



Osaamista  
ja oivallusta  
tulevaisuuden  
tekemiseen

Joakim Nevalainen

# Lääkeaineen epäpuhtausmenetelmän validointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

2.12.2019

Tekijä Otsikko	Joakim Nevalainen Lääkeaineen epäpuhtausmenetelmän validointi
Sivumäärä Aika	34 sivua + 2 liitettä 2.12.2019
Tutkinto	Laboratorioanalytikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	Laadunvalvonnan asiantuntija Venla Ruohonen Yliopettaja Jukka Niiranen
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin Fermion Oy:n Espoon analyttisen kehittämisen ja laadunvalvonnan laboratoriossa.</p> <p>Tämän työn tavoitteena oli validoida lääkeaineen lopputuotteen epäpuhtausmenetelmä UHPLC:lle. Lääkeaine on Orion Oyj:n kehittämä eikä siitä kerrota tässä työssä mitään tarkempia yksityiskohtia. Menetelmän validointi tehtiin, jotta kyseiselle lääkeaineelle voidaan hakea myyntilupa. Fermionin toimintaohjeet sekä myyntilupa vaativat, että lopputuotteen menetelmät on validoitu.</p> <p>Validoinnissa keskityttiin menetelmän epäpuhtausosaan, jotta pystytään osoittamaan menetelmän erottavan lopputuotteen epäpuhtauden mahdollisimman tarkasti ja toistettavasti. Validointi suoritettiin Fermionin toimintaohjeiden mukaisesti, jotka perustuvat ICH:n Q2-ohjeisiin. Validoinnissa analysoitiin spesifisyys, säilyvyys, lineaarisuus, käyttöalue, toistettavuus, epäpuhtauden kvantitointiraja ja robustisuus. Robustisuuteen kuului koesuunnittelu, jossa tutkittavat parametrit olivat virtausnopeus, kolonniuunin lämpötila, liikkuvan faasin prosenttiosuus gradientin alussa sekä kolonnierä. Koesuunnittelun tuloksista tehtiin mallit MODDE®-ohjelmiston avulla.</p> <p>Validoinnin kaikki analyysit täyttivät niille asetetut hyväksymisparametrit, joten voitiin todeta menetelmän olevan luotettava ja tarkka. Tuloksista voitiin myös päätellä, että analyysissä käytettävät liuokset voidaan säilyttää 9 päivää huoneenlämmössä. MODDE®-ohjelmiston avulla tehdyillä malleilla voitiin osoittaa, että menetelmällä on kyky pysyä muuttumattomana menetelmäparametrien pienistä variaatioista huolimatta.</p>	
Avainsanat	Validointi, kromatografia, UHPLC, lääkeaine

Author Title	Joakim Nevalainen Validation of Impurity Method for Active Pharmaceutical Ingredient
Number of Pages Date	34 pages + 2 appendices 2 December 2019
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Venla Ruohonen, Quality Control Specialist Jukka Niiranen, Principal Lecturer
<p>This thesis was done at Fermion Oy's Analytical Development and Quality Control Laboratory in Espoo.</p> <p>The purpose of this study was to validate an impurity method for UHPLC. The active pharmaceutical ingredient (API) used in this study has been developed by Orion Oyj, therefore no detailed information is given in this work about the formula or structure of the API or its impurity used in this validation. The validation of the method was carried out in order to be able to apply for a marketing authorization for this API in the future. Fermion's Standard Operation Procedures also require that the end-product methods are validated.</p> <p>The validation focused on the impurity method to demonstrate the method is able to accurately and precisely identify and quantitate the impurity in the final product. Validation was performed according to Fermion's SOP, which is based on ICH Q2 guidelines. In the validation, specificity, precision, linearity, range, repeatability, quantification limit for impurity, and robustness were analyzed. Robustness included a Design of Experiment (DOE) analysis and modelling.</p> <p>All validation analyzes met the validation parameters set for them. The method was found to be reliable and accurate. The results also suggest that the solutions used in the validation can be stored for nine days at room temperature. Design of Experiment provided measurement of four parameters, flow rate, column oven temperature, percentage of mobile phase composition at the beginning of the gradient, and column batch. Models made with MODDE® software were able to verify the robustness of the method.</p>	
Keywords	validation, chromatography, UHPLC, pharmaceutical

## Sisällys

### Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Yleistä	1
2.1	Fermion	1
2.2	GMP	2
2.3	OEB-luokitus	3
2.4	Koesuunnittelu	3
3	Teoria	4
3.1	Kromatografia	4
3.2	HPLC	5
3.3	UHPLC	6
3.4	Detektori	7
4	Laitteet ja reagenssit	8
4.1	Työssä käytetyt laitteet	8
4.2	Työssä käytetyt reagenssit	9
5	Validointi	9
5.1	Spesifisyys	10
5.2	Säilyvyys	10
5.3	Lineaarisuus	11
5.3.1	Lopputuotteen X epäpuhtausalue	11
5.3.2	Epäpuhtaus Y	12
5.4	Käyttöalue	13
5.5	Toistettavuus	14
5.6	Epäpuhtaus Y:n kvantitointiraja	14
5.7	Robustisuus	15
6	Työn suoritus	16
6.1	Menetelmän kuvaus	17
6.2	Systeemin soveltuvuus	18

7	Tulokset	18
7.1	Spesifisyys	18
7.2	Säilyvyys	19
7.3	Lineaarisuus	21
7.3.1	Lopputuote X:n epäpuhtausalueen lineaarisuus	21
7.3.2	Epäpuhtaus Y	22
7.4	Käyttöalue	23
7.5	Toistettavuus	24
7.6	Epäpuhtauden kvantitointiraja	27
7.7	Robustisuus	27
8	Yhteenveto	31
	Lähteet	33
	Liitteet	
	Liite 1. Standardisuoran residuaalitulokset lopputuotteelle X	
	Liite 2. Standardisuoran residuaalitulokset epäpuhtaudelle Y	

## Lyhenteet

ACN	<i>Acetonitrile</i> . Asetonitriili.
DOE	<i>Desing of Experiment</i> . Koesuunnittelu.
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> . Korkean erotuskyvyn nestekromatografia.
ICH	The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Ihmisille tarkoitettujen lääkkeiden teknisten vaatimusten harmonisoinnin kansainvälinen neuvosto vapaasti suomennettuna.
LOQ	<i>Limit of Quantitation</i> . Määrittäysraja.
OEB	<i>Orion Occupational Exposure Band</i> . Orionin työhygieenisen arvon alue.
OEL	<i>Orion Occupational Exposure Limit</i> . Orionin työhygieeninen raja-arvo.
OVAT	<i>One-Variable-at-Time</i> . Yksi muuttuja kerralla.
PDA	<i>Photo Diode Array</i> . Nestekromatografiassa käytettävä UV/Vis-detektori.
RRT	<i>Relative Retention Time</i> . Suhteellinen retentioaika.
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i> . Suhteellinen keskihajonta.
SOP	<i>Standard Operation Procedure</i> . Vakioitu toimintaohje.
UHPLC	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i> . Korkean erotuskyvyn nestekromatografia.
UV	<i>Ultraviolet</i> . Ultraviolettivalo
VIS	<i>visible light</i> . Näkyvä valo

## 1 Johdanto

Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli validoida UHPLC:n epäpuhtausmenetelmä lääkeaineen lopputuotteelle. Työ tehtiin Fermion Oy:n Espoon analyttisen kehittämisen ja laadunvalvonnan laboratoriolle, jossa analysoidaan lääkeaineita, niiden välituotteita ja lähtöaineita. Menetelmän validointi tehtiin, koska lääkkeelle ollaan hakemassa myyntilupaa ja menetelmän validointi on yksi tarvittava osa tätä prosessia. Menetelmän halutaan tunnistavan lopputuotteesta epäpuhtaudet toistettavasti, tarkasti ja tunnetulla herkkyydellä.

Näytteenä tässä työssä käytettiin Orion Oyj:n omaa kehittämää lääkeainetta eli lääkkeen vaikuttavaa ainetta. Työssä ei esitellä tarkemmin lääkeainetta, sen kemiallista kaavaa, rakennetta tai sen käyttötarkoitusta, koska sillä ei ole vielä myyntilupaa. Työssä keskityttiin menetelmän epäpuhtausanalyysiin, eikä näin ollen lopputuotteen epäpuhtautta esitellä tarkemmin.

Validoitava menetelmä oli tehty erittäin korkean suorituskyvyn nestekromatografille. Tässä työssä laitteena käytettiin Agilent 1290 Infinity I UHPLC -nestekromatografi, jossa oli käytössä PDA-detektori. Laitteessa käytettiin Waters C18-käänteisfaasikolonnia. Tässä työssä käydään läpi kaikki tällä kertaa validoinnista tehdyt analyysit. Pitoisuusmenetelmän validointi oli tehty ennen tätä työtä, eikä sitä uusittu. Pitoisuusstandardin säilyvyys ja pitoisuuden toistettavuus tutkittiin kuitenkin tämän validoinnin aikana.

Validoinnissa tutkitut suureet olivat spesifisyys, lineaarisuus, toistettavuus, käyttöalue, kvantitointiraja, säilyvyys ja robustisuus. Robustisuudessa analysoitiin menetelmän haavoittuvuus, joka toteutettiin koesuunnittelua käyttäen. Koesuunnittelussa käytettiin apuna MODDE®-ohjelmistoa.

## 2 Yleistä

### 2.1 Fermion

Fermion Oy on Orion Oyj:n omistama aktiivisia lääkeaineita kehittävä ja valmistava yritys. Se perustettiin vuonna 1970 Rikkihappo Oy:n (nykyinen Kemira Oyj) ja Orionin

yhteistyönä. Sen tarkoitus oli valmistaa penisilliiniä ja antibiootteja. [1.] Vuonna 1981 Orion hankki Fermionin kokonaan itselleen ja liitti sen osakseen, jona se edelleen on.

Fermion valmistaa ja myy aktiivisia lääkaineita Orionille sekä globaalisti. Sen portfolioon kuuluu yli 30 geneeristä lääkainetta ja yli 10 alkuperäislääkettä. Fermionilla on toimintaa Espoossa, Hangossa ja Oulussa. Sen pääkonttori sijaitsee Espoossa. [2.]

## 2.2 GMP

GMP (Good Manufacturing Practice) on järjestelmä, jolla varmistetaan, että tuotteet tuotetaan yhdenmukaisesti ja valvotaan laatustandardien mukaisesti. Sen tarkoituksena on minimoida lääkkeiden riskit, jotka liittyvät tuotantoon ja joita ei voida poistaa testaamalla lopputuotetta. [3.]

GMP kattaa kaikki tuotannon näkökohdat lähtöaineista, tiloista, laitteista, henkilöstön koulutukseen ja henkilökohtaiseen hygieniaan. Järjestelmä vaatii yksityiskohtaiset kirjalliset menettelyt jokaiselle prosessille, joka voi vaikuttaa lopputuotteen laatuun. Laitteissa on oltava dokumentoitu todiste siitä, että oikeita menettelyjä noudatetaan johdonmukaisesti jokaisessa valmistusprosessin vaiheessa joka kerta, kun tuote valmistetaan. [3.]

