta vapauttavat valmisteet (*delayed release*)

- sykäyksittäin lääkeainetta vapauttavat valmisteet (*pulsed release*)

Toinen tapa on jaotella valmisteet niiden fysikaalisen rakenteen perusteella kahteen päätyyppiin:

- yksiosaiset (monoliittiset) valmisteet (*monolithic products*)
- moniosaiset valmisteet (*multiparticulate products*)

Kolmanneksi jaottelu voidaan tehdä lääkeaineen luovutusmekanismin perusteella, jolloin ryhmiä on neljä:

- kalvolla säädelty (*membrane controlled*)
- diffuusiolla säädelty (*diffusion controlled*)
- matriisiin biohajoaminen (*matrix biodegradation*)
- osmoottinen pumppu (*osmotic system*)

Kaikki mainitut päätyypit voidaan jakaa vielä useisiin alatyyppeihin ja valmiste voi esimerkiksi luovuttaa lääkeainetta monen mekanismin yhdistelmällä. Tästä huomataan, ettei valmisteiden nimeäminen ole vielä yksiselitteistä. (Viitala 2005; Marvola *et al.* 2007)

Lääkeaine voidaan sulkea valmisteen sisälle, jolloin luovutus tapahtuu hallitusti kalvon läpi tai sitten lääkeaine on homogeenisena dispersiona tai liuksena kantajamateriaalissa, josta se diffundoituu kohdekudokseen. Tällöin varsinainen valmistematriisi ei hajoa vaan se joudutaan myöhemmin poistamaan. Diffuusion lisäksi lääkeaine voi siirtyä matriisista kudokseen osmoottisesti tai ”turpovasta systeemistä”. Osmoottisesti lääkeainetta luovuttavassa systeemissä vettä siirtyy valmistematriisiin sisään puoliläpäisevän kalvon läpi aiheuttaen kalvon sisälle korkeamman paineen ja pieniä halkeamia kalvoon, jolloin lääkeaine pääsee vapautumaan halkeamien kautta. ”Turpoavan systeemin” tapauksessa lääkeaine on esimerkiksi loukussa materiaalin huokosrakenteessa ja valmisteen sisään siirtyvä vesi turvottaa materiaalia ja sen huokosia, jolloin lääkeaine pääsee vapautumaan. (Viitala 2005)

Lääkeaine voidaan myös kapseloida biohajoavaan matriisiin, jolloin luovutus elimistöön tapahtuu matriisin hajotessa tai hajoamisen ja diffuusion yhdistelmä-

nä. Näitä biohajoavia valmisteita kutsutaan myös kemiallisesti säädeltäviksi kantajiksi. (Viitala 2005)

Opinnäytetyössä tutkitut sooli-geelimenetelmällä valmistetut monoliitit ja mikropallot ovat biohajoavia materiaaleja, jotka voidaan tarvittaessa päällystää kalvolla, joka parantaa lääkeaineen luovuttamisen säätelyä (Viitala 2005). Lääkeaineen luovutusmekanismina toimii matriisin biohajoamisen ja diffuusion yhdistelmä. Matriisin hajoamisnopeutta sekä sitä kautta lääkeaineen vapautumisnopeutta voidaan säädellä valmistusprosessin variaatioilla. (Jokinen et al. 2008)

2.2 Liuotinjäämät lääkevalmisteissa

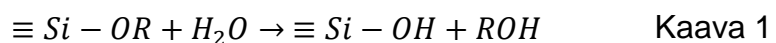
Lääkevalmisteiden liuotinjäämät tulee arvioida ja tarvittaessa kvantitatiivisesti määrittää turvallisuus- ja laatuvaatimusten täyttämiseksi. Liuotinjäämiksi kutsutaan lääkkeiden ja lääkevalmisteiden valmistuksessa käytettäviä tai siinä syntyviä orgaanisia, helposti haihtuvia kemikaaleja, joita ei voida täysin poistaa valmistuksen aikana.

ICH ja farmakopeat jakavat liuotinjäämät kolmeen luokkaan niiden tunnetun toksisuuden mukaan. Luokkaan 1 kuuluvien liuottimien (kuten bentseeni ja dikloorietaani) tiedetään aiheuttavan pysyviä terveyshaittoja ihmiselle tai huomattavia ympäristöhaittoja jo hyvin pieninä pitoisuuksina. Luokan 1 liuottimia ei pidä käyttää lääkkeiden tai lääkevalmisteiden valmistukseen. Luokkaan 2 kuuluvat liuottimet (kuten asetonitrili ja dikloorimetaani) voivat aiheuttaa esimerkiksi siivöaurioita tai ne ovat hermostolle myrkyllisiä, josta syystä niiden käyttöä tulee rajoittaa ja niille on olemassa päivittäisen annostuksen raja-arvot, joita tulee noudattaa. Luokan 3 liuottimien (kuten etanoli ja asetoni) ei tiedetä olevan ihmiselle haitallisia lääkeaineissa tai -valmisteissa normaalisti käytetyissä pitoisuuksissa. (ICH 2011)

3 SOOLI-GEELIMENETELMÄ

Opinnäytetyössä tutkittiin sooli-geelimenetelmällä tehtyjä lääkeannosteluvalmisteita. Sooli-geelimenetelmä on yksi eniten tutkituista tavoista valmistaa amorffisia, epäorgaanisia keraameja kuten alumiini- ja titaanioksideja sekä piioksidia (silika, SiO₂). Alhainen prosessointilämpötila perinteisiin keraamien valmistusmenetelmiin verrattuna sekä valmiin materiaalin homogeenisyys ja puhtaus ovat menetelmän suurimpia etuja. (Kortesuo 2001) Silikamateriaali on myös täysin myrkytön, bioyhteensopiva sekä biohajoava, joten se on hyvin käyttökelpoinen monissa kudosteknologian sovelluksissa, esimerkiksi erilaisten vaikuttavien aineiden kapseloinnissa (Jokinen *et al.* 2008).

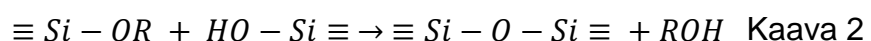
Silikageelin valmistus sooli-geelimenetelmällä muistuttaa luonnossa tapahtuvaa silikan muodostumista. Sooli-geelimenetelmässä lähtöaineena toimivat usein vesi ja alkoksisilaanit, kuten tetrametyyliortosilikaatti (TMOS) tai tetraetyyliortosilikaatti (TEOS). Alkoksidit reagoivat veden kanssa hydrolyysissä (kaava 1) ja kondensoituvat (kaavat 2 ja 3), jolloin muodostuu kolloidaalinen silikasuspensio eli sooli. (Ahola 2001)

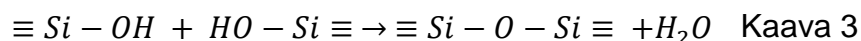


Hydrolyysi voi tapahtua joko hapon tai emäksen katalysoimana.

Soolivaiheessa syntyy pieniä, kolloidaalisia silikapartikkeleita, jotka ovat kooltaan 1-1000 nm ja aggregoituvat muodostaen ketjuja ja renkaita sekä lopulta geelirakenteen. (Ahola *et al.* 2003; Jokinen *et al.* 2008) Geeli on kiinteä emulsio eli kiinteän ja nesteen välinen dispersio, jossa kiinteä aine toimii dispersioväliaineena muodostaen verkkomaisen jatkuvan faasin ja neste on tasaisesti jakaantuneena eli dispergoituna faasina läpi rakenteen.

Tyypillisesti sooli hydrolysoituu vain osittain. Tällöin reaktio jatkuu alkoholin ja veden kondensaatiolla. (Ahola 2001)





Kondensaation jatkuessa geelin rakenne tiivistyy, kun hydroksyyli-ryhmät vähenevät korvautuen Si-O-Si-sidoksin. Lopullisessa rakenteessa hydroksyyli-ryhmiä on enää materiaalin pinoilla. (Viitala 2005)

Työn materiaalien valmistuksessa käytettiin kaksivaiheista sooli-geelisynteesiä. Ensimmäisessä vaiheessa alkoksidi hydrolysoidaan vedellä hapon katalysoimana pH:n ollessa noin 2. Tällöin hydrolyysi on nopeaa ja kondensaatio hidasta. Kun tuloksena on kirkas sooli, pH säädetään noin 7:ään käyttäen emästä tai puskuria, jolloin kondensaatio nopeutuu. Kondensaation vaikutuksesta soolin viskositeetti kasvaa ja lopulta muodostuu geeli. Kaksivaiheinen synteesi mahdollistaa valmiin geelin muuntelun soolivaiheessa, tässä tapauksessa lääkeaineen lisäys tehdään soolivaiheessa. (Viitala 2005)

Materiaaleja tutkitaan ja käytetään monissa muodoissa esimerkiksi monoliitteina, päällysteinä tai kalvoina, kuituina sekä erikokoisina partikkeleina. Materiaalia voidaan käyttää monien muiden toiminnallisten aineiden kapselointiin lääkeaineiden lisäksi. Opinnäytetyössä tutkittiin kahta erilaista valmistemuotoa. (Jokinen *et al.* 2008)