GMP-määräykset käsittelevät kirjanpitoa, henkilöstön pätevyyttä, puhtaanapitoa, puhdautta, laitteiden varmennusta, prosessin validointia ja valitusten käsittelyä. Suurin osa hyvää tuotantotapaa koskevista vaatimuksista on hyvin yleisiä ja avoimia, joten jokainen valmistaja voi päättää erikseen, kuinka tarvittavat toimet toteutetaan parhaiten. Tämä tarjoaa paljon joustavuutta, mutta edellyttää myös, että valmistaja tulkitsee vaatimukset tavalla, joka on järkevää kullekin yritykselle. Määräykset suojaavat kuluttajaa ostamasta tuotetta, joka on tehoton tai vaarallinen. Yritysten laiminlyönti GMP-säännöksistä voi johtaa erittäin vakaviin seurauksiin, kuten takaisinvetoon, takavarikointiin, sakkoihin tai vankilaan. [4.]

Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimea antaa GMP-todistuksia lääkkeiden ulkomaille vientiä varten suomalaisille lääketehdaille sekä kohdemaan viranomaisille. [5.]



### 2.3 OEB-luokitus

Lääkeaineiden kanssa työskentelyssä on vaarana altistua hyvinkin vaarallisille lääkeaineille. Tämän takia Orionilla on määritetty yhdisteille työhygieeniset raja-arvot, joilla turvataan työntekijää lääkeaineiden mahdollisilta vaaroilta työtehtävissä. Työhygieenisille raja-arvoille ei ole standardisoitua mallia, eivätkä Suomen ja EU:n viranomaiset yleensä anna lääkeaineille virallisia työhygieenisiä raja-arvoja. Normaalisti niille on käytetty näiden viranomaisten antamaa raja-arvoa hengitettävälle orgaaniselle pölylle. Kyseinen raja-arvo ei kuitenkaan ota huomioon lääkeaineen farmakologisia eikä toksikologisia haittavaikutuksia. Nämä vaikutukset ovat huomattavia erityisesti pitkäaikaisissa altistumisissa. Orionin laskemat omat työhygieeniset raja-arvot ottavat huomioon farmakologiset ja toksikologiset haittavaikutukset. Sen lisäksi on myös otettu huomioon raskaana olevat ja raskautta suunnittelevat henkilöt. [6.]

Orion luokittelee lääkeaineet viiteen OEB-luokkaan (Orion Occupational Exposure Band). Kun lääkeaine on saanut Orionin työhygieenisen arvon (Orion Occupational Exposure Limit, O-OEL), sille annetaan sen vaarasta kertova luokka 1–5. Tässä luokituksessa luokka 1 on vaarattomin ja 5 luokka vaarallisin. OEB-luokka määrittää työtilojen ja laitteiston vaatimukset sekä työntekijän suojautumisen työtehtävässä. OEB-luokka 4 vaatii jo erillisen ilmastoidun tilan aineen avonaista käsittelyä varten sekä ohjeistaa työntekijää käyttämään erillistä suojatakia tai kokohaalaria, joka hävitetään jätteenä työsuorituksen jälkeen. Työntekijän tulee myös käyttää hengityssuojainta käsitellessään avoimesti OEB-luokan 4 ja 5 lääkeaineita. Luokan 1–3 avoimessa työssä riittää peruslaboratoriotyöskentelyyn kuuluva henkilökohtainen ja tekninen suojautuminen. Tässä työssä käytettävät yhdisteet on luokiteltu OEB-luokkaan 2 ja 5, eli hengittäminen ja pitkäaikainen altistuminen on todettu vaaralliseksi. [6.]

### 2.4 Koesuunnittelu

Koesuunnittelu (Design of Experiments, DOE) on laskennallinen tekniikka, joka perustuu statistiikkaan. Sillä pystytään tutkimaan useiden muuttujien syy-seuraussuhdetta sekä sitä, miten nämä muuttujat vaikuttavat vasteisiin. Koesuunnitteluun kuuluu seuraavat vaiheet: tutkimuksen suunnittelu, tutkimuksen suorittaminen, mallinnus ja tulosten analysointi. Koesuunnittelun suurin etu on, että sillä voidaan tuottaa paljon informaatiota halutusta prosessista mahdollisimman vähillä, mutta tarkoin valituilla kokeilla.

Nykypäivänä, kun tutkimusten kustannukset ovat nousussa, on tärkeää, että näistä tutkimuksista saadaan tarkkoja ja oikeellisia tuloksia nopeasti ja tehokkaasti. Saaduista tuloksista voidaan luoda tietokoneohjelmistolla matemaattinen malli, jonka avulla pystytään ennustamaan hyvinkin tarkasti lopputuloksia käyttäen eri muuttujakombinaatioita. [7.]

Yleisessä käytännössä analyttisiä menetelmiä kehitetään tyypillisesti käyttämällä yksimuuttujatestausta (One-Variable-at-Time, OVAT), jossa yksi parametri optimoidaan erikseen muiden pysyessä vakiona. Noudattamalla tätä menetelmänkehitystapaa ei saada tietoa siitä, kuinka menetelmäparametrit ovat vuorovaikutuksessa keskenään ja vaikuttavat siten saatuihin tuloksiin. [8. s.10] Tämä voi johtaa analyttisiin menetelmiin, joilla on erittäin kapea toiminta-alue. Siksi tällä strategialla on potentiaalia lisätä menetelmän epäonnistumisen riskiä sen jälkeen, kun analyttinen menetelmä on siirretty kehitysympäristöstä sisäiseen tai ulkoiseen laadunvalvontalaboratorioon.

DOE:n avulla voidaan kehittää vakaita menetelmiä laadunvalvontaympäristöön sekä testata niiden haavoittuvuutta. Esimerkiksi pystytään määrittämään, tunnistamaan ja arvioimaan kriittiset menetelmäparametrit ja niiden vaikutus sekä mahdolliset menetelmäparametrien väliset vuorovaikutukset suunnittelutilassa. Näin menetelmää voidaan kehittää ja sitten validoida Kansainvälisen Yhdenmukaistamiskonferenssin (ICH, The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) antamien ohjeiden mukaisesti. Voidaan myös osoittaa analyttisen menetelmän kykyä pysyä muuttumattomana menetelmäparametrien pienistä variaatioista huolimatta, jotta se voidaan siirtää onnistuneesti laadunvalvontalaboratorioihin vähemmällä riskillä. [7.]

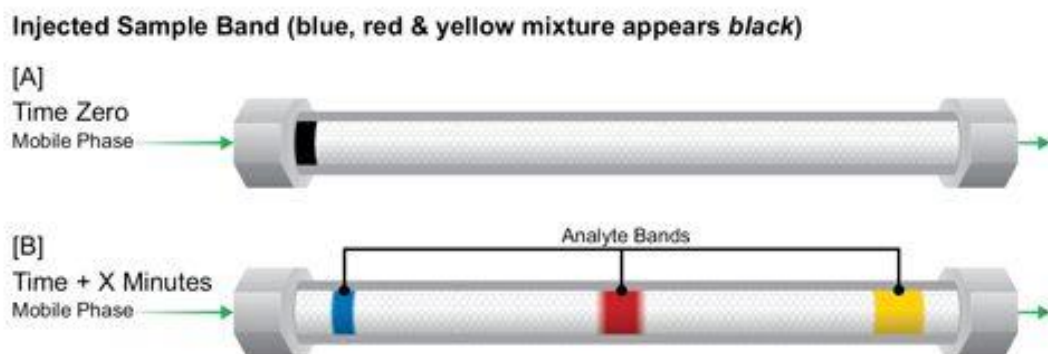
### 3 Teoria

#### 3.1 Kromatografia

Kromatografia on fysikaalinen metodi yhdisteiden erotteluun kahden eri faasin avulla. Toinen faaseista on paikoillaan (stationäärifaasi) ja toinen faaseista on liikkuva (liikkuva faasi), joka kuljettaa näytteen stationäärifaasin läpi.

Kolonnit jaetaan kategorioihin niiden toimintaperiaatteen mukaan, eli miten näyteliuos käyttäytyy stationäärifaasiin nähden. Tässä työssä käytettiin absorptiokromatografia-kolonnia, jossa kolonniin on pakattu kiinteitä partikkeleita stationäärifaasiksi ja käytettiin nestemäistä liikkuvaa faasia. Yhdisteet kiinnittyvät kiinteiden partikkelien pinnalle kulkiessaan kolonnin läpi. Mitä tiukemmin näyte kiinnittyy kiinteiden partikkelien pinnalle, sitä hitaammin se kulkee kolonnin läpi. [9. s.668–671]

Yhdisteiden erottuminen tapahtuu kolonnissa muutamassa minuutissa näytteen injektio- on jälkeen, kun liikkuva faasi kulkee jatkuvasti ja tasaisesti kolonnin läpi. Kuvassa 1 on havainnollistettu erottuminen kolonnissa näytteellä, joka sisältää kolmea eri väriä. Värit kulkevat kolonnin läpi eri nopeudella, koska niillä on eri vuorovaikutussuhde stationäärifaasin ja liikkuvan faasin kanssa. Esimerkkikuvassa keltainen väri liikkuu nopeimmin, koska sen vuorovaikutus on enemmän liikkuvassa faasissa kuin stationäärifaasissa. Kuvassa sinisen värin vuorovaikutus kohdistuu enemmän stationäärifaasiin, mistä johtuen se kulkeutuu kolonnin läpi hitaasti. Punaisen värin vuorovaikutus faasien välillä on kuvan esimerkissä sinisen ja keltaisen värin väliltä. Yhdisteiden vuorovaikutukset faasien välillä määrittävät niiden nopeuden, joka mahdollistaa niiden erotuksen kromatografisesti. Kolonnit ovat pituudeltaan yleensä 3–30 cm pitkiä ja sisähalkaisijaltaan 1–5 mm [10. s.459.].

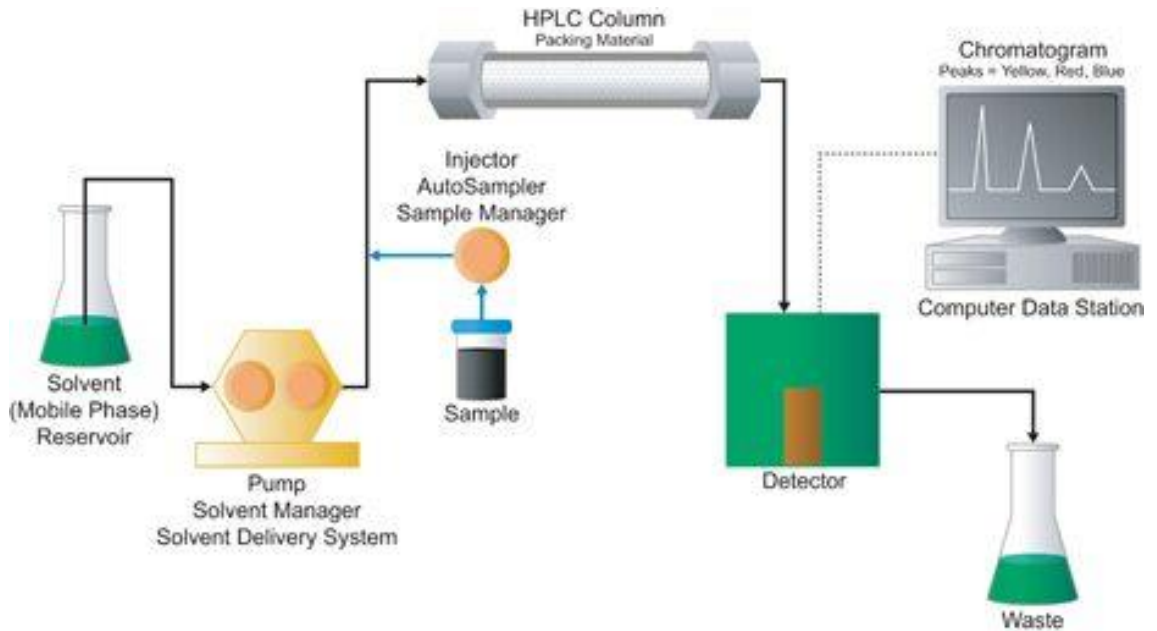


Kuva 1. HPLC-kolonnin toimintaperiaate. [11.]

### 3.2 HPLC

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (high-performance liquid chromatography, HPLC) käyttää korkeaa painetta pakottaen liikkuvan faasin ja näytteen kolonnin läpi. Systemiin kuuluu yleensä näytteensyöttäjä, pumput, erotuskolonne ja detektori. Tämä

ysteemi on yleensä yhteydessä tietokoneeseen, jota käytetään systeemin ohjaamiseen ja tulosten käsittelyyn. Kuvassa 2 on esitetty yksinkertaisesti korkean erotuskyvyn HPLC-systeemi. [9, s. 668.]



Kuva 2. Kromatografiasysteemi. [12.]

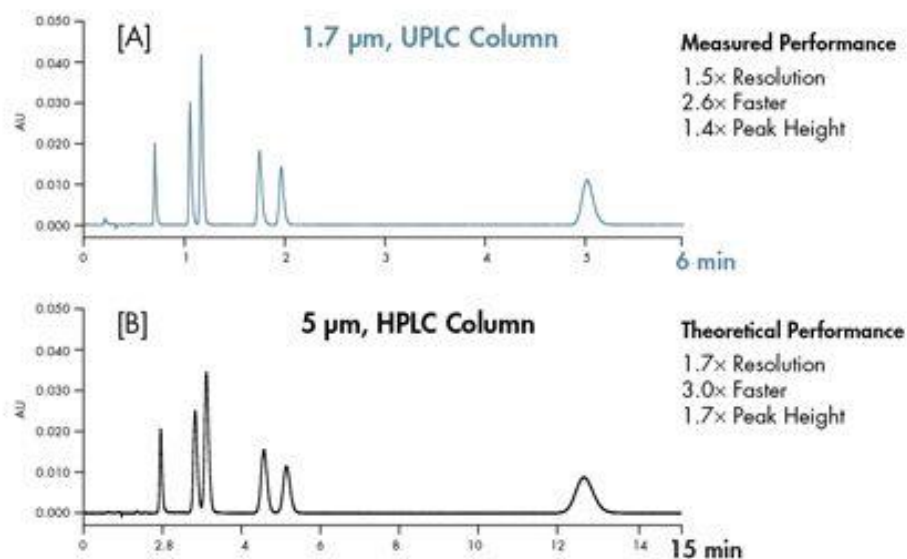
### 3.3 UHPLC

Erittäin korkean erotuskyvyn (ultra-high-performance liquid chromatography, UHPLC) toimintaperiaate on samalainen kuin HPLC:llä. Suurin yksittäinen ero näiden systeemien välillä on stationäärifaasin partikkelien pienempi halkaisija. Tämä vaatii toiminnan korkeammalla paineella kuin HPLC-systeemi, mikä mahdollistaa nopeamman analyysin ja paremman erottelukyvyn. Normaali HPLC-systeemin käyttöpaineet ovat 7–400 baarista, ja jossain tapauksissa aina 600 baariin asti. UHPLC:n pienemmät kapillaarit ja kolonnitekniikka mahdollistavat yli 1000 baarin käyttöpaineen. Taulukossa 1 on eroteltu HPLC- ja UHPLC-systeemien eroja ja niissä käytettävien näytteiden ominaisuuksia. [9, s.670]

Taulukko 1. HPLC- ja UHPLC-systeemin erot. [9. s.670]

Ominaisuus	HPLC	UHPLC
Kapillaarit	0,175–0,125 mm:n läpimitta	0.125–0,0625 mm:n läpimitta
Esikolonnin vaihtelu	$\geq 40 \mu\text{L}^2$	$\leq 10 \mu\text{L}^2$
Kolonnein suodatin	5 $\mu\text{m}$ :n partikkelit: 2,0 $\mu\text{m}$ :n sintteri 3 $\mu\text{m}$ :n partikkelit: 0,5 $\mu\text{m}$ :n sintteri	<2 $\mu\text{m}$ :n partikkelit: 0,2 $\mu\text{m}$ :n sintteri
Näytteen suodatus	5 tai 3 $\mu\text{m}$ :n partikkelit: 0,5 $\mu\text{m}$ :n sintteri tai sentrifugoiminen	<2 $\mu\text{m}$ :n partikkelit: 0,2 $\mu\text{m}$ :n sintteri

Kuvassa 3 on esitetty erot HPLC- ja UHPLC-tulosten välillä. Siitä huomaa resoluution olevan parempi UHPLC-menetelmällä ja analyysiin käytetyn ajan olevan alle puolet HPLC:n menetelmään nähden. UHPLC-systeemin partikkelien ja kapillaarien koko kaventaa näytteen piikkejä, joten sitä varten on myös oltava nopea detektori asennettuna systeemiin.



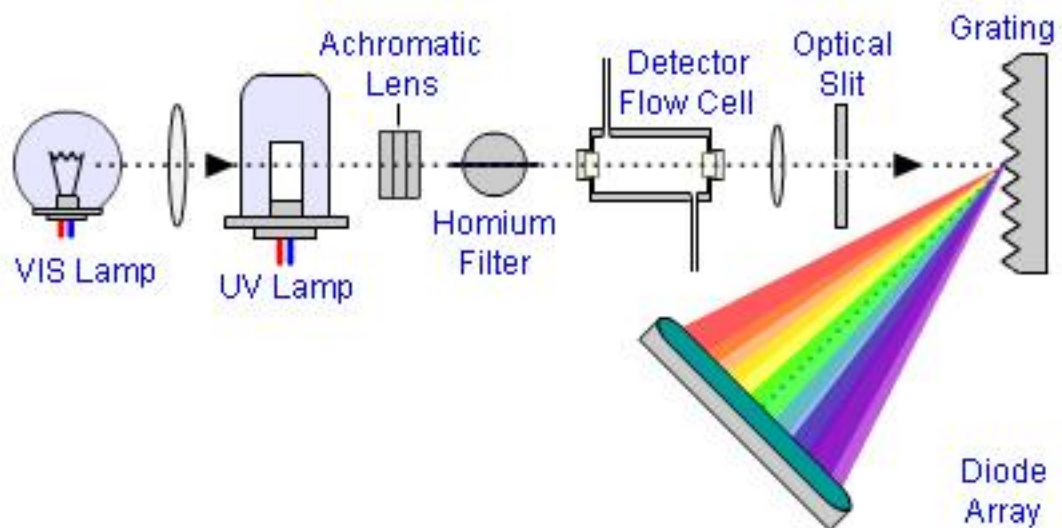
Kuva 3. UPLC-kolonnin tehokkuus verrattuna HPLC-pylväeseen. [13.]

### 3.4 Detektori

Yleisin käytetty detektori HPLC-systeemeissä on ultravioletti (UV) -detektori. Sen avulla pystytään tunnistamaan ja identifioimaan yhdisteitä näytteestä. Detektorin toiminta perustuu näytteiden kykyyn absorboida valoa eri aallonpituuksilla. Ultraviolettisäteily ulot-

tuu 190–400 nm:n alueelle, kun taas näkyvä valo (VIS) alueelle 400–700 nm. Mittausalue ylettyy detektoreilla kumminkin aina 1000 nm:iin asti. Vaikka orgaaniset molekyylit ovat värittämiä, niissä on rakenteita, kuten karbonaaliryhmiä, konjugoituneita kaksoisidoksia ja aromaattisia renkaita. Näitä rakeita kutsutaan kromoforeiksi, jotka antavat yhdisteelle kyvyn absorboida näkyvän valon ja UV-valon säteilyä. [14, s. 54, 165 - 166.]

UV-Vis-detektoriin kuuluu säteilynlähde, linssi, suodatin, näytekenno ja monokromaattori tai diodirivi. Monokromaattorilla pystytään mittaamaan vain yhtä aallonpituutta, kun taas diodirivillä varustetulla detektorilla pystytään mittaamaan UV/Vis-spektri millä tahansa aallonpituudella. Detektoreita, jotka on varustettu diodirivillä, kutsutaan PDA-detektoriksi (Photo Diode Array detector). Kuvassa 4 on esitetty yksinkertaisesti PDA-detektorin toiminta.



Kuva 4. PDA-detektorin toiminta. Säteilylähteestä valo ohjataan linssin, suodattimen ja näytekennon kautta sisäänmenoraon hilalle. Hila hajottaa valonsäteilyn eri aallonpituuksiksi, jotka ohjautuvat diodiriville, missä yksittäiset diodit mittaavat yhtä aallonpituutta. [15.]

## 4 Laitteet ja reagenssit

### 4.1 Työssä käytetyt laitteet

Työssä käytetyt HPLC-laitteet:

- Agilent 1290 Infinity I UHPLC
- kolonni: Waters Acquity UPLC HSS T3

#### 4.2 Työssä käytetyt reagenssit

Työssä käytettiin seuraavia reagensseja:

- asetonitriili, Merck, tuotenumero: 1.00030
- natriumdivetyfosfaatti monohydraatti, Merck, tuotenumero 1.06346
- fosforihappo, Merck, tuotenumero 1.00573.1000
- vetyperoksidi 30 %, Merck, tuotenumero 1.07209.

### 5 Validointi

Analyttisen menetelmän validoinnin tarkoituksena on osoittaa sen soveltuvuus haluttuun tarkoitukseen sekä menetelmän kykyä antaa luotettavia tuloksia. Validointi on suunniteltu ja dokumentoitu menettely, jolla pystytään todistetusti osoittamaan, että sen määritetty kohde pystyy tuottamaan toistettavasti määritysten asettamat tulokset. Validoinnin tuloksista ja siitä saadusta datasta voidaan laskea matemaattisesti tulosten luotettavuutta mittaavia parametrejä, esimerkiksi toistettavuutta, uusittavuutta, oikeellisuutta, selektiivisyyttä, mittausepävarmuutta sekä toteamis- ja määritysrajoja. [16.]

Validointi suoritettiin kansainvälisen ICH:n Q2-ohjeen pohjalta. ICH on elin, joka harmonisoi lääkealan toimia. Se on tehnyt laatuun koskevia ohjeistuksia 14 kappaletta. Tässä validoinnissa pohjana käytettiin ohjeistusta Q2 Analytical Validation. Se ohjeistaa validoinnissa käytettäviä analyysejä sekä ominaisuuksia, joita tulisi ottaa huomioon analyttisten menetelmien validoinnissa. Sen päätarkoituksena on yhtenäistää validointimenettelyt. [17.]