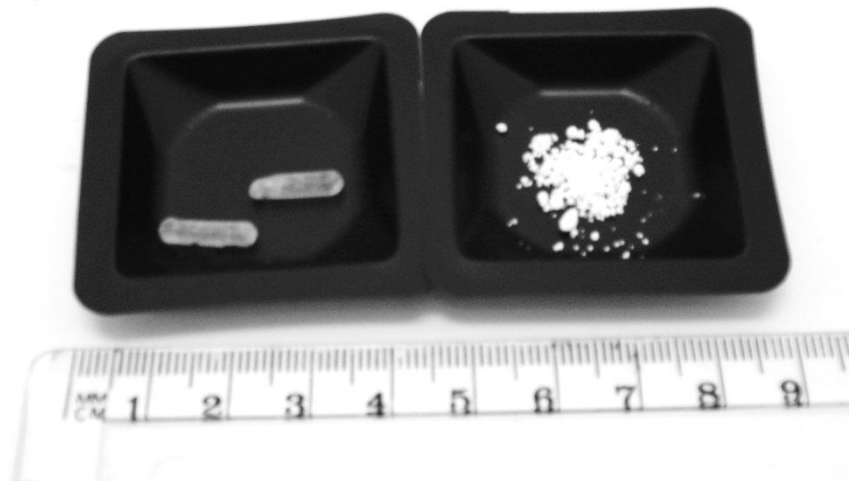
3.1 Mikropallot

Mikropallot ovat pyöreitä silikapartikkeleita, joiden halkaisija vaihtelee 100 nm:n ja 100 µm:n välillä. Mikropallot valmistetaan soolista sumukuivaamalla. Sumukuivauksessa nestemäinen sooli ruiskutetaan suuttimesta pieninä pisaroina kuumaan kuivausmediumiin, kuten ilmaan. Sumukuivauksessa soolissa olevat liuottimet haihtuvat nopeasti ja tuote kuivuu. Lopullinen tuote on vaalea jauhe, jossa on nähtävissä erikokoisia mikropalloagregaatteja. Mikropallojen koko riippuu pääosin sumukuivauksen parametreista, kuten soolin viskositeetistä, ruiskutusnopeudesta ja kuivausmediumin lämpötilasta. (Jokinen *et al.* 2008)

Mikropalloja voidaan käsitellä myös erilaisilla pesumenetelmillä, kuten asetonipesulla, jolla pyritään poistamaan vettä ja alkoholia materiaalin huokosrakenteesta. (Jokinen *et al.* 2008)

3.2 Monoliitit

Monoliitit valmistetaan valamalla nestemäistä soolia muotteihin, jossa sooli muuttuu geeliksi ja sen annetaan kuivua. Geeliä voidaan myös lämpökäsitellä kuivumisen tehostamiseksi, mutta lämpökäsittely saattaa aiheuttaa muutoksia kapseloitujen vaikuttavien aineiden rakenteeseen. Kuivauksen aikana geeli kivistuu ja kondensaatioreaktiot jatkuvat. (Jokinen *et al.* 2008)



Kuva 1. Tutkitut valmisteet: monoliitit (vas.) ja mikropallot (oik.).

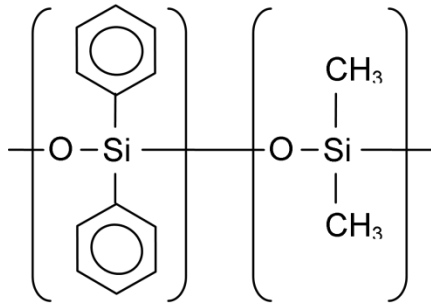
4 KROMATOGRAFIA

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) määrittelee kromatografian olevan fysikaalinen erotusmenetelmä, jossa erotettavat komponentit jakautuvat kahden faasin välille. Näistä faaseista toinen pysyy paikallaan (stationäärifaasi) ja toinen liikkuu määrättyyn suuntaan (liikkuva faasi). (IUPAC 1993)

4.1 Kaasukromatografia

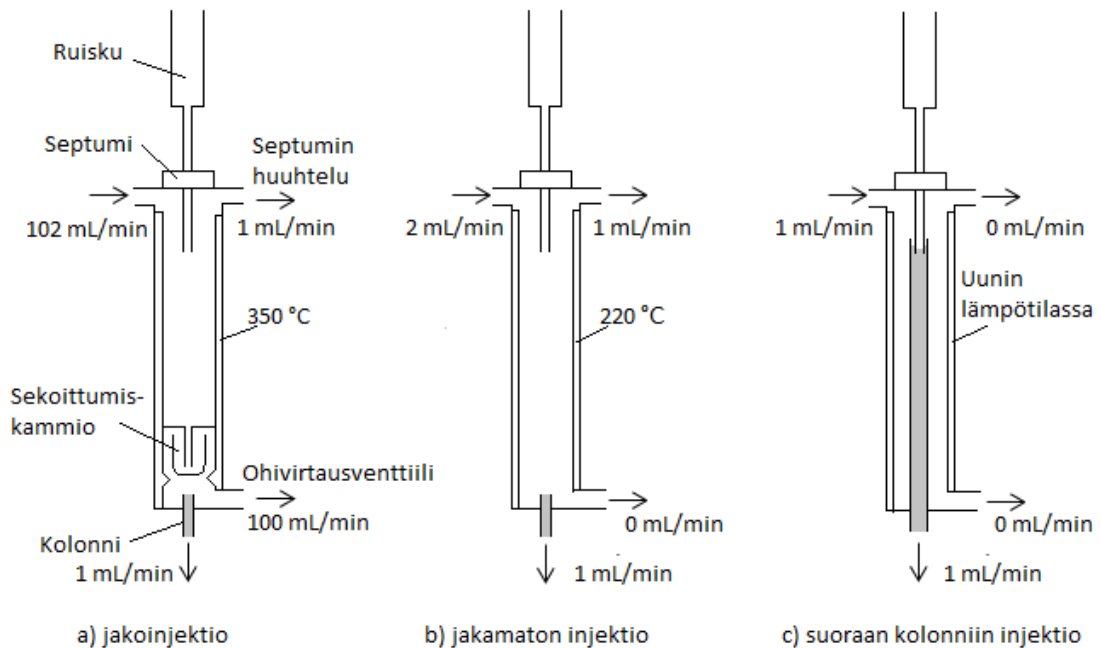
Kaasukromatografiassa liikkuvana faasina toimii inertti kantajakaasu, joka on tyypillisesti typpeä, heliumia tai vetyä. Kantajakaasu kuljettaa kaasuuntuneen näytteen kolonniin, jossa kromatografinen erotus tapahtuu. Kolonni on joko pakattu tai kapillaarikolonni, riippuen käyttökohteesta. Nykyisin käytetään pääosin ohuita kapillaarikolonneja.

Kapillaarikolonni on valmistettu silikasta, joka on ulkopinnaltaan pinnoitettu polyimidillä (Agilent Technologies, Inc. 2007). Silikaa käytetään, koska se on inertti ja sillä on korkeampi vetolujuus, joustavuus ja lämpötilakestävyys kuin aiemmin käytetyillä metallikapillaareilla. Stationäärifaasina toimii polymeroitu neste, joka on kiinnitetty silikakapillaarin sisäpinnan silanoliryhmiin (Si-OH) kemiallisesti. (Braithwaite & Smith 1996) Yleisimmin käytettyjä stationäärifaaseja ovat dimeetylipolysiloksaanit, jotka ovat käytössä vakaimpia, lujimpia sekä monipuolisimpia (Agilent Technologies, Inc. 2007). Dimeetylipolysiloksaaniin voidaan lisätä erilaisia substituutteja, kuten fenyyliiryhmiä, joilla muunnellaan faasin polaarisuusominaisuuksia. Stationäärifaasin sisältämien substituuttien määrä ilmoitetaan prosentteina. Opinnäytetyössä käytettiin kolonnia HP-5, jonka stationäärifaasina on 5 % difenyylidimeetylipolysiloksaani. (Kuva 2.) (Harris 2007)



Kuva 2. Difenyylidimetyylipolysiloksaanin molekyyli rakenne (Harris 2007)

Näyte voidaan syöttää kaasukromatografiin joko manuaalisesti tai automaattisesti. Yleensä näyte injektoidaan kaasukromatografiin nesteenä, joka höyrystyy laitteen injektioportissa ja sekoittuu kantajakaasuun. Injektioportin rakenne ja toimintatapa valitaan näytteen perusteella. Rutiinimenetelmä on jakoinjektio (*split injection*), jossa vain osa näytteestä siirtyy kolonnierotukseen ja suurin osa poistuu ohivirtausventtiilin kautta. Mikäli näytteen komponentit ovat hyvin pieniä jäämiä, voidaan käyttää jakamatonta injektiota (*splitless injection*), jossa noin 80 % näytteestä päätyy kolonniin. Näytteille, joiden komponenteilla on taipumus hajota kiehumispisteensä yläpuolella, käytetään suoraan kolonniin injektiota (*on-column injection*). Injektioportin toimintaa ja rakennetta eri syöttötekniikoissa on kuvattu kuvassa 3.