Fermionin on validoitava kaikkien rekisteröintimateriaalin mukaisten lähtöaineiden, väli- tuotteiden ja lopputuotteiden virallisiin analyyseihin käytettävät menetelmät. Virallisen menetelmän määritelmä on, että se on GMP:n mukainen analyysimenetelmä, joka on kuvattu rekisteröintimateriaalissa. [16.]

## 5.1 Spesifisyys

Menetelmän spesifisyys kuvaa sen kykyä mitata näytteestä tiettyä analyyttiä. Analyysillä halutaan varmistua, että näytematriisi ei häiritse halutun analyytin vastetta ja että se pystytään erottamaan muista analyyteistä.

Validoinnissa testattiin menetelmän erottelukykyä hapettumisen hajoamistuotteella, jonka suhteellinen retentioaika (RRT) on 0,95.

Spesifisyys osoitettiin analysoimalla lopputuotteen X näyteliuos, joka ensin hajotettiin vetyperoksidilla lämpimässä vesihautteessa. Näyteliuokseen lisättiin epäpuhtaus Y:tä 0,5 % suhteessa näytteen pitoisuuteen. Liuoksella haluttiin todentaa menetelmän erottelukykyä hapettumisen hajoamistuotteella RRT 0,95, joka on mahdollinen epäpuhtaus, sekä lopputuotteelle X ja epäpuhtaudelle Y. Suhteelliset retentioajat ja resoluutiot laskettiin tuloksiksi. Hyväksymiskriteerinä oli, että lopputuotteen X ja epäpuhtauden Y resoluutiot edelliseen piikkiin kromatogrammissa ovat 1,5 tai enemmän.

## 5.2 Säilyvyys

Validoinnissa käytettävien liuosten säilyvyyttä tutkittiin validoinnin aikana. Näyteliuos, pitoisuusstandardiliuos, epäpuhtausstandardiliuos, kvantitointirajaliuos ja spesifisyysliuos säilöttiin huoneenlämmössä yhdeksän päivää ja analysoitiin 2, 6 ja 9 päivän säilönnän jälkeen. Säilytyistä liuoksista analysoitiin eri parametrejä liuoksen käyttötarkoituksen mukaan.

Lopputuotteen X liuksesta analysoitiin seuraavia parametrejä:

- lopputuotteen X pitoisuus (%)
- lopputuotteen X prosentuaalinen piikin pinta-ala (%)
- epäpuhtauden Y pitoisuus (%)
- epäpuhtauden Y piikin pinta-ala
- suurimman tuntemattoman epäpuhtauden pitoisuus (%)
- epäpuhtaudet yhteensä (%).



Pitoisuusstandardin analysoitavat parametrit olivat

- lopputuotteen X piikin pinta-ala
- lopputuotteen X piikin prosentuaalinen pinta-ala
- epäpuhtauden Y piikin pinta-ala.

Epäpuhtausstandardista analysoitiin:

- lopputuotteen X piikin pinta-ala
- lopputuotteen X piikin prosentuaalinen pinta-ala.

Kvantitointirajaliuoksesta analysoitiin seuraavat parametrit:

- lopputuotteen X piikin pinta-ala
- lopputuotteen X piikin prosentuaalinen pinta-ala.

Spesifisyys näyteliuoksesta analysoitiin

- lopputuotteen X piikin pinta-ala
- lopputuotteen X piikin prosentuaalinen pinta-ala
- epäpuhtauden Y piikin pinta-ala.

### 5.3 Lineaarisuus

Lineaarisuus kuvastaa käyttöaluetta, jolla näytteen tulos on suoraan verrannollinen näytteen konsentraatioon. Lineaarisuutta varten tehtiin liuossarja, joka analysoitiin menetelmän mukaisesti.

#### 5.3.1 Lopputuotteen X epäpuhtausalue

Lopputuote X:lle lineaarisuus epäpuhtausalueella osoitettiin kvantitointirajasta (0,05 % näytteen pitoisuuteen nähden) epäpuhtauden kalibrintistandardin vahvuuteen (1,0 % näytteen pitoisuuteen nähden). Tehtiin taulukon 2 mukainen liuossarja, joka analysoitiin menetelmän mukaisesti.

Taulukko 2. Lopputuote X:n epäpuhtausalueen lineaarisuuden liuossarja.

Taso	Konsentraatio	
	Näytteeseen nähden	µg/mL
LOQ	0,05 %	0,128
50 %	0,10 %	0,256
75 %	0,15 %	0,385
Spec limit	0,20 %	0,513
120 %	0,24 %	0,615
500 %	1,00 %	2,564

Tuloksista piirrettiin suora lopputuotteen X pinta-ala näytteen konsentraatiota vasten. Tuloksista laskettiin suoran yhtälö, y-akselin leikkauspiste ja suoran korrelaatiokerroin. Hyväksymiskriteerinä oli, että standardisuoran korrelaatiokerroin on 0,992 tai suurempi.

### 5.3.2 Epäpuhtaus Y

Epäpuhtaus Y:lle lineaarisuus osoitettiin kvantitointirajasta (0,05 % näytteen pitoisuuteen nähden) 110 %:iin spesifikaatorajaan (0,60 % näytteen pitoisuuteen nähden). Tehtiin liuossarja, joka on esitetty taulukossa 3, ja analysoitiin menetelmän mukaisesti.

Taulukko 3. Epäpuhtaus Y:n lineaarisuuden liuossarja

Taso	Konsentraatio	
	Näytteeseen nähden	µg/mL
LOQ	0,05 %	0,115
30 %	0,14 %	0,346
45 %	0,23 %	0,577
75 %	0,37 %	0,923
90 %	0,46 %	1,154
110 %	0,55 %	1,385

Tuloksista piirrettiin suora lopputuotteen X pinta-ala näytteen konsentraatiota vasten. Tuloksista laskettiin suoran yhtälö, y-akselin leikkauspiste ja suoran korrelaatiokerroin. Hyväksymiskriteerinä oli, että standardisuoran korrelaatiokerroin on 0,992 tai suurempi.

#### 5.4 Käyttöalue

Jotta pystytään osoittamaan, että määrittäminen on toistettava ja tarkka myös lineaarisuusalueen ääripäissä, määritetään epäpuhtausmenetelmän käyttöalue. Menetelmän käyttöalueen ja tarkkuuden osoittamiseksi valmistettiin lopputuote X:stä näytteitä, joihin lisättiin tunnettu määrä epäpuhtaus Y:tä. Kolme eri pitoisuutta epäpuhtaus Y:tä lisättiin näytteisiin. Pitoisuudet olivat kvantitointirajasta 48 prosenttiin näytteeseen nähden kuten taulukossa 4 on esitetty.

Taulukko 4. Käyttöalueen analyysin liuosarja

Epäpuhtaus Y:n taso näytteeseen nähden	Lopputuote X:n punnitusten lukumäärä (250 µg/mL)	Epäpuhtaus Y:n konsentraatio näytteessä µg/mL
Lähtötaso	1	0,000
LOQ (0,05 %)	3	0,125
0,20 %	6	0,500
0,24 %	3	0,600

Analyysin tuloksista laskettiin epäpuhtautulokset, epäpuhtautulosten keskiarvot ja suhteellinen keskihajonta.

Hyväksymiskriteerit:

RSD %

- ≤ 15,0 % kun tulostaso on ≤ 0,10 %
- ≤ 10,0 % kun tulostaso on > 0,10 %.

## 5.5 Toistettavuus

Pitoisuus- ja epäpuhtausmenetelmien toistettavuus osoitettiin analysoimalla samasta homogeenisestä lopputuotteen X näytteestä kuusi punnitusnäytettä. Punnituksista laskettiin näytteen pitoisuuden keskiarvo, epäpuhtauksien pitoisuuksien keskiarvo, keskihajonnat edellä mainituista sekä suhteelliset keskihajonnat.

Hyväksymiskriteerit:

Pitoisuustulokset

- pitoisuustulosten RSD  $\leq 2,0$  %
- pitoisuus 97,0–103,0 %.

Epäpuhtaustulokset

- RSD %
- $\leq 15,0$  % kun tulostaso on  $\leq 0,10$  %
- $\leq 10,0$  % kun tulostaso on  $> 0,10$  %.

Toistettavuusanalyysin yhteydessä analysoitiin lopputuotteen X pääpiikin retentioajat. Hyväksymiskriteerinä suhteellisen keskihajonnan tuli olla 1,0 % tai vähemmän.

## 5.6 Epäpuhtaus Y:n kvantitointiraja

Kvantitointirajalla tarkoitetaan näytteen pienintä konsentraatiota, joka pystytään määrittämään hyväksyttävällä tarkkuudella sekä toistettavuudella.

Menetelmän kvantitointiraja osoitettiin vain epäpuhtaus Y:lle, koska se on osoitettu lopputuote X:lle jo aiemmin. Osoitus tapahtuu laskemalla signaalikohinasuhteet, piikkien pinta-alojen keskiarvot ja RSD:t kvantitointirajaliuoksen kuudelle injektioille. Kvantitointiraja on 0,05 % lääkeaineen pitoisuuteen nähden.

Hyväksymiskriteerit:

- piikkien pinta-alojen RSD %  $\leq 5$  %
- S/N  $\geq 10$ .

## 5.7 Robustisuus

UHPLC-menetelmän robustisuutta tutkittiin validointimenetelmän aikana kokeellisen suunnittelun apuvälineellä (DOE). Kokeena menetelmän toimivuuden tutkimiseen käytettiin kaksitasoista lineaarista seulontaa, joka sisälsi kolme keskipistekoetta. Suunnittelun avulla yhden tekijän vaikutusta pystyttiin arvioimaan kaikista muista tekijöistä riippumattomasti.

Väkevä lopputuote X:n liuos hajotettiin lisäämällä vetyperoksidiliuosta ja lämmittämällä liuos vesihauteessa 30 minuutin ajan. Sitten liuokseen lisättiin lopputuote Y- liuosta ja täytettiin merkkiin näyteliuottimella. Lopullinen liuos sisälsi lopputuotetta X näytteen pitoisuuden verran ja noin 0,5 % epäpuhtaus Y:tä näytteen pitoisuuteen nähden sekä jonkin verran hapetushajoamistuotetta. Tätä liuosta ajettiin kaikissa suunnitelman olosuhteissa.

Parametrit tai tekijät, joita muutettiin kokeessa:

- kolonnin lämpötila
- virtausnopeus
- liikkuvaan faasin suhde gradientin alussa
- kolonni.

Kokeessa mitatut vasteet valittiin kuvaamaan UHPLC-menetelmän spesifisyyttä ja erotuskykyä. DOE-seulontakokeessa mitatut vasteet on lueteltu alla niiden vaatimusten kanssa, jotka on asetettu Fermion SOP-ohjeiden mukaisesti. Taulukossa 5 on esitetty tehdyt analyysisarjat ja niiden parametrit.

Vaste ja hyväksymiskriteerit:

- lopputuote X piikin resoluutio  $\geq 1,5$
- epäpuhtaus Y piikin resoluutio  $\geq 1,5$

- lopputuote X piikin häntimistekijä 0,8–1,5.