Kuva 3. Injektioportin toiminta a) jakoinjektiossa, b) jakamattomassa injektiossa ja c) suoraan kolonniin injektiossa. (Harris 2007)

Kolonnissa erottuneet komponentit havaitaan detektorilla. Kaasukromatografiassa voidaan käyttää useita erityyppisiä detektoreita ja kuten näytteesyöttötapa, detektori valitaan näytteen sisältämien yhdisteiden mukaan. Yleisimmin käytetty detektori on liekki-ionisaatiodetektori (FID, *flame ionization detector*), joka on hyvin herkkä hiiltä sisältäville yhdisteille. (Harris 2007) Liekki-ionisaatiodetektori ei anna signaalia esimerkiksi vedestä tai kantajakaasusta, joten sen aikaansaama pohjaviiva on tasainen ja lisäksi detektorin lineaarinen alue on laaja. (Braithwaite & Smith 1996)

Kun kolonnista eluotuvat komponentit saapuvat detektorille, ne sekoittuvat vetykaasuun ja seos palaa ilman kanssa liekkisuuttimessa. Liekki ionisoi komponentit ja muodostuvat kationit (CHO^+) ohjautuvat kerääjäelektrodille, joka toimii katodina. (Braithwaite & Smith 1996) Orgaaniset hajoamistuotteet aiheuttavat siten muutoksen sähkövirran ja muutos mitataan elektrometrillä ampeereina. Muutokset piirtyvät kromatogrammin piikeiksi. Taustavirran eli kantajakaasun ja vedyn aiheuttaman sähkövirran suuruus on tavallisesti $10^{-14} - 10^{-13}$

ampeeria ja tästä syystä mitattavat signaalit ilmoitetaan pikoampeereina (10^{-12} A = 1 pA). (Riekkola & Hyötyläinen 2000)

4.2 Injektointi höyrytilasta

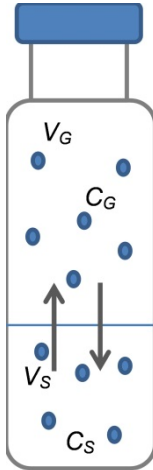
Tässä opinnäytetyössä kehitettiin menetelmä, jossa injektointi tehdään höyrytilasta eli headspace-tekniikalla. Tällöin näyte suljetaan tiiviisti näytepulloon, jossa näyte jakaantuu neste- ja kaasufaasiin termodynaamisesti säädelyissä olosuhteissa. Suurin ero höyrytilainjektiossa verrattuna perinteiseen injektioon on se, että vain haihtuvat komponentit päätyvät GC-erotukseen. (Hinshaw 2011) Höyrytilainjektio soveltuu varsinkin helposti haihtuvien näytteiden analysointiin. Tämä injektointitapa estää myös näytematriisissa olevien ei-toivottujen komponenttien pääsyn kolonniin ja suojaa näin kolonnia esimerkiksi matalan tai korkean pH:n aiheuttamilta vaurioilta. (Agilent Technologies, Inc. 2007)

Höyrytilainjektoinnin onnistumiseksi kahden faasin välille on saavutettava kemiallinen tasapaino suljetussa systeemissä (näytepullossa). Kuva 3 esittää tasapainotilaa näytepullossa. Kuvassa symboli C_S on analyytin konsentraatio nestefaasissa, C_G on analyytin konsentraatio höyrytilassa, V_S on nestefaasin tilavuus ja V_G on höyrytilan tilavuus. (Ettre & Kolb 1997)

Kahden faasin suhteellista tilavuutta kuvataan faasisuhteena β , joka on määritelty kaavan 4 mukaan.

$$\beta = V_G/V_S$$

Kaava 4



Kuva 4. Tasapainotila näytepullossa (Hinshaw 2011)

Analyytin jakaantuminen kaasu- ja nestefaasien välille riippuu analyytin jakaantumiskertoimesta. Jakaantumiskerroin ilmaisee analyytin konsentraatiosuhteen kahden toisiinsa sekoittumattoman faasin välillä ja se on riippuvainen sekä analyytin liukoisuudesta nestefaasiin, että vallitsevasta lämpötilasta. Jakaantumiskerroin K on määritelty kaavan 5 mukaan. (Ettre & Kolb 1997)

$$K = C_S / C_G \quad \text{Kaava 5}$$

Jakaantumiskerroin pienenee, kun lämpötilaa nostetaan ja analyytin konsentraatio höyrytilassa lisääntyy sekä kasvaa, kun analyytin liukoisuus nestefaasiin paranee. Mitä korkeampi analyytin jakaantumiskertoimen arvo on, sitä vaikeampaa on saada analyytti siirtymään höyrytilaan. (Agilent Technologies, Inc. 2000)

Faasisuhteen ja jakaantumiskertoimen välinen suhde voidaan kirjoittaa kaavan 6 mukaisesti. Tällöin voidaan todeta, että höyrytilan analyyttikonsentraatio on suhteessa näytteen alkuperäiseen analyyttikonsentraatioon ja höyrytilasta injektioimalla saatu analyysituloks voidaan palauttaa vastaamaan alkuperäistä näytettä. Kaavassa symboli C_o kuvaa alkuperäistä analyyttikonsentraatiota. (Hinshaw 2011)

$$C_o = C_G(K + \beta) \quad \text{Kaava 6}$$

Höyrytilainjektointia käytettäessä näyte voi olla myös kiinteä, sillä injektointi tehdään pullossa olevasta höyrytilasta. Kiinteiden näytteiden kohdalla on kuitenkin varmistuttava siitä, että analyytti pääsee vapautumaan kiinteästä matriisista.

5 MENETELMÄKEHITYS

Laitteistona opinnäytetyössä käytettiin kaasukromatografia HP 6890 ja headspace-yksikköä HP 7694. Laitteistoon asennettiin kolonni HP-5 (30 m*0,32 mm*0,25 µm, 19091J-413, Crawford Scientific/Agilent). Kantajakasuna käytettiin tyypeä, jonka lineaarinen virtausnopeus oli 16 cm/s.

5.1 GC-menetelmä Etanoli5

Työ aloitettiin aiemmin Turun AMK:n tutkimusprojektissa käytetyn Etanoli5-menetelmän (Villa 2012; Chai *et al.* 2009) testauksella. Testauksella haluttiin selvittää menetelmän määritysalue ja mahdollisuudet sen jatkokehitykselle.

Injektointi tehtiin kaasutilasta ja näytemäärä oli 50 µL. GC-uunin lämpötila oli 30 °C. Headspace-yksikön tasapainotuslämpötilana oli 105 °C ja -aika oli 3 min. Headspace-yksikön muut parametrit olivat seuraavat: HS-pullon paineistusaika 0,2 min, injektointiaika 1 min, näytesilmukan lämpötila 120 °C, täyttöaika 0,2 min ja tasapainotusaika 0,05 min sekä siirtolinjan lämpötila 140 °C. Injektioportin lämpötila oli 145 °C ja jakosuhte 100:1. Detektorina oli liekki-ionisaatiodetektor (FID) lämpötilassa 245 °C. Detektorin liekille syötettiin vetyä 40 mL/min ja ilmaa 450 mL/min.

Menetelmän testiajoksi luotiin sekvenssi, jossa oli 0,1 V-% etanolia sisältäviä sekä tyhjiä näytepulloja vuorotellen. Ajolla haluttiin selvittää etanolin retentoituminen, piikin muoto ja koko sekä siirtykö tyhjään ajoon jäämiä edeltävästä ajosta (*carryover*). Etanolin retentioaika oli 3,30 min ja piikit olivat muodoltaan teräviä. Pinta-alojen keskiarvo oli 55,77 pA*s suhteellisen keskihajonnan ollessa 3,6 %. Tyhjiä injektioita kromatogrammeissa havaittiin jäämiä, joiden retentioaika oli sama kuin etanolilla. Jäämät olivat pinta-alaltaan < 3 pA*s ja korkeudeltaan < 2 pA.

Testiajon perusteella muutettiin injektioportin jakosuhteeksi 50:1 ja uusittiin testiajo. Pinta-alojen keskiarvoksi tuli 102,29 pA*s suhteellisen keskihajonnan ollessa 2,8 %. Tyhjiissä injektioissa jäämät olivat kooltaan noin 4 pA*s. Jäämien poistamiseksi headspace-yksiköllä suoritettiin valmistajan ohjeen (Agilent Technologies, Inc. 2000) mukainen höyrypuhdistus. Puhdistuksen jälkeen injektioportin jakosuhteeksi muutettiin 20:1 ja uusittiin testiajo. Pinta-alojen keskiarvo oli 250,65 pA*s ja suhteellinen keskihajonta 6,4 %. Jäämien koko tyhjiissä injektioissa oli noin 7 pA*s.

5.2 GC-menetelmä 180512JM

Luotiin uusi GC-menetelmä, jolla haluttiin ensisijaisesti parantaa toistettavuutta. Menetelmän pohjana käytettiin farmakopean mukaista perusmenetelmää liuotinjäämien määrittämiseksi (USP 2004). Päätettiin testata menetelmää näytemäärällä 0,2 g, sekä yleisillä etanolille sopivilla laiteparametreilla. Näytemäärän suurentaminen vaati myös headspace-yksikön lämpötilaolosuhteiden muuttamista. Headspace-uunin tasapainotuslämpötilana oli 70 °C 15 min ajan. Headspace-yksikön muut parametrit olivat seuraavat: HS-pullon paineistusaika 0,5 min, injektointiaika 1,5 min, näytesilmukan lämpötila 85 °C, täyttöaika 0,1 min ja tasapainotusaika 0,05 min sekä siirtolinjan lämpötila 85 °C. GC:n injektioportin lämpötila oli 140 °C ja jakosuhtena oli 50:1. GC-uunin lämpötilaksi asetettiin 40 °C. Detektorina oli liekki-ionisaatiodetektor (FID) lämpötilassa 250 °C.

Menetelmää testattiin samanlaisella sekvenssillä kuin Etanolil5:tä. Testiliuoksena käytettiin 0,1 m-% etanoliliuosta, jota punnittiin 0,2 g näytepulloihin. Etanolin retentioaika oli 3,33 min ja piikit olivat muodoltaan teräviä, mutta lievää häntimistä (*tailing*) oli nähtävissä. Pinta-alojen keskiarvo oli 207,16 pA*s suhteellisen keskihajonnan ollessa 1,0 %. Tyhjien injektoiden kromatogrammeissa havaittiin lievää pohjaviivakohinaa. Menetelmä on selvästi toistettavampi kuin aluksi testattu Etanolil5.

Testausta jatkettiin tutkimalla menetelmän lineaarisuutta sekä toistettavuutta pienemmillä pitoisuuksilla. Valmistettiin standardiliuokset välille 0,001 - 0,05 *m* - %. Rakennettiin sekvenssi, jossa aluksi oli systeemitesti 0,01 *m* - % liuoksesta, kaksi tyhjää näytepulloa sekä standardiliuokset. Etanolin retentioaika oli 3,33 min ja piikit olivat muodoltaan teräviä, häntimistä ei enää havaittavissa. Systeemitestin pinta-alojen keskiarvo oli 21,70 pA*s suhteellisen keskihajonnan ollessa 1,2 %. Standardipisteiden välille piirretyn lineaarisen regression korrelaatiokertoimen neliö (R^2) oli 0,9999. Tyhjien injektoiden kromatogrammeissa oli edelleen pohjaviivakohinaa.

5.3 GC-menetelmä 250512JM

Menetelmän pohjana käytettiin menetelmää 180512JM. Ainoa muutos GC:n asetukseen oli jakosuhteen muutos 20:1:een. Headspace-yksikön asetukset olivat valmistajan (Agilent Technologies, Inc. 2000) suositusten mukaiset. Headspace-uunin tasapainotuslämpötilana oli 90 °C 15 min ajan. Headspace-yksikön muut parametrit olivat seuraavat: HS-pullon paineistus aika 0,5 min, injektointiaika 1,5 min, näytesilmukan lämpötila 105 °C, täyttöaika 0,1 min ja tasapainotusaika 0,05 min sekä siirtolinjan lämpötila 115 °C. Kantajakaasuna oli typpi, jonka lineaarinen virtausnopeus oli 16 cm/s. GC:n injektioportin lämpötila oli 140 °C ja jakosuhteena 20:1. GC uunin lämpötilaksi asetettiin 40 °C. Detektorina oli liekki-ionisaatiotektori (FID) lämpötilassa 250 °C.

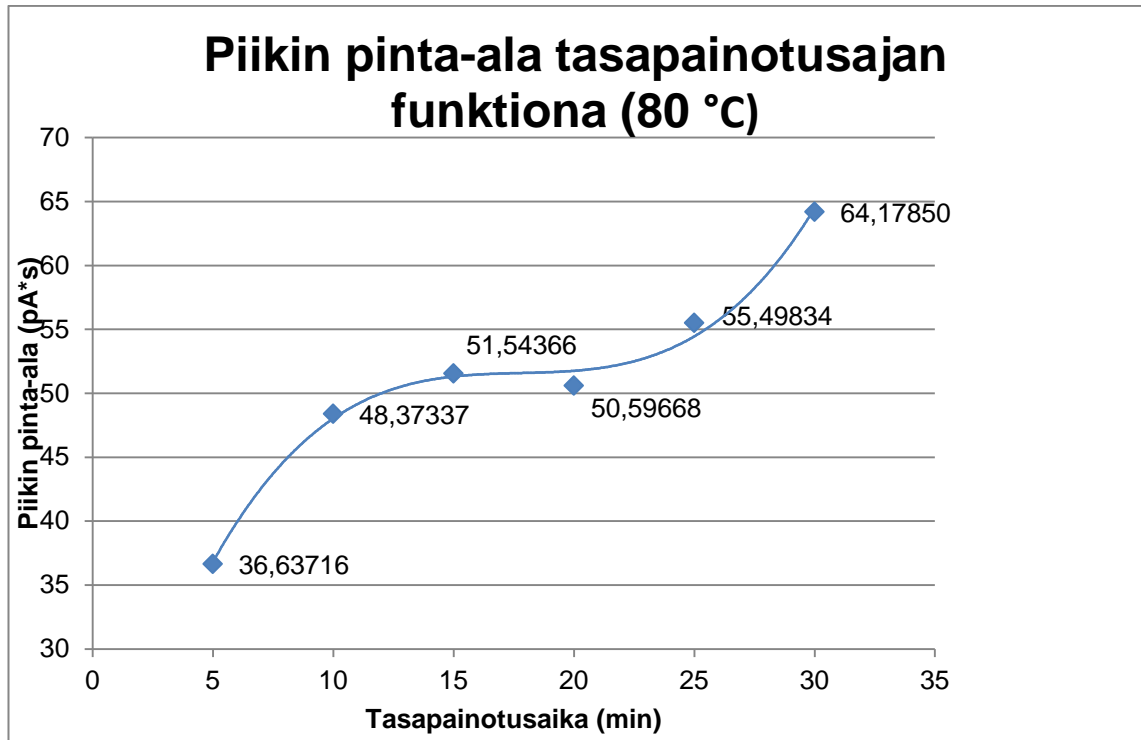
Jakosuhteen muuttamisen jälkeen uusittiin ajo 0,001 - 0,05 *m* - % liuoksilla. Etanolin retentioaika oli 3,30 min ja piikit olivat muodoltaan terävät, häntimistä ei ollut havaittavissa. Systeemitestin pinta-alojen keskiarvo oli 53,70 pA*s suhteellisen keskihajonnan ollessa 2,8 %. Standardipisteiden välille piirretyn lineaarisen regression korrelaatiokertoimen neliö (R^2) oli 0,9999.

Valmis menetelmä 250512JM ja käytettävät headspace-yksikön parametrit on koottu liitteeseen 2. Esimerkit kromatogrammeista ovat liitteessä 3.

5.4 Headspace-yksikön parametrit

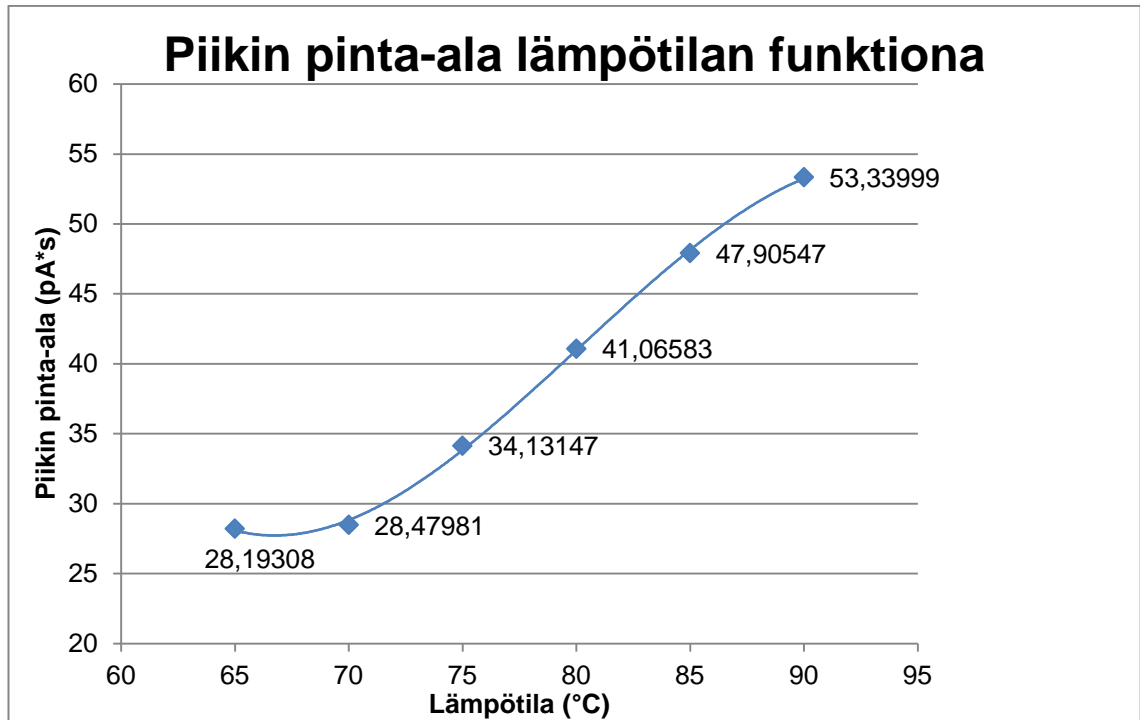
Headspace-parametrit määrittävät näytteen jakaantumisen kaasu- ja neste-faasien välille. Parametreilla pyritään saavuttamaan faasien välille tasapainotila. HS-ohjeesta (Agilent Technologies, Inc. 2000) selvitettiin menetelmäkehitykselle tärkeitä parametreja ja suunniteltiin testiajot menetelmän optimoimiseksi. Ensin testattiin HS-uunin tasapainotusaika ja lämpötila, sillä niillä on suurin vaikutus tuloksiin.

Tasapainotusaika optimoitiin ajamalla näyteketju, jossa tasapainottumisaikaa kasvatettiin näytepullojen välillä aina viidellä minuutilla. Näyteketjuun sijoitettiin kuusi rinnakkaista näytettä, joissa oli 0,005 m - % etanolia. Testattiin tasapainottumisajat välillä 5-30 minuuttia, lämpötilan ollessa 80 °C. Tuloksena saatiin kuvaaja (Kuvio 1), joka esittää piikin pinta-alan tasapainottumisajan funktiona. Tasapainottumisajan katsotaan olevan optimaalinen, kun käyrä tasoittuu (Agilent Technologies, Inc. 2000).