Taulukko 5. Robustisuus analyysin liuossarja

	Kolonnin lämpötila	Virtaus nopeus (mL/min)	Ajoliuos B, Alku %
Injektio 1	33	0,8	3
Injektio 2	37	0,8	3
Injektio 3	33	1,0	3
Injektio 4	37	1,0	3
Injektio 5	33	0,8	7
Injektio 6	37	0,8	7
Injektio 7	33	1,0	7
Injektio 8	37	1,0	7
Injektio 9	35	0,9	5
Injektio 10	35	0,9	5
Injektio 11	35	0,9	5
Injektio 12	35	0,9	5

## 6 Työn suoritus

Työ suoritettiin Fermionin työohjeen M121983 v.3.0 mukaisesti. Siihen ei tehty tämän validoinnin aikana muutoksia. Ohjeesta ei poikettu työn suorituksessa ja työ tehtiin normaalina työtehtävänä.

Laskuissa käytettiin Fermionin Excel-pohjaa, jolla saatiin laskettua keskiarvot, hajonnat ja suhteelliset hajonnat, sekä muut halutut tulokset. Robustisuuden koesuunnittelussa käytettiin apuna MODDE®-ohjelmistoa.

## 6.1 Menetelmän kuvaus

Validoinnissa käytettävän menetelmän UHPLC-ajo-olosuhteet on esitetty taulukossa 6. Kaikissa validoinnin aikana suoritetuissa ajoissa olosuhteet pidettiin samoina, poikkeuksena koesuunnittelun analyysit. Menetelmän käytetty gradientti on taulukossa 7.

Taulukko 6. Menetelmän ajo-olosuhteet

<b>Kolonnin lämpötila</b>	35 °C
<b>Ajoaika</b>	11 min
<b>Tasapainotusaika</b>	3 min
<b>Virtausnopeus</b>	0,9 mL/min
<b>Injektio-tilavuus</b>	3 µL
<b>Ajoliuos A</b>	150 mM fosfaattipuskuri (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) pH 3,0
<b>Ajoliuos B</b>	90 % asetonitriili (ACN) vedessä
<b>Neulanpesu</b>	100 % asetonitriili (ACN)
<b>Mittausaallonpituus</b>	210 nm
<b>Spektrin keräys</b>	200–400 nm

Taulukko 7. Menetelmän gradientti

<b>Aika</b>	<b>% A</b>	<b>% B</b>
<b>0 min</b>	85	15
<b>0,2 min</b>	50	50
<b>10 min</b>	20	80
<b>10,5 min</b>	20	80
<b>11 min</b>	85	15

Näytteen, standardien ja liuottimen pitoisuudet ovat eriteltyinä taulukossa 8.

Taulukko 8. Validoitavassa menetelmässä käytettyjen liuosten pitoisuus ja sekä menetelmän liuotin

Liuotin	Asetonitrili : 0,0425 % fosforihappo 5 : 95 (V/V)
Pitoisuusstandardiliuos	250 µg/mL lopputuote X:n standardia liuoksessa
Epäpuhtausstandardiliuos	2,5 µg/mL lopputuote X:n standardia liuoksessa
Kvantitointirajaliuos	0,125 µg/mL lopputuote X:n standardia liuoksessa
Näyteliuos	250 µg/mL näytettä liuoksessa

## 6.2 Systeemin soveltuvuus

Systeemin soveltuvuus tarkastettiin jokaisen analyysisuorituksen yhteydessä. Analyysin tulokset ovat hyväksytyjä vain, kun jokainen systeemin soveltuvuuteen kuuluva parametri täyttää niille annetun hyväksymiskriteerin. Pitoisuusstandardin systeemin soveltuvuutta ei tarvinnut tehdä, jos analysoitiin vain epäpuhtauksia. Taulukossa 9 on esitetty menetelmän systeemin soveltuvuuden parametrit ja niiden hyväksymiskriteerit.

Taulukko 9. Menetelmän systeemin soveltuvuus parametrit ja hyväksymiskriteerit.

Parametri	Hyväksymiskriteeri
Pitoisuusstandardin piikin pinta-alojen RSD % (n=5)	≤ 2,0 %
Pitoisuusstandardin piikin retentioajan RSD % (n=5)	≤ 1,0 %
Epäpuhtausstandardin piikin pinta-alojen RSD % (n=4)	≤ 10,0 %
Kvantitointirajaliuos S/N alussa ja lopussa	≥ 10

## 7 Tulokset

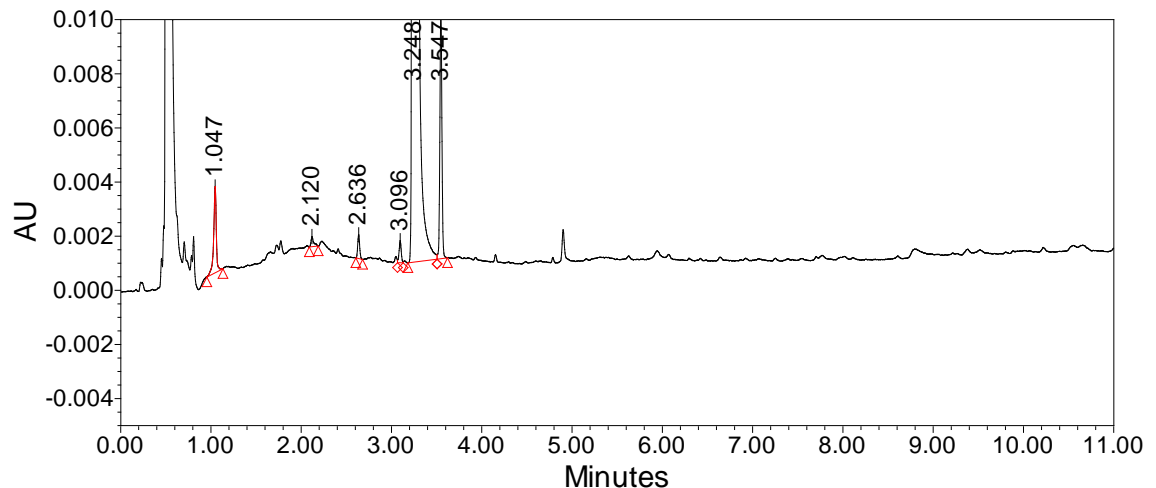
### 7.1 Spesifisyys

Piikkien resoluutiot ovat hyviä, ja asetettu hyväksymiskriteeri täyttyy kaikissa kvantitointirajan ylittävissä piikeissä. Analyysin tulokset taulukossa 10. Resoluutiot on laskettu piikkiä edeltävään piikkiin nähden. Kuvassa 5 on spesifisyysanalyysin kromatogrammi.



Taulukko 10. Spesifisyysnäytteen piikkien retentioajat, suhteelliset retentioajat (RRT) ja resoluutiot.

Yhdiste	Retentioaika	RRT	Resoluutio
RRT~0.322	1,047	0,322	-
RRT~0.653	2,120	0,653	24,2
RRT~0.812	2,636	0,812	12,5
RRT~0.953	3,096	0,953	11,1
Lopputuote X	3,248	1,000	3,3
Epäpuhtaus Y	3,547	1,092	6,7



Kuva 5. Spesifisyysnäytteen kromatogrammi. Lopputuote X:n piikki näkyy retentioajalla 3,248 ja epäpuhtaus Y:n piikki 3,547. Hapettumishajoamistuotteen piikki kromatogrammissa on retentioajalla 3,096.

## 7.2 Säilyvyys

Liuosten säilyvyys tulokset ovat taulukossa 11, 12 ja 13. Tuloksista päätellen epäpuhtaus Y:tä ei muodostu yli kvantitointirajan liuoksissa, joissa lopputuotteen X konsentraatio on näyteliuoksen tasolla. Koska epäpuhtaus Y:n pitoisuus ei ylitä kvantitointirajaa 9 päivän sisällä, sekä näyteliuoksessa että pitoisuusstandardiliuoksessa, voidaan liuoksia säilyttää 9 päivän ajan huoneenlämpötilassa.

Taulukko 11. Näytteen säilyvyytulokset

Parametri	Muutos (%) lähtötasoon nähden			
	Lähtötaso	2 päivää	6 päivää	9 päivää
Lopputuote X pitoisuus %	100,7	100,8 (0,1 %)	100,9 (0,2 %)	100,9 (0,2 %)
Lopputuote X pinta-ala %	99,89	99,84 (0,0 %)	99,83 (0,1 %)	99,81 (0,1 %)
Epäpuhtaus Y %	< 0,05	< 0,05	0,05	< 0,05
Epäpuhtaus Y, pinta-ala	0	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Suurin tuntematon epäpuhtaus (%)	0,06	0,06	0,06	0,07
Kaikki epäpuhtaudet (%)	0,06	0,06	0,11	0,11

Epäpuhtausstandardiliuos ja kvantitointirajaliuos säilyvät tämän tutkimuksen mukaan 9 päivää huoneenlämmössä. Kvantitointirajaliuoksen pinta-alan muutos on suuri prosentissa, mutta arvot ovat kuitenkin hyvinkin samankaltaiset eivätkä vaikuta lopputulokseen.

Taulukko 12. Pitoisuusstandardiliuoksen, epäpuhtausstandardiliuoksen ja kvantitointirajaliuoksen säilyvyys tulokset

Liuos	Muutos (%) lähtötasoon nähden				
	Parametri	Lähtötaso	2 päivää	6 päivää	9 päivää
Pitoisuusstandardiliuos	Lopputuote pinta-ala X	2173792	2140032 (1,6 %)	2147833 (1,2 %)	2165761 (0,4 %)
	Lopputuote pinta-ala % X,	100	99,88 (0,1 %)	99,87 (0,1 %)	99,84 (0,2 %)
	Epäpuhtaus pinta-ala Y	0	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Epäpuhtausstandardiliuos	Lopputuote pinta-ala X	22284	21494 (3,5 %)	21299 (4,4 %)	21743 (2,4 %)
	Lopputuote pinta-ala % X,	100,00	100,00	100,00	100,00
Kvantitointirajaliuos	Lopputuote pinta-ala X	1219	987 (19,0 %)	1010 (17,1 %)	935 (23,3 %)
	Lopputuote pinta-ala % X,	100,00	100,00	100,00	100,00

Spesifisyysliuos säilyy 9 päivää huoneenlämmössä tulosten perusteella, jotka on esitetty taulukossa 13.

Taulukko 13. Spesifisyysnäytteen säilyvyys tulokset

Liuos	Muutos (%) lähtötasoon nähden			
	Parametri	Lähtötaso	6 päivää	9 päivää
Spesifisyysliuos	Lopputuote X pinta-ala	2125091	2134606 (0,4 %)	2129173 (0,2 %)
	Lopputuote X, pinta-ala %	98,86	98,53 (0,3%)	98,71 (0,2 %)
	Epäpuhtaus Y pinta-ala	14504	15227 (5,0%)	14901 (2,7%)

### 7.3 Lineaarisuus

#### 7.3.1 Lopputuote X:n epäpuhtausalueen lineaarisuus

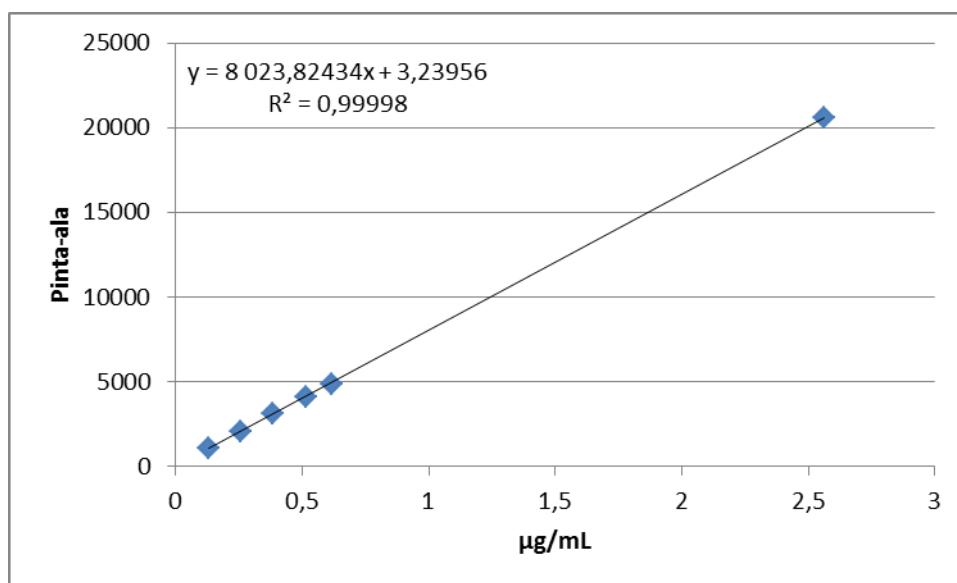
Lopputuote X:n epäpuhtausalueen lineaarisuus osoitettiin kvantitointirajasta (0,05 % näytteen pitoisuuteen nähden) epäpuhtausstandardin vahvuuteen (1,0 % näytteen pitoisuuteen nähden). Tulokset on esitetty taulukossa 14.

Taulukko 14. Lopputuote X:n mitatut pitoisuudet ja pinta-alat

	Pitoisuus ( $\mu\text{g/mL}$ )	Pinta-ala
Injektio 1	0,1282	1063
Injektio 2	0,2564	2040
Injektio 3	0,3846	3126
Injektio 4	0,5128	4123
Injektio 5	0,6154	4881
Injektio 6	2,5641	20586

Taulukon 14 tuloksista piirretty suora on esitetty kuvassa 6, johon on laskettu suoran yhtälö ja korrelaatiokerroin. Suora kuvastaa saatuja tuloksia hyvin, mistä kertoo lähellä

1:tä oleva korrelaatiokerroin, joka selkeästi täyttää hyväksymiskriteerin. Standardisuoran residuaalitulokset ovat liitteessä 1.



Kuva 6. Lopputuotteen X standardisuora.

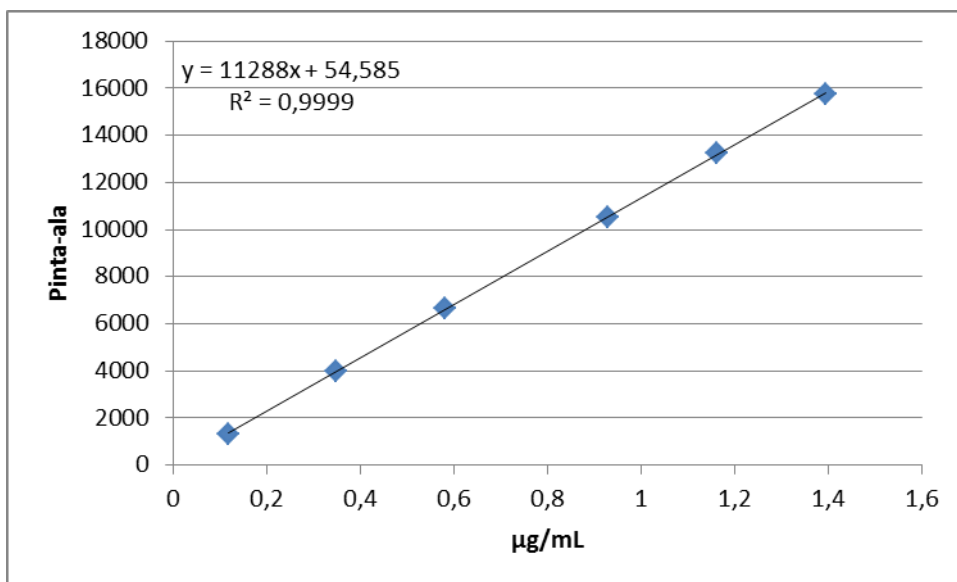
### 7.3.2 Epäpuhtaus Y

Epäpuhtaus Y:n lineaarisuus osoitettiin kvantitointirajasta (0,05 % näytteen pitoisuuteen nähden) aina 110 %:iin spesifikaatorajasta (0,55 % näytteen pitoisuuteen nähden). Tulokset on esitetty taulukossa 15.

Taulukko 15. Epäpuhtaus Y:n mitatut pitoisuudet ja pinta-alat

	Pitoisuus (µg/mL)	Pinta-ala
Injektio 1	0,115	1334
Injektio 2	0,346	4002
Injektio 3	0,577	6629
Injektio 4	0,923	10496
Injektio 5	1,154	13235
Injektio 6	1,385	15721

Taulukon 15 tuloksista piirretty suora on esitetty kuvassa 7, johon on laskettu suoran yhtälö ja korrelaatiokerroin. Suora on hyvä, ja se selkeästi täyttää hyväksymiskriteerin. Standardisuoran residuaalitulokset ovat liitteessä 2.



Kuva 7. Epäpuhtaus Y:n standardisuora.

#### 7.4 Käyttöalue

Käyttöalueen tulokset on esitetty taulukossa 16, johon on laskettu myös epäpuhtaus-  
lostien keskiarvo, hajonnat ja suhteelliset hajonnat.

Taulukko 16. Käyttöalueanalyysin tulokset ja niille lasketut keskiarvot, hajonnat ja suhteelliset hajonnat

Rinnakkainen	Epäpuhtaustulokset (%)		
	LOQ (0,05 %)	0,20 %	0,21 %
1	0,07	0,22	0,24
2	0,06	0,20	0,24
3	0,07	0,20	0,26
4	NA	0,20	NA
5	NA	0,21	NA
6	NA	0,21	NA
<b>Keskiarvo</b>	0,07 %	0,21 %	0,25 %
<b>SD</b>	0,0012	0,0060	0,0110
<b>RSD (%)</b>	1,8	2,9	4,4

Epäpuhtaustulokset täyttävät niille asetetut vaatimukset. Menetelmä toimii tällä pitoisuusalueella.

### 7.5 Toistettavuus

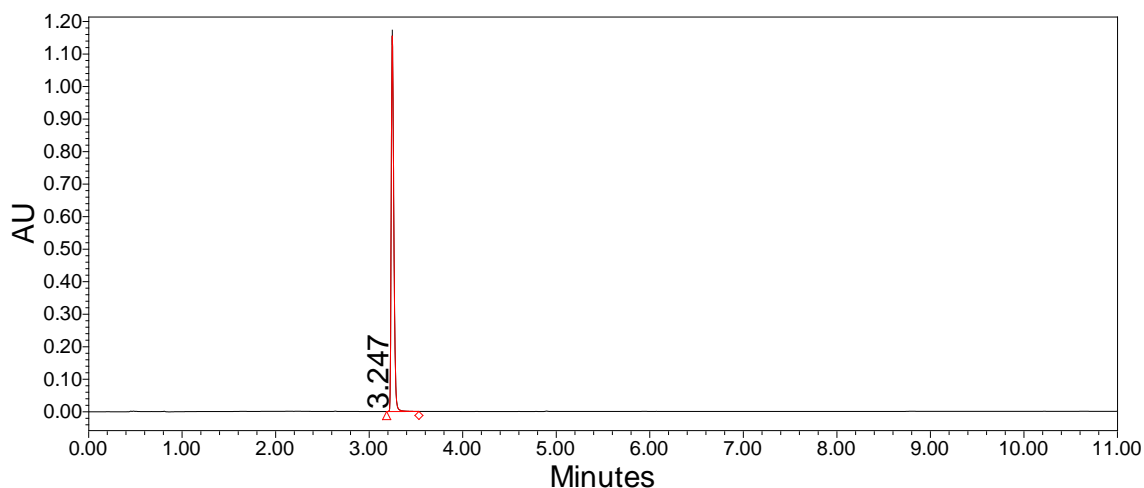
Toistettavuusanalyysiä varten punnittiin lopputuotetta X 6 rinnakkaisnäytettä, jotka analysoitiin menetelmän mukaisesti. Taulukossa 17 on esitetty rinnakkaisnäytteiden pitoisuustulokset ja tulosten keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta.

Taulukko 17. Lopputuote X:n rinnakkaispunnitusten pitoisuustulokset standardin konsentraatioon nähden

	Lopputuote X pitoisuus (%)	Epäpuhtaus Y pitoisuus (%)	Tuntemattomat epäpuhtaudet pitoisuus (%)
<b>Liuos 1</b>	100,70	<0,05	0,061
<b>Liuos 2</b>	100,88	<0,05	0,062
<b>Liuos 3</b>	100,68	<0,05	0,061
<b>Liuos 4</b>	100,67	<0,05	0,060
<b>Liuos 5</b>	100,74	<0,05	0,063
<b>Liuos 6</b>	100,78	<0,05	0,060
<b>Keskiarvo</b>	100,74	-	0,061
<b>SD</b>	0,078	-	0,0013
<b>RSD (%)</b>	0,077	-	2,1

Toistettavuus näytteen pitoisuudessa ja sen epäpuhtauksissa on hyvä, ja kaikki hyväksymiskriteerit täyttyivät. Näytteessä epäpuhtauden pitoisuutta ei voinut kvantitoida, koska sen pitoisuus näytteessä on alle kvantitointirajan. Näytteessä olevan tuntemattoman epäpuhtauden toistettavuus on myös hyvä ja täyttää hyväksymiskriteerit.

Kuvassa 8 on esitetty tämän analyysin kromatogrammi. Toistettavuutta mitattiin vielä rinnakkaisien punnitusten pääpiikin retentioajasta. Taulukossa 18 on esitetty mittaustulokset ja laskettu niiden keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta retentioajoille.



Kuva 8. Toistettavuusanalyysin kromatogrammi ensimmäisestä rinnakkaispunnituksesta. Kuvassa lopputuotteen X piikki.

Retentioajan toistettavuustulokset ovat myös hyvät. Tulokset kertovat, että menetelmä tuottaa hyvin tasaisia tuloksia. Tämä analyysi ei ollut alkuperäisessä suunnitelmassa, mutta se oli helppo saada muista tuloksista, niin se otettiin vahvistamaan muita saatuja toistettavuustuloksia ja osoittamaan menetelmän soveltuvuus retentioaikaan perustuvaan identifiointia varten.

Taulukko 18. Lopputuote X:n rinnakkaispunnitusten pääpiikin retentioajat, ja niille laskettu keskiarvo, hajonta ja suhteellinen hajonta

Yhdiste	Retentioaika (min)
Liuos 1	3,247
Liuos 2	3,246
Liuos 3	3,247
Liuos 4	3,248
Liuos 5	3,247
Liuos 6	3,249
<b>Keskiarvo</b>	3,247
<b>SD</b>	0,001
<b>RSD (%)</b>	0,032



## 7.6 Epäpuhtauden kvantitointiraja

Analyysissä tehtiin menetelmäohjeen mukainen kvantitointirajaliuos epäpuhtausstandardista. Tämä kvantitointirajaliuos inisoitiin kuusi kertaa saaden näin rinnakkaistuloksia. Taulukossa 19 on esitetty saadut tulokset ja laskettu keskiarvot, keskihajonnat ja suhteelliset keskihajonnat.