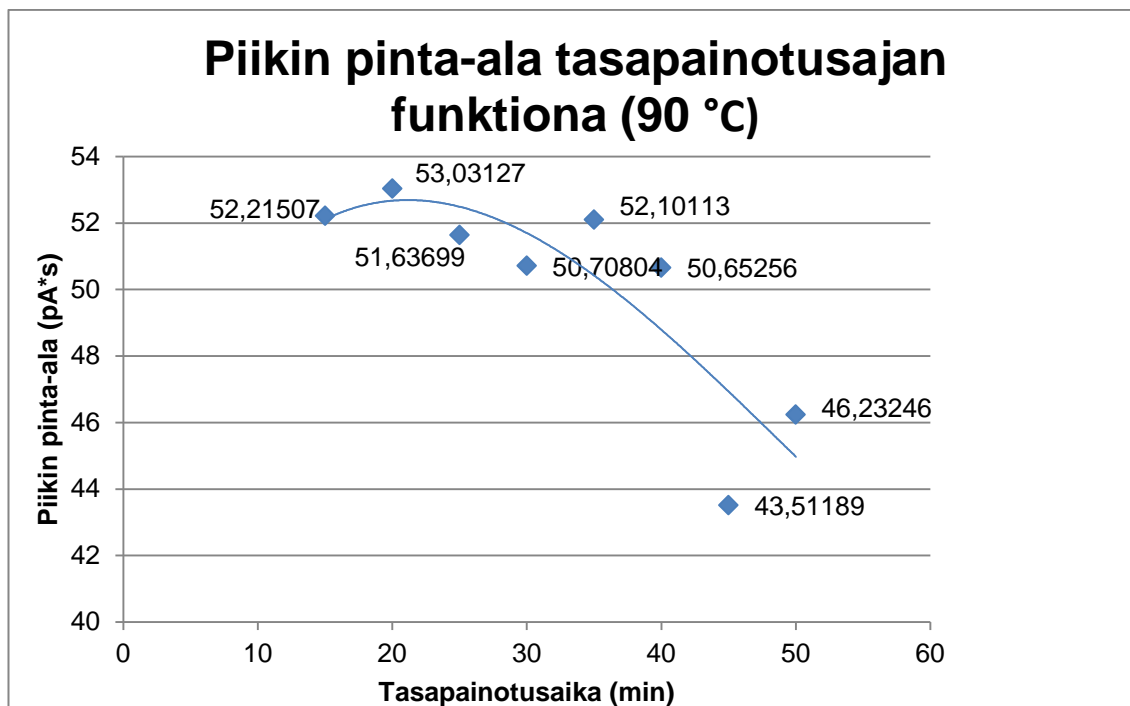
Kuvio 1. Tasapainotusajan optimointi (80 °C)

Lämpötila optimoitiin vastaavalla tavalla. Tällöin HS kasvattaa lämpötilaa näytepullojen välillä aina 5 °C:lla. Näytekettjuun sijoitettiin samanlaiset näytteet kuin tasapainottumisaikaa testattaessa. Testattiin lämpötilat välillä 65-90 °C tasapainotusajan ollessa 15 min. Tuloksena saatiin kuvaaja (Kuvio 2), joka esittää piikin pinta-alan HS-uunin lämpötilan funktiona. Lämpötilan katsotaan olevan optimaalinen, kun käyrä tasoittuu (Agilent Technologies, Inc. 2000).



Kuvio 2. Tasapainotuslämpötilan optimointi (15 min)

Kun tasapainotuslämpötilan optimointi oli suoritettu, päätettiin vielä tarkistaa tasapainotusajan vaikutus 90 °C:n lämpötilassa. Tuloksena saatiin kuvaaja (Kuvio 3), joka osoittaa, että tasapainottuminen ehtii tapahtua 15 minuutin kuluessa.



Kuvio 3. Tasapainotusajan optimointi (90 °C)

Muista parametreista selvitettiin näytepulloihin muodostuvan paineen suuruutta. Pulloon muodostuvan paineen tulisi olla noin 1,5-2 atm, jotta se riittää näytesilmukan (*loop*) täyttämiseen. Yleensä nestemäisiin näytteisiin muodostuu riittävä paine ilman lisäpainetta, joten paineistuksen vaikutusta ei testattu. Paineistus aika on tavallisesti 10-30 sekuntia, joten käytetty 30 sekunnin paineistus aika todettiin riittäväksi.

Laitteen näytesilmukan tilavuus on 1 mL. Näytesilmukan täyttöaikana käytetään yleensä 10 sekuntia, kehitettävään menetelmään valittiin kuitenkin 6 sekuntia. Täyttöajan lyhentäminen vaikuttaa paineeseen ja parantaa menetelmän herkkyyttä.

Näytteen määrä HS-pullossa on 5 g \approx mL, mikä on 25 % koko pullon tilavuudesta. Määrää kasvattamalla on mahdollista saada parempi signaali, mutta pulloa ei tulisi täyttää yli 50 % koko pullon tilavuudesta. Pienempiä näytemääriä kuitenkin suositetaan, koska ne vaativat lyhyemmän tasapainotusajan. Näytemäärän muuttaminen menetelmän jatkokehityksessä on mahdollista.

5.5 Näytteenkäsittely

Opinnäytetyössä tutkittavana materiaalina oli sooli-geelimenetelmällä valmistettu, keraaminen lääkeannosteluvalmiste. Näyteytemateriaalin erittäin pienenhuokoisen rakenteen vuoksi kapillaarivoimat estävät etanolin poistumista materiaalista ja osa etanolista voi olla loukussa suljettujen huokosten sisällä. Näistä syistä näytemateriaalia on käsiteltävä ennen GC-määrittystä, jotta kaikki näytteen sisältämä etanoli saadaan määritettyä kvantitatiivisesti. Optimaalisessa tilanteessa kaikki etanoli siirtyy materiaalista liuokseen, ja siitä edelleen höyrytilaan määritettäväksi.

Uutto

Näytemateriaalia päätettiin käsitellä sekä uuttamalla että liuottamalla. Uuttokokeita tehtiin asetonilla. Muista liuottimista arvioitiin dikloorimetania, pentaania ja heksaania. Muiden liuotinten käyttö hylättiin niiden alhaisen kiehumispisteen vuoksi. Asetonia päätettiin käyttää sen pienen pintajännityksen takia, koska se vaikuttaa asetonin kulkeutumiseen syvemmälle materiaalin huokosrakenteeseen ja näin ollen etanolin uuttumistehokkuuteen. Uutossa näytemateriaali upotettiin liuottimeen vuorokaudeksi, jonka jälkeen suoritettiin määrittys GC:lla.

Määrittelyn kromatogrammin tarkastelussa kävi ilmi, että käytetyssä kolonnissa (HP-5) etanoli ja asetoni eivät erotu riittävästi toisistaan. Asetoni näkyi kromatogrammissa suurena liuotinpiikkinä, joka peitti alleen etanolin piikin. Etanolin arveltiin näkyvän asetonipiikin etureunassa olevana olkapäänä (*shoulder*). Erotuksen ollessa näin huono, tulisi harkita vaihtoehtoisista kolonnista. Opinnäytetyön aikana toista kolonnista ei käytetty.

Liutus

Näytemateriaalin liuotuksia tehtiin vahvalla emäksellä, natriumhydroksidilla. Koska materiaalia kehitetään lääkeaineen kantajaksi, liuotuksia tehtiin aluksi

kahdessa pH:ssa. Lääkeaine saostuu korkeassa pH:ssa, joten haluttiin selvittää onnistuvatko liuotukset myös alemmassa pH:ssa, jotta saostumista ei tapahtuisi. Liuottamisen etuna on kvantitatiivisen analysoinnin mahdollisuus, sillä kaikki jäämäetanoli siirtyy liuosmuotoon ja on helposti määritettävissä.

Materiaali liuotettiin 0,2-0,6 % suhteessa natriumhydroksidiin. Liuotukset tehtiin muovisissa ja suljettavissa 50 mL:n koeputkissa. Näytemateriaalia ja NaOH:a punnittiin tunnettu määrä koeputkeen. Varsinainen liuotus tehtiin ravistelemalla ja lämmittämällä putkea. Liuotus tapahtui huoneenlämmössä noin puolessatoista vuorokaudessa ja lämpöhauteessa (40 °C) 2 - 3 tunnissa.

Liuottamisen todettiin soveltuvan näytteenkäsittelymenetelmäksi. Näytteessä oleva etanolipitoisuus asettuu valmistettujen standardien väliin ja ylittää pohjaviivakohinasta (blank) lasketut detektointi- ja kvantitointirajat (LOD ja LOQ). LOD:n arvoksi määritettiin laskennallisesti pohjaviivakohinan pinta-alojen keskihajonta*3 + pinta-alojen keskiarvo. LOQ:n arvoksi määritettiin laskennallisesti pohjaviivakohinan pinta-alojen keskihajonta*10 + pinta-alojen keskiarvo.

6 VALMISTEANALYYSIT

6.1 Näytteet

Näytteet saatiin joko valmiiksi liuotettuina tai ne liuotettiin natriumhydroksidilla (pH 14, 40 °C), jonka jälkeen liuoksista punnittiin kolmesta neljään rinnakkaista näytettä (5,0 g) suoraan näytepulloihin. Lääkeainetta sisältäneet näytteet sentrifugoitiin ja suodatettiin ruiskusuodattimella (0,22 µm), jotta saostunut lääkeaine saatiin erotettua liuoksesta.

Näyteliuokset analysoitiin menetelmällä 250512JM. Analyysiajoja suoritettiin yhteensä kolme. Näytteet 1-8 ajettiin ajossa 1, näytteet 9-16 ajossa 2 ja näytteet 17-22 ajossa 3. Analyysien näytekettjut rakennettiin siten, että ketjun alussa suoritettiin systeemitesti kuudesta rinnakkaisesta 0,005 m-%:n etanolistandardiliuoksesta, joista määritettiin systeemin toistettavuus suhteellisena keskihajontana. Systeemin toistettavuuden säilymistä seurattiin lisäksi näytteiden välillä kahden rinnakkaisen 0,005 m-%:n etanolistandardiliuoksen avulla ajoissa 1 ja 2. Ketjussa jokaisen analysoitavan näytteen rinnakkaisten jälkeen seurasi kaksi toistettavuuden seurantanäytettä, joita oli yhdessä ajossa yhteensä kahdeksan. Kaikki analyysiajot sisälsivät systeemitestin lisäksi kuusi etanolistandardiliuosta välillä 0,001-0,05 m-%, joista piirrettiin standardisuorat.