Taulukko 19. Epäpuhtauden kvantitointiraja injektioiden pinta-ala ja S/N-tulokset

	<b>Area</b>	<b>S/N</b>
Injektio 1	1240	42
Injektio 2	1300	43
Injektio 3	1336	44
Injektio 4	1389	44
Injektio 5	1256	42
Injektio 6	1250	42
<b>Keskiarvo</b>	1295	43
<b>SD</b>	58,503	0,826
<b>RSD</b>	4,5	1,9

Tulokset täyttävät asetetut hyväksymiskriteerit.

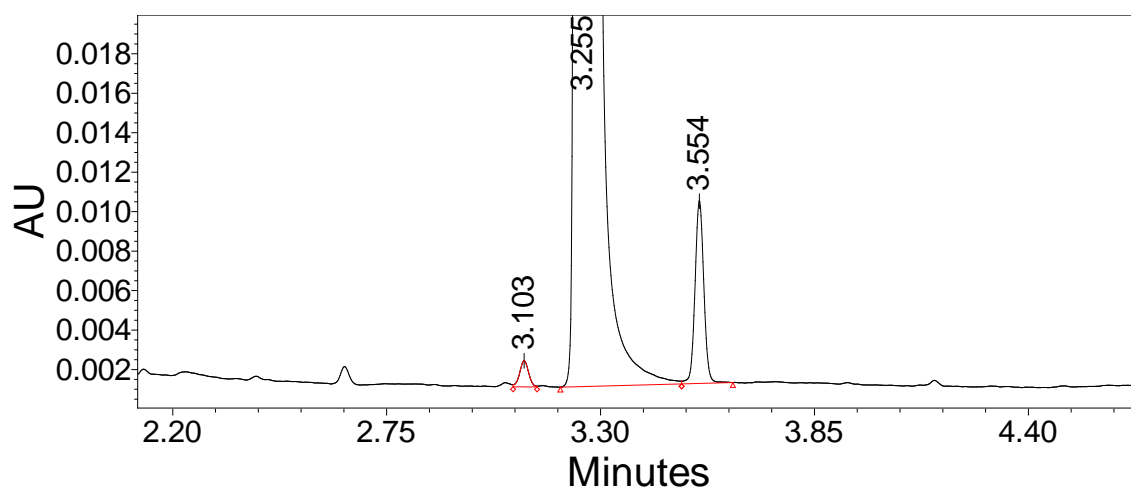
## 7.7 Robustisuus

Asetetut hyväksymiskriteerit täyttyivät kaikissa injektiossa, kuten taulukko 20 osoittaa. Resoluutiot on laskettu lopputuote X:lle ja Y:lle niitä edeltävään piikkiin nähden. Lopputuote X:lle edeltävä piikki on hapetushajoamistuotteen piikki (RRT 0,95) ja epäpuhtaus Y:n edeltävä piikki on lopputuotteen X piikki.

Taulukko 20. Robustisuusanalyysin injektioiden tulokset

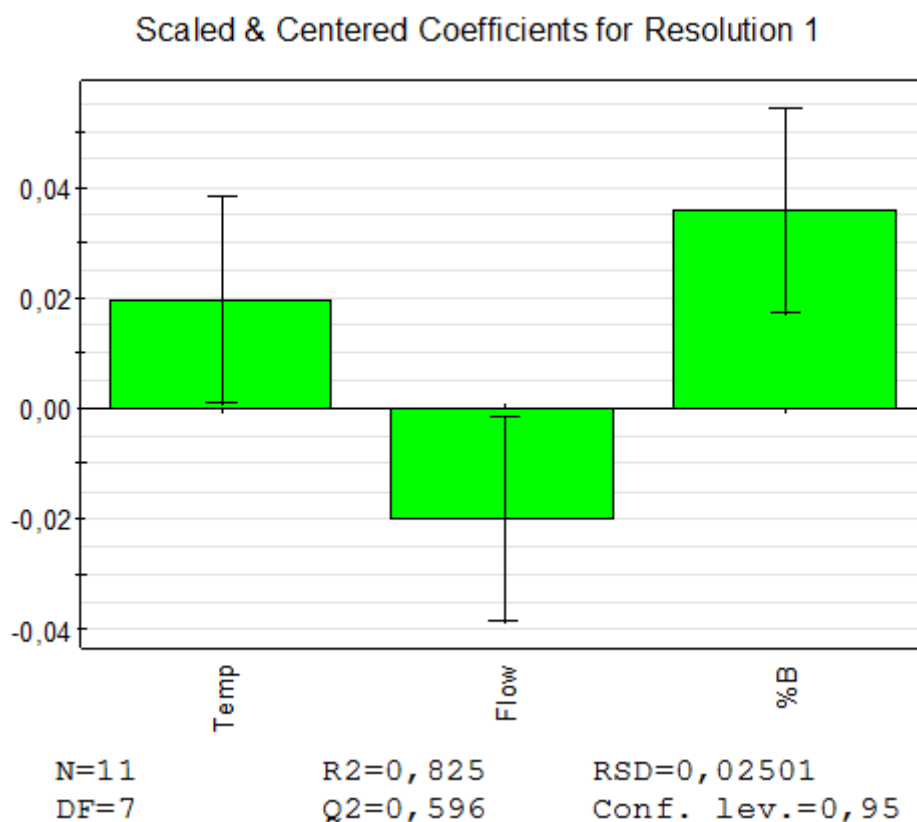
	Loppuotuote X resoluutio	Epäpuhtaus Y resoluutio	Loppuotuote X häntimistekijä
Injektio 1	3,2961	6,2220	1,3534
Injektio 2	3,3517	6,2503	1,3513
Injektio 3	3,2892	6,7887	1,3425
Injektio 4	3,2786	6,8240	1,3486
Injektio 5	3,3694	6,4398	1,3674
Injektio 6	3,4477	6,4616	1,3647
Injektio 7	3,3336	6,9076	1,3484
Injektio 8	3,3853	6,9651	1,3500
Injektio 9	3,3095	6,6689	1,3523
Injektio 10	3,3114	6,6621	1,3491
Injektio 11	3,3174	6,6417	1,3482
Injektio 12	2,2959	6,8507	1,3418

Kuvassa 9 on lähennetty kuva injektiosta 11, missä näkyy loppuotuote X:n, epäpuhtaus Y:n ja hapetushajoamistuotteen piikit.



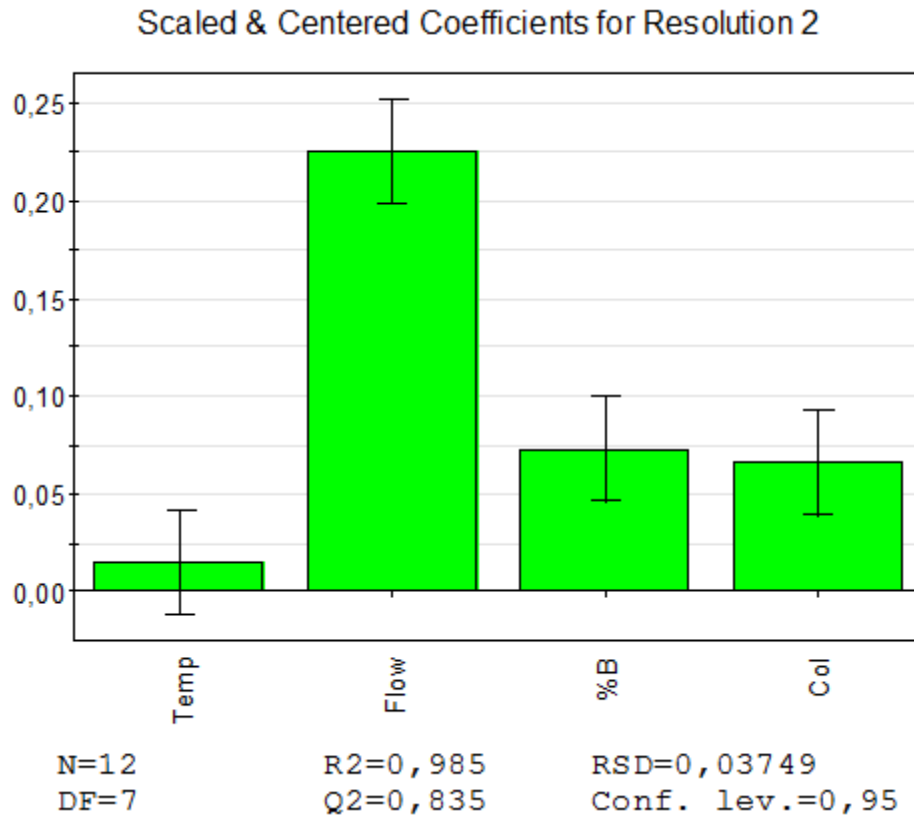
Kuva 9. Lähennetty kromatogrammi robustisuus analyysin injektiosta 11. Loppuotuote X:n piikki retentioajalla 3,255; epäpuhtaus Y 3,554 ja hapetushajoamistuote 3,103.

Koetulosten perusteella luotu malli osoittaa, että liikkuvan faasin B:n määrä gradientin alussa on merkittävin vaikutus lopputuote X:n piikkien resoluutiolle, joka on esitetty kuvassa 10.



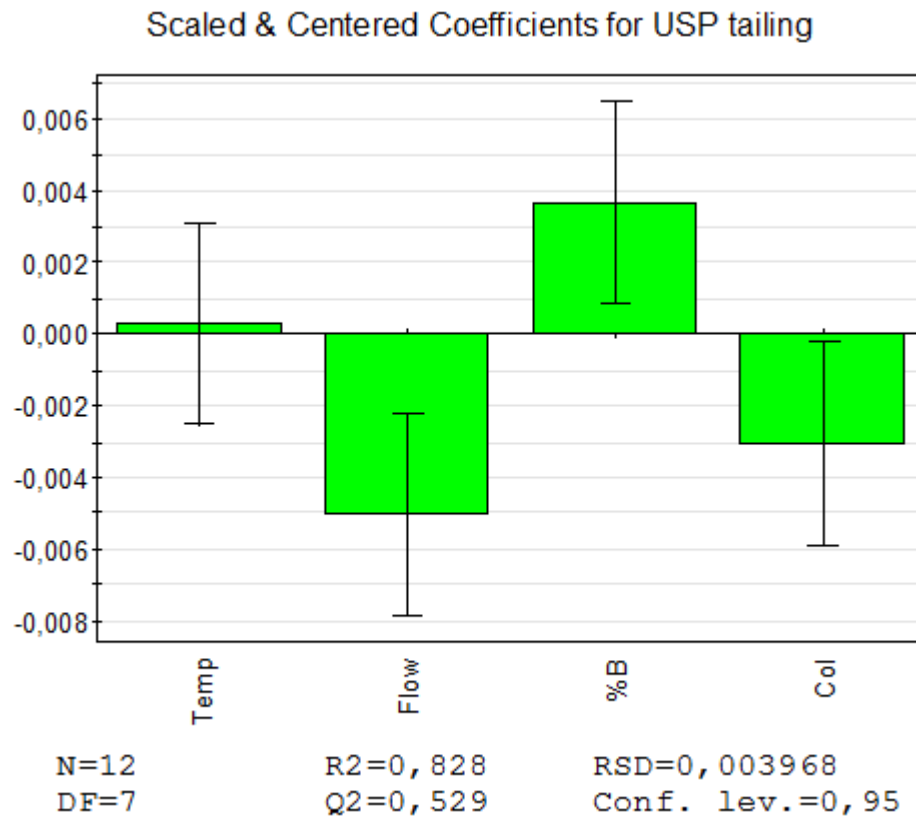
Kuva 10. Lopputuote X:n resoluutiomalli. Liikkuvan faasin B:n prosenttiosuus gradientin alussa on positiivinen vaikutus lopputuote X:n resoluutioon. Kolonnin lämpötilan ja virtausnopeuden vaikutus on lähes merkityksetön

MODDE®:n mallin mukaan virtausnopeudella, liikkuvan faasin prosenttimäärällä sekä uudella kolonnilla on positiivinen vaikutus lopputuote X:n epäpuhtauksien erotuskykyyn, mikä tarkoittaa, että jokaisen tekijän lisääntyminen johtaa parempaan erottelukykyyn. Nämä tulokset ovat kuvassa 11.