6.2 Tulosten käsittely

Tulosten käsittely aloitettiin aina tarkastelemalla standardien ja näytteiden kromatogrammeja. Näin varmistuttiin siitä, että näytteestä saatu piikin pinta-ala sijoittuu standardiliuoksista mitattujen pinta-alojen välille. Mittaustuloksista piirrettiin standardisuora, jonka yhtälön avulla laskettiin pinta-alaa vastaava etanolimäärä milligrammoina kaavan 7 mukaisesti.

$$x(m(EtOH)) = \frac{y(A)-b}{k}$$

Kaava 7

Kaavassa 7

$y(A)$ = näytteestä mitatun piikin pinta-ala ($pA \cdot s$)

b = standardisuoran ja y-akselin leikkauspiste

k = standardisuoran kulmakerroin.

Kun tiedettiin alkuperäisen näytteen ja näyteliuoksen massat, voitiin laskea alkuperäisen näytteen sisältämä etanolipitoisuus massaprosentteina. Laskut suoritettiin kaavalla 8.

$$m\% = \frac{m(\text{EtOH})}{m(\text{liuos1})} \times \frac{m(\text{mat.})}{m(\text{liuos2})} \times 100\% \quad \text{Kaava 8}$$

Kaavassa 8

$m(\text{EtOH})$ = liuoksen sisältämän etanolin massa (g)

$m(\text{liuos1})$ = näytepulloon punnitun liuoksen massa (g)

$m(\text{mat.})$ = alkuperäisen näytteen massa (g)

$m(\text{liuos2})$ = alkuperäisen liuoksen massa (g).

6.3 Analyysitulokset

Valmisteanalyysiajojen tulokset on koottu taulukkoon 1. Taulukossa esitetään jokaisen näytteen rinnakkaisten 1-3(4) tulokset sekä keskiarvo (\bar{x}), keskihajonta (s) ja suhteellinen keskihajonta (RSD).

Taulukko 1. Analyysitulokset.

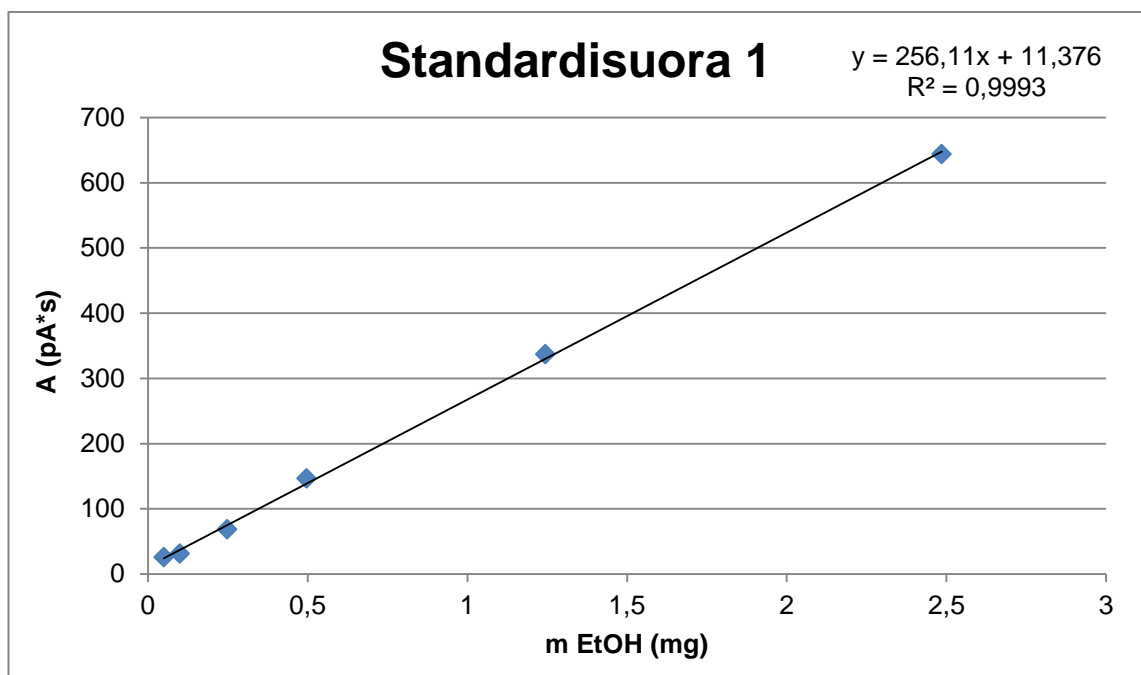
Näyte	ka (m-%)	s (m-%)	RSD (%)	1	2	3	(4)
1	8,1	0,56	6,9	8,0	8,7	7,6	
2	6,1	0,36	5,9	5,8	6,0	6,5	
3	8,3	0,93	11,2	7,9	7,7	9,4	
4	7,3	0,15	2,1	7,3	7,4	7,1	
5	6,6	0,55	8,3	6,1	6,6	7,2	
6	6,6	0,46	6,9	6,2	6,5	7,1	
7	4,3	0,21	4,8	4,2	4,5	4,1	
8	4,6	0,12	2,5	4,6	4,8	4,6	
9	4,8	0,21	4,3	5,0	4,6	4,7	
10	2,6	0,06	2,2	2,6	2,5	2,5	
11	3,3	0,00	0,0	3,3	3,3	3,3	
12	3,3	0,10	3,0	3,4	3,3	3,2	
13	2,9	0,10	3,4	3,0	2,9	2,8	
14	3,3	0,06	1,7	3,3	3,2	3,2	
15	3,8	0,10	2,6	3,8	3,9	3,7	
16	2,2	0,06	2,6	2,2	2,3	2,2	
17	4,8	0,24	5,1	4,7	5,0	5,0	4,5
18	4,8	0,22	4,6	4,5	4,9	4,9	5
19	5,0	0,13	2,5	4,8	5,0	5,0	5,1
20	4,2	0,21	5,0	4,4	3,9	4,2	4,1
21	4,2	0,13	3,0	4,4	4,2	4,1	4,2
22	3,9	0,24	6,1	3,7	3,9	4,2	3,7

Analysiajo 1

Taulukossa 2 ovat analyysiajon 1 standardiliuosten tulokset ja kuvio 4 kuvaa standardisuoraa. Analyysiajon 1 systeemitestin suhteellinen keskihajonta (RSD) oli 3,5 % ja systeemin seurantatestin suhteellinen keskihajonta oli 4,0 %.

Taulukko 2. Tulokset standardiliuksille ajosta 1.

Pitoisuus (m-%)	A (pA*s)	m (g)	m EtOH (mg)
0,001	25,75034	5,0064	0,05
0,002	31,04356	5,0063	0,10
0,005	68,65294	5,0052	0,25
0,01	146,6587	5,001	0,50
0,025	336,9274	5,0058	1,25
0,05	643,7165	4,9998	2,50



Kuvio 4. Standardisuora ajosta 1.

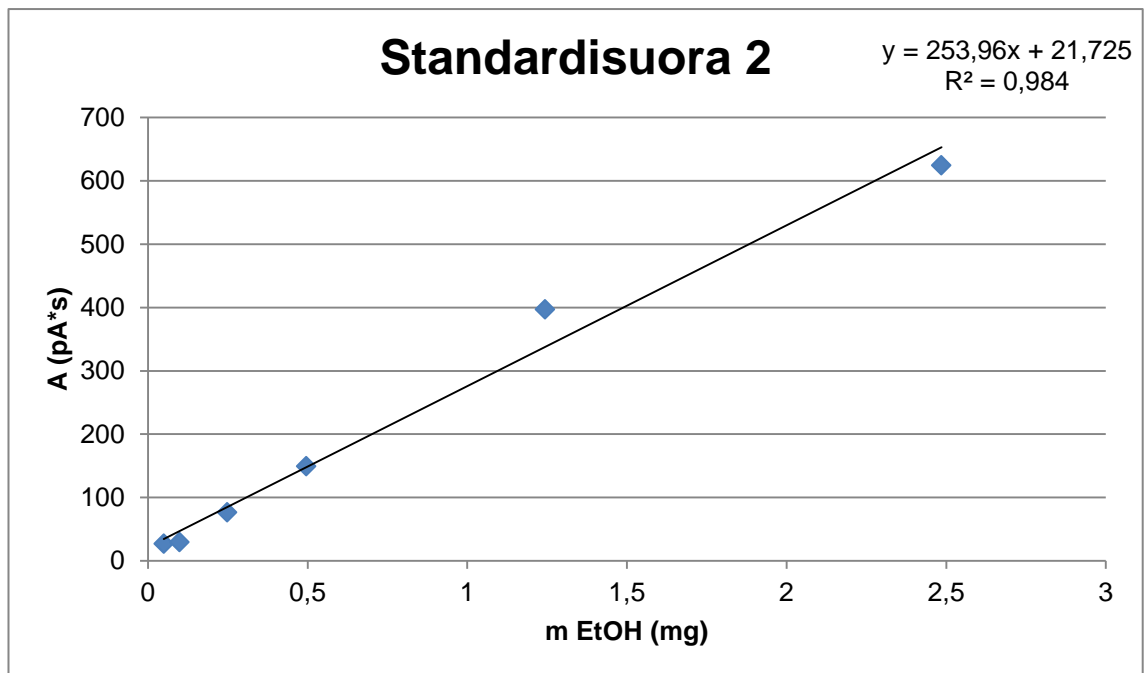
Analyysiajo 2

Taulukossa 3 ovat analyysiajon 2 standardiliuosten tulokset ja kuvio 5 kuvaa standardisuoraa. Analyysiajon 2 systeemitestin suhteellinen keskihajonta (RSD) oli 5,5 % ja systeemin seurantatestin suhteellinen keskihajonta oli 10,5 %. Näytteiden väliset seurantatestin standardiliuokset punnittiin yön yli avoimessa astiassa säilytetystä liuksesta, joten sen konsentraatio oli muuttunut. Tämä havait-

tiin vasta tuloksia tarkasteltaessa ja siksi suhteellisen keskihajonnan arvo on korkea.