Kuva 11. Epäpuhtaus Y:n epäpuhtausresoluutiomalli. Virtausnopeudella on suurin positiivinen vaikutus epäpuhtauden resoluutioon. Kolonnin ja liikkuvan faasin B:n prosentiosuudella gradientin alussa on lievä positiivinen vaikutus.

Mallin mukaan liikkuvan faasin virtausnopeudella on huomattava negatiivinen vaikutus lopputuote X:n häntimistekijään, mikä osoittaa, että virtausnopeuden kasvu vähentää häntimistekijää. Liikkuvan faasin B prosenttimäärällä gradientin alussa on merkittävä positiivinen vaikutus vasteeseen, kuten kuvassa 12 on osoitettu. Kolonninlämpötilan sekä kolonnin vaikutus on vähäinen häntimistekijään.



Kuva 12. Malli lopputuote X:n häntimistekijästä. Mallin mukaan virtausnopeudella on merkittävä negatiivinen vaikutus ja liikkuvan faasin B:n prosenttiosuudella gradientin alussa lievä positiivinen vaikutus lopputuote X:n häntimistekijään.

Tutkitut vasteet täyttävät testissä niille asetetut vaatimukset, ja siksi menetelmää voidaan pitää vakaana.

## 8 Yhteenveto

Validointi onnistui halutulla tavalla. Validoitavalla menetelmällä pystytään tunnistamaan epäpuhtaudet lopputuote X:stä. Menetelmä on lineaarinen lopputuote X:n ja epäpuhtaus Y:n epäpuhtausalueella. Sen on myös osoitettu olevan toistettava.

Validoitavat parametrit täyttyivät jokaisessa analyysissä, joihin niitä oli asetettu, mikä kertoo menetelmän toimivuudesta. Analyysissä käytettävien liuosten todettiin säilyvän huoneenlämmössä 9 päivän ajan.

Koesuunnittelussa tutkittiin kolonnin lämpötilan, virtausnopeuden, liikkuvan faasin prosenttimäärä gradientin alussa ja kolonnierien vaikutusta lopputuote X:n ja epäpuhtaus Y:n resoluutioon sekä lopputuote X:n häntimistekijään. Analyysissä todettiin menetelmän olevan vakaa parametrien tutkitulla alueella.

Menetelmää pystyisi kehittämään, vaikka se tämän validoinnin perusteella toimii luotettavasti. Suurin yksittäinen kehityskohde on ajoliuospuskuri, joka tällä hetkellä on konsentraatioiltaan moninkertaisesti vahvempi kuin laite- ja kolonnivalmistajat suosittelevat. Tästä voi koitua pidemmällä aikavälillä ongelmia. Ongelmista suurin on laitteen tai kolonnin tukkeutuminen, jos puskurissa oleva suola pääsee kiteytymään HPLC:n kapilareihin tai kolonnin sisälle. Tästä johtuen kolonnin ja laitteen pesuun tulisi kiinnittää huomiota käytön jälkeen tai kun keskeyttää analyysin.

Kokonaisuudessaan työ onnistui ja se saatiin tehtyä aikataulussa ilman merkittäviä vaikeuksia. Validoitu menetelmä todettiin toimivaksi ja sitä käytetään jatkossa lopputuote X:n analyyseissä.

## Lähteet

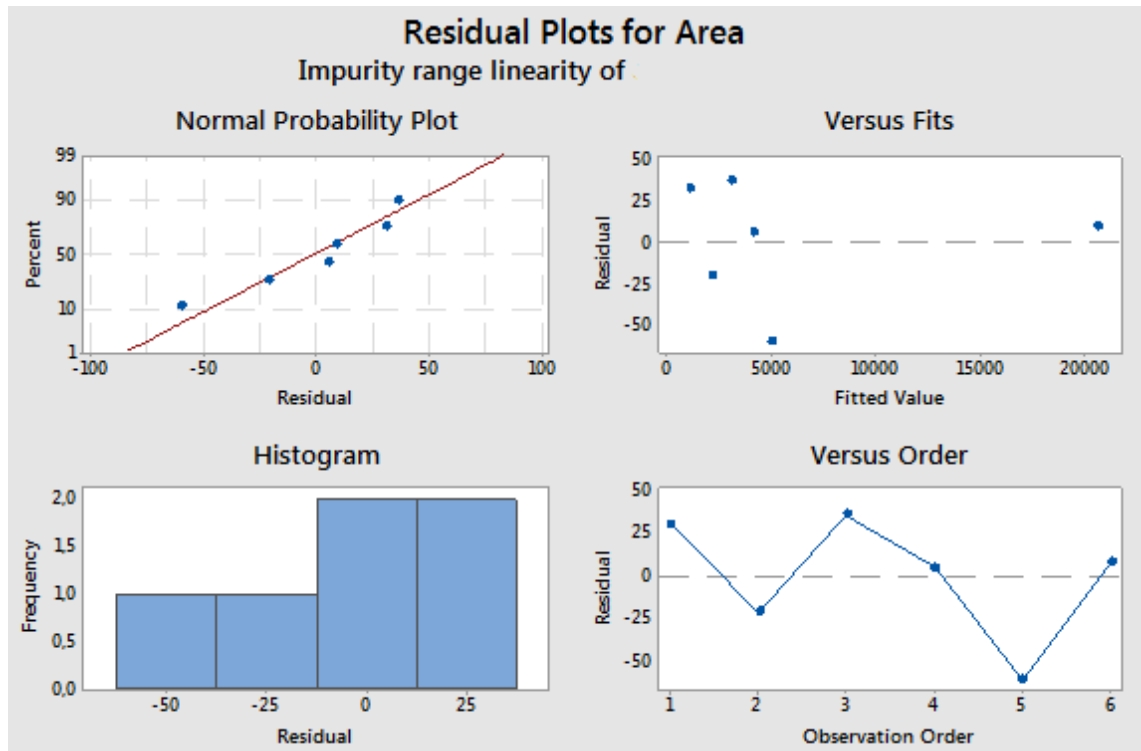
- 1 Orionin virstanpylväitä 1970-luvulla. Verkkoaineisto. Orion Oyj. <<https://www.orion.fi/konserni/orionin-vuosisata/1970/orionin-virstanpylvaita-1970-luvulla/>>. Luettu 2.11.2019
- 2 Fermion's history. Verkkoaineisto. Fermion Oy. <<https://www.fermion.fi/about-us/fermions-history/>>. Luettu 2.11.2019
- 3 GMP Question and Answers. Verkkoaineisto. WHO. <[https://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/quality\\_assurance/gmp/en/](https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/gmp/en/)>. Luettu 2.11.2019
- 4 What is GMP? Verkkoaineisto. ISPE <<https://ispe.org/initiatives/regulatory-resources/gmp/what-is-gmp#>>. Luettu 2.11.2019
- 5 GMP-todistukset. Verkkoaineisto. Fimea. <<https://www.fimea.fi/valvonta/gmp-todistukset>>. Luettu 2.11.2019
- 6 Vakioitu toimintaohje: Työhygieeninen ohjelma, työhygieeniset raja-arvot ja altistumisriskin hallinta. 2019. Yrityksen sisäinen dokumentti. Orion Oyj.
- 7 Eriksson L.; Johansson E.; Kettanenh-Wold N.; Wikström C.; Wold S. 2000. Design of Experiments, principles and applications. Umeå: MKS Umetrics AB
- 8 Vuolamo, Lotta. 2016. Design of Experiments in the optimization of a coupling reaction between a substituted propargyl bromide and a terminal alkyne. Pro gradu -tutkielma. Aalto-yliopisto.
- 9 Harris, Daniel C. 2015. Quantitative Chemical Analysis. 9th ed. W.H. Freeman & Co Ltd. Basingstoke, United Kingdom.
- 10 Merrit, Willard, Settle, Dean. 1981. Instrumental Methods of Analysis. 6th ed. Litton Educational Publishing.
- 11 Band, Peak and Band Spreading. Verkkoaineisto. Waters. <[https://www.waters.com/waters/en\\_FI/Chromatographic-Bands%2C-Peaks-and-Band-Spreading/nav.htm?cid=134803614&locale=en\\_FI](https://www.waters.com/waters/en_FI/Chromatographic-Bands%2C-Peaks-and-Band-Spreading/nav.htm?cid=134803614&locale=en_FI)>. Luettu 7.9.2019
- 12 How Does High Performance Liquid Chromatography Work?. Verkkoaineisto. Waters. <[http://www.waters.com/waters/en\\_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055](http://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055)>. Luettu 8.9.2019.

- 13 The Promise of Small Particles. Verkkoaineisto. Waters. <[https://www.waters.com/waters/en\\_FI/The-Promise-of-Small-Particles/nav.htm?cid=134804750&locale=en\\_FI](https://www.waters.com/waters/en_FI/The-Promise-of-Small-Particles/nav.htm?cid=134804750&locale=en_FI)>. Luettu 8.9.2019.
- 14 Jaarinen, Soili & Niiranen, Jukka. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita Prima Oy.
- 15 The LCGC Blog: Diode Array Detector Settings - Five Minutes to Change Your Chromatography Forever. Verkkoaineisto. <<http://www.chromatographyonline.com/lcgc-blog-diode-array-detector-settings-five-minutes-change-your-chromatography-forever>>. Luettu 9.9.2019.
- 16 Analyysimenetelmien validointi. 2017. Yrityksen sisäinen dokumentti. Orion Oyj.
- 17 Quality Guidelines. Verkkoaineisto. ICH. <<https://www.ich.org/page/quality-guidelines>> Luettu 8.9.2019



## Standardisوران residuaalitukset lopputuotteelle X

Lopputuotteen X lineaarisuusanalyysin residuaalitukset..



## Standardisuoran residuaalitulokset epäpuhtaudelle Y

Epäpuhtauden Y lineaarisuusanalyysin residuaalitulokset.