Taulukko 3. Tulokset standardiliuoksille ajosta 2.

Pitoisuus (m-%)	A (pA*s)	m (g)	m EtOH (mg)
0,001	27,32767	4,9910	0,05
0,002	29,66225	5,0001	0,10
0,005	76,52174	4,9904	0,25
0,01	149,40842	4,9909	0,50
0,025	396,82471	5,0058	1,25
0,05	624,56421	4,9993	2,49



Kuvio 5. Standardisuora ajosta 2.

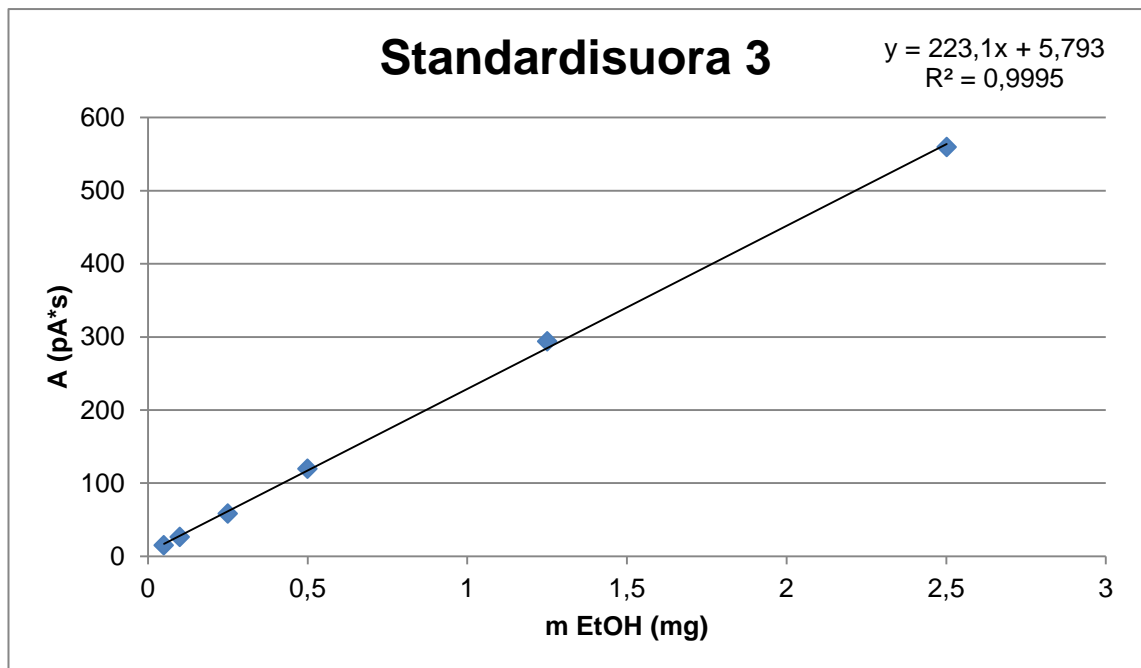
Analyysiajo 3

Taulukossa 4 ovat Analyysiajon 3 standardiliuosten tulokset ja kuvio 6 kuvaa standardisuoraa. Analyysiajon 3 systeemitestin suhteellinen keskihajonta (RSD)

oli 6,5 %. Analyysiajossa 3 systeemin toistettavuutta ei seurattu näytteiden välillä standardiliuoksilla.

Taulukko 4. Tulokset standardiliuoksille ajosta 3.

Pitoisuus (m-%)	A (pA*s)	m (g)	m EtOH (mg)
0,001	15,06606	5,0054	0,05
0,002	26,54018	5,0084	0,10
0,005	58,27747	5,0060	0,25
0,01	119,86803	5,0024	0,50
0,025	293,74896	5,0035	1,25
0,05	559,39172	5,0030	2,50



Kuvio 6. Standardisuora ajosta 3.

7 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

7.1 Menetelmäkehitys

Työssä kehitettiin kaasukromatografinen menetelmä etanolijäämien määrittämiseksi uudesta biomateriaalivalmisteesta. Menetelmäkehityksen tarkoituksena oli saavuttaa käyttötarkoitukseen soveltuva menetelmä, joka soveltuisi myöhemmin myös validoitavaksi.

Menetelmäkehitys aloitettiin vertailemalla erilaisia jo olemassa olevia menetelmiä, joista yksi valittaisiin jatkokehitykseen. Ensimmäisenä testattu Etanoli 5 -menetelmä on *full evaporation headspace* -menetelmä, jossa tutkittava näyte haihdutetaan kokonaan HS-uunissa 105 °C:n lämpötilassa. Laitevalmistajan ohjeistuksen mukaan HS-uunin lämpötilan tulisi kuitenkin olla vähintään 10 °C alhaisempi kuin alimpana kiehuvan liuottimen kiehumispiste. Tässä tapauksessa liuottimena on vesi, jonka kiehumispiste on 100 °C, joten HS-uunin lämpötila on menetelmässä epätavallisen korkea.

Menetelmän testauksessa käytettiin 50 µL:n näytemäärää. Tätä suurempi näytetilavuus ei enää höyrysty kokonaan ja mitattu etanolimäärä on oletettua pienempi (Chai *et al.*). Testauksen tarkoituksena oli selvittää etanolista saatavan signaalin voimakkuus eli kromatogrammin piikin koko ja saada käsitys siitä, kuinka pieniä pitoisuuksia menetelmällä voidaan määrittää.

Ensimmäisen testiajon etanolipiikit jäivät odotettua pienemmiksi, joten injektioportin jakosuhdetta muutettiin. Jakosuhdetta, eli kolonniin menevän ja ohivirtausventtiilin kautta poistuvan näytemäärän suhdetta muuttamalla suurempi osa injektoidusta näytteestä päätyy kolonniin, jolloin saatava signaali kasvaa. Tyhjiistä näytepulloista tehdyistä injektioinneista havaittujen pienten epäpuhtauksien oletettiin olevan systeemistä peräisin olevaa etanolia, jota yritettiin poistaa höyrypuhdistuksella. Pesusta huolimatta epäpuhtaudet säilyivät lähes muuttumattomina. Epäpuhtaudet ovat haitaksi, koska menetelmän määrittämissä (LOD) jäisi liian korkeaksi. Toistettavuus, näytemäärä ja epäpuhtaudet katsottiin Etanoli5-

menetelmän heikkouksiksi. Siksi päädyttiin jatkamaan kehitystä farmakopean mukaisella menetelmällä.

Menetelmä 180512JM osoittautui toistettavuudeltaan paremmaksi ja lineaarisuus oli hyvä. Pienimpien standardien signaalit jäivät kuitenkin yhä liian pieniksi, jota seurasi jakosuhteen ja näytemäärän muuttaminen. Lopullisella menetelmällä 250512JM piikit olivat riittävän suuret ja toistettavuus hyvä.

7.2 Valmisteanalyysit

Mikropalloista analysoitiin useita koostumuksia ja valmiste-eriä. Mikropallojen liuotinjäämäpitoisuus vaihteli 2,2 – 8,1 m-% välillä. Liuotinjäämäpitoisuuteen vaikuttaa selvimmin sidotun lääkeaineen määrä. Lääkeainepitoisuuden kasvaessa liuotinjäämäpitoisuus kasvaa.

Monoliiteista analysoitiin yhtä koostumusta sekä kokonaisena että palasina valmisteen homogeenisyyden selvittämiseksi. Analysoidut monoliitit olivat kaikki samaa valmiste-erää. Liuotinjäämät ovat jakautuneet monoliittiin tasaisesti. Tällöin valmisteesta vapautuvat liuotinjäämät voidaan määrittää materiaalin hajoamisen perusteella, kuten lääkeaineen vapautuminen. Monoliittien liuotinjäämäpitoisuus vaihteli 3,9 – 5,0 m-% välillä.

LÄHTEET

Agilent Technologies, Inc. 2000. Agilent 7694 Headspace sampler. Operating manual. Wilmington, USA: Agilent Technologies, Inc.

Agilent Technologies, Inc. 2007. Agilent J&W Column selection guide. Wilmington, USA: Agilent technologies, Inc. Viitattu 13.7.2012
http://www.crawfordscientific.com/downloads/pdf_new/GC/Agilent_Selection_Guide.pdf

Ahola, M. 2001. Sol-gel derived silica gels in controlled drug delivery: Evaluation of tissue effects and possibilities to control the release rate of drug. Väitöskirja. Turun yliopisto, Hammaslääketieteen laitos,

Ahola, M.; Fagerholm, H.; Kangasniemi, I; Kiesvaara, J.; Korteso, P.; Kurkela, K; Saarinen, N. & Yli-Urpo, A. 2003. Dissolvable oxides for biological applications. Patentti nro US 2003/0021820 A1.

Braithwaite, A. & Smith, F. J. 1996. Chromatographic methods. 5th edition. Dordrecht, Alankomaat: Kluwer Academic Publishers

Chai, X-S.; Deng, Y.; Li, H. & Zhan, H. 2009. Rapid determination of ethanol in fermentation liquor by full evaporation headspace gas chromatography. Journal of Chromatography A. Vol. 1216. No. 1. s.169-172, 2009. Viitattu 15.7.2012
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967308020050>

Ettre, L. S. & Kolb, B. 1997. Static headspace-gas chromatography. USA: Wiley-VCH, Inc.

Harris, D. C. 2007. Quantitative chemical analysis. 7th Edition. New York, USA: W. H. Freeman and Company.

Hinshaw, J. V. 2011. Headspace sampling. LCGC Europe. Vol. 24. No. 10. s.538-547, 2011. Viitattu 15.7.2012
<http://www.chromatographyonline.com/lcgc/GC+Articles/Headspace-Sampling/ArticleStandard/Article/detail/747878>

Hyötyläinen, T. & Riekkola, M-L. 2000. Kolonnikromatografia ja kapillaarielektromigraatiotekniikat. Helsinki: Helsingin yliopisto.

ICH, 2011. Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C(R5). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.

IUPAC. 1993. Nomenclature of chromatography (IUPAC recommendations 1993). Pure & Applied chemistry. Vol. 65. No. 4. s.819-872, 1993. Viitattu 12.7.2012
<http://pac.iupac.org/publications/pac/pdf/1993/pdf/6504x0819.pdf>

Jokinen, M.; Jalonen, H.; Forsback, A-P & Koskinen M. 2008. Method for preparing silica compositions, silica compositions and uses thereof. Patentti nro WO 2008/104635 A1.

Korteso, P. 2001. Sol-gel derived silica gel monoliths and microparticles as carrier in controlled drug delivery in tissue administration. Väitöskirja. Helsingin yliopisto, Farmasian laitos, Biofarmasian ja farmakokinetiikan osasto.

Marvola, M.; Mönkkönen, J. & Urtti, A. 2007. Biofarmasia ja farmakokinetiikka. Kuopio: Farmasian opiskelijayhdistys Fortis ry.

United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2004. The United States Pharmacopeia 28th revision. USA: The United States Pharmacopeial Convention, Inc.

Viitala, R. 2005. Characterisation of films, monoliths and microparticles prepared by sol-gel method and studies in vitro bioactivity and controlled drug release. Väitöskirja. Åbo Akademi, Fysikaalisen kemian laitos.

Villa, K. 2012. Low-ethanol silica sols for cell encapsulation. Opinnäytetyö. Turun ammattikorkeakoulu, Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma.

Williams, D. F. 1999. The Williams Dictionary of Biomaterials. Liverpool, Iso-Britannia: Liverpool University Press.

Etanolijäämäanalyysi

Mikropallojen ja monoliittien etanolipitoisuus määritettiin massaprosentteina ja rinnakkaisten tulosten hajonta laskettiin prosenttiyksiköissä. Analyysi suoritettiin HS-GC-menetelmällä 250512JM. Näytteistä valmistettiin kolmesta neljään rinnakkaista.

Taulukko 5. Analyysitulokset.

Näyte	ka (m-%)	s (m-%)	RSD (%)	1	2	3	(4)
1	8,1	0,56	6,9	8,0	8,7	7,6	
2	6,1	0,36	5,9	5,8	6,0	6,5	
3	8,3	0,93	11,2	7,9	7,7	9,4	
4	7,3	0,15	2,1	7,3	7,4	7,1	
5	6,6	0,55	8,3	6,1	6,6	7,2	
6	6,6	0,46	6,9	6,2	6,5	7,1	
7	4,3	0,21	4,8	4,2	4,5	4,1	
8	4,6	0,12	2,5	4,6	4,8	4,6	
9	4,8	0,21	4,3	5,0	4,6	4,7	
10	2,6	0,06	2,2	2,6	2,5	2,5	
11	3,3	0,00	0,0	3,3	3,3	3,3	
12	3,3	0,10	3,0	3,4	3,3	3,2	
13	2,9	0,10	3,4	3,0	2,9	2,8	
14	3,3	0,06	1,7	3,3	3,2	3,2	
15	3,8	0,10	2,6	3,8	3,9	3,7	
16	2,2	0,06	2,6	2,2	2,3	2,2	
17	4,8	0,24	5,1	4,7	5,0	5,0	4,5
18	4,8	0,22	4,6	4,5	4,9	4,9	5,0
19	5,0	0,13	2,5	4,8	5,0	5,0	5,1
20	4,2	0,21	5,0	4,4	3,9	4,2	4,1
21	4,2	0,13	3,0	4,4	4,2	4,1	4,2
22	3,9	0,24	6,1	3,7	3,9	4,2	3,7

Menetelmä 250512JM

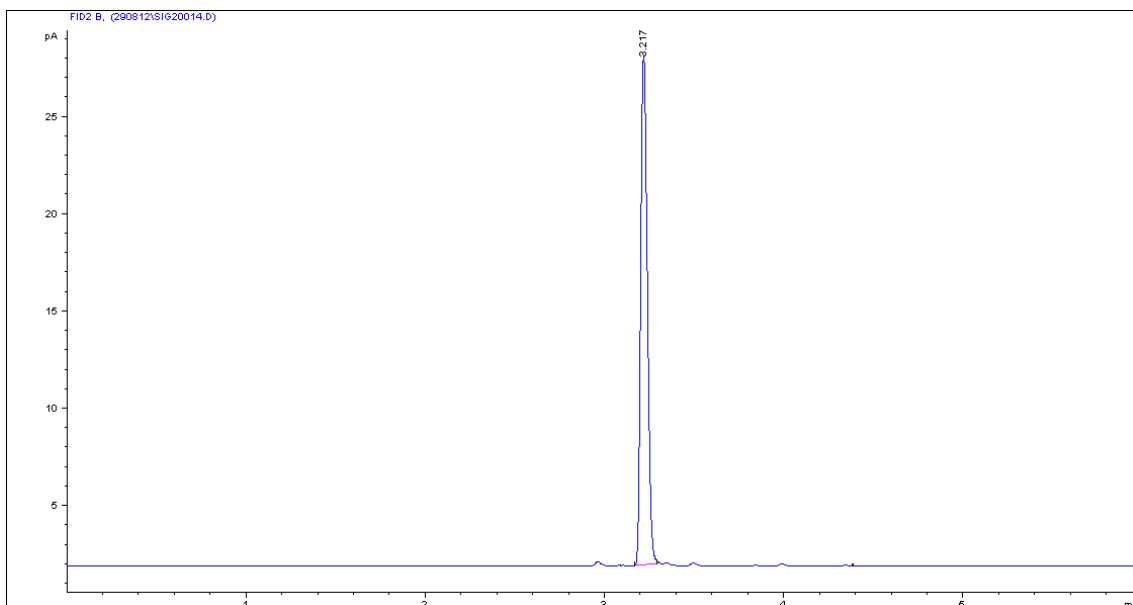
Taulukko 6. Menetelmän 250512JM parametrit

GC-yksikkö	HP-6890
Inletin lämpötila	140 °C
Jakosuhde	20:1
Kolonne	HP-5
Kolonnin mitat	30 m*0,32 mm*0,25 µm
Uunin lämpötila	40 °C
Kantajakaasun N ₂ virtaus	16 cm/s
FID lämpötila	250 °C
H ₂ virtaus	40 mL/min
Ilman virtaus	450 mL/min

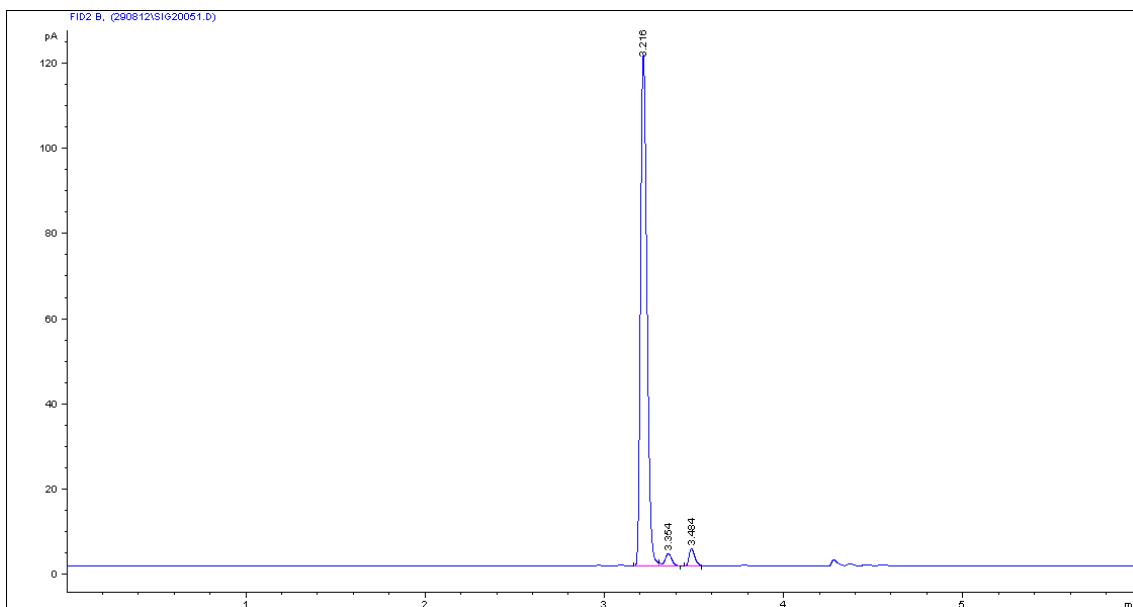
Taulukko 7. Headspace-yksikön parametrit

HS-yksikkö	HP-7694
HS-uunin lämpötila	90 °C
Vialin tasapainotus	15 min
Vialin ravistelu	low
Vialin paineistus	0,5 min
Loopin täyttö	0,1 min
Loopin tasapainotus	0,05 min
Loopin lämpötila	105 °C
Injektointiaika	1,5 min
Siirtolinjan lämpötila	115 °C
GC-syklin kesto	6 min

Esimerkit kromatogrammeista



Kuva 5. Esimerkki standardiliuoksen kromatogrammista (ajo 29.08.2012).



Kuva 6. Esimerkki näyteliuoksen kromatogrammista (ajo 29.08.2012).