

Opinnäytetyö Turku AMK

Prosessi ja materiaalitekniikka

2020

Eric Wong

HPLC-MENETELMIEN KEHITYS TUNNETUILLE PIENMOLEKYYLEILLE

Eric Wong

HPLC-ANALYYSIMENETELMIEN KEHITYS TUNNETUILLE PIENMOLEKYYLEILLE

Opinnäytetyössä oli tavoitteena kehittää HPLC-analyysimenetelmät toimeksiantajan määrittämille pienmolekyyleille: karprofeenille, meloksikaamille sekä dipyronille. Valitut pienmolekyylit ovat yleisesti käytössä olevia kipulääkkeiden vaikuttavia aineita. Kehitettävillä menetelmillä olisi tavoitteena määrittää näytteiden lääkeainepitoisuudet. Näyteanalyysit on rajattu tämän opinnäytetyön ulkopuolelle. Opinnäytetyö tehtiin PreclinApps Oy:lle, joka on lääkeaineiden formulaatioon ja prekliinisiin tutkimuksiin erikoistunut yritys.

Opinnäytetyön teoriaosuudessa esitellään kunkin aineen ominaisuuksia, niiden käyttöä sekä HPLC-analytiikkaa yleisesti.

Menetelmien kehitystä varten tutkittiin kirjallisuutta mahdollisten olemassa olevien menetelmien löytämiseksi. Kirjallisuuden perusteella päädyttiin ratkaisuun, jossa kolmen aineen menetelmät käyttivät samaa Agilentin Eclipse Plus käänteisfaasikolonnia (C18). opinnäytetyössä saatiin kehitettyä onnistuneesti käyttökelpoiset menetelmät karprofeenille sekä meloksikaamille. Dipyronin menetelmän kehityksestä luovuttiin alkutestausten jälkeen.

ASIASANAT:

HPLC, menetelmä, kromatografia, kipulääke, karprofeeni, meloksikaami, dipyroni

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Chemical and material engineering

2020| 39

Eric Wong

DEVELOPMENT OF HPLC METHODS FOR KNOWN SMALL MOLECULES

The main goal of this thesis was to develop HPLC methods for three different small molecules, carprofen, meloxicam and dipyrone, that are suitable for quantitative analysis of samples. These small molecules are commonly used analgesics. The sample analysis was not part of the project. This study was commissioned by PreclinApps Oy, a small company which specializes in drug formulation and preclinical research. The commissioner requested three simple and reliable HPLC methods which were to work without gradient, i.e isocratically.

In the theory part of this thesis the properties and uses of the substances, as well as the HPLC analyses applied are introduced and explained in more detail.

Relevant literature was studied to find possible existing methods for the substances. The methods were to be applicable with the equipment and resources available at Turku University of Applied Sciences. As a result, all substances and methods used the same column (Agilent Eclipse Plus (C18)). The commission was partially successful and methods for both carprofen and meloxicam were developed. The HPLC-method tested in this study for metamizole sodium monohydrate failed, and development was abandoned by the commissioner.

KEYWORDS:

HPLC, method, chromatography, analgesics, carprofen, meloxicam, dipyrone

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO	6
1 JOHDANTO	1
2 TUTKITTAVAT MOLEKYYLIT	2
2.1 Karprofeeni	2
2.2 Meloksikaami	3
2.3 Dipyroni	4
3 ANALYYSIMENETELMÄ	5
3.1 Kromatografia	5
3.2 HPLC	6
4 KOKEELLINEN OSUUS	10
4.1 Käytetyt laitteet ja reagenssit	10
4.2 Karprofeenin standardit ja kokeellinen osuus	11
4.3 Meloksikaamin standardit ja kokeellinen osuus	12
4.4 Dipyronin standardit ja kokeellinen osuus	14
5 TULOKSET	16
5.1 Karprofeenin tulokset	16
5.2 Meloksikaamin tulokset	20
5.3 Dipyronin tulokset	25
POHDINTA	30
LÄHTEET	32

KAAVAT

Kaava 1. Karprofeenin retentiotekijän kaava ja lasku 10 µg/ml standardille.	20
---	----

KUVAT

Kuva 1. Karprofeenin rakennekaava, $C_{15}H_{12}ClNO_2$.	2
Kuva 2. Meloksikaamin rakennekaava, $C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$.	3
Kuva 3 Dipyronin rakennekaava, $C_{13}H_{16}N_3O_4S \cdot Na \cdot H_2O$	4
Kuva 4. HPLC laitteiston kaaviokuva.	7
Kuva 5. Analyseissä käytetty HPLC laitteisto.	10
Kuva 6. Karprofeenin 10 µg/ml standardin kromatogrammi.	16
Kuva 7. Karprofeenin standardit 10 µg/ml, 12,5 µg/ml sekä 25 µg/ml kromatogrammit päällekkäin.	17
Kuva 8. Karprofeenin standardisuora.	19
Kuva 9. Karprofeenin jäännöskuvaaja	19
Kuva 10. Karprofeenin 10 µg/ml retentiotekijä kromatogrammi.	20
Kuva 11. Meloksikaamin 5 µg/ml standardin kromatogrammi.	21
Kuva 12. Meloksikaamin eluentin kromatogrammi.	21
Kuva 13. Meloksikaamin 2,5 µg/ml, 5 µg/ml sekä 25 µg/ml standardit kromatogrammit päällekkäin.	22
Kuva 14. Meloksikaamin standardisuora, jossa 0,05 µg/ml 2 injektio on jätetty pois.	24
Kuva 15. Meloksikaamin Jäännöskuvaaja.	25
Kuva 16. Dipyronin eluentin kromatogrammi.	25
Kuva 17. Dipyronin 1,25 µg/ml standardin kromatogrammi.	26
Kuva 18. Dipyronin 125 µg/ml standardin kromatogrammi.	26
Kuva 19. Dipyronin Standardit 125 µg/ml, 250 µg/ml ja 500 µg/ml päällekkäin.	27
Kuva 20. Dipyronin standardisuora.	29

TAULUKOT

Taulukko 1. Karprofeenin HPLC-menetelmän tiedot.	11
Taulukko 2. Karprofeenin standardien valmistus.	12
Taulukko 3. Meloksikaamin HPLC-menetelmän tiedot.	13
Taulukko 4. Meloksikaamin standardit.	14
Taulukko 5. Dipyronin HPLC-menetelmän tiedot.	14
Taulukko 6. Dipyronin standardit.	15
Taulukko 7. Karprofeenin intergointiparametrit.	17
Taulukko 8. Karprofeenin standardien absorbanssit.	18
Taulukko 9. Karprofeenin jäännöskuvaajan data	19
Taulukko 10. Meloksikaamin integrointiparametrit.	23
Taulukko 11. Meloksikaamin standardien pinta-ala sekä CV%.	23
Taulukko 12. Meloksikaamin jäännöskuvaajan data.	24
Taulukko 13. Dipyronin integrointiparametrit.	27
Taulukko 14. Dipyronin standardien pinta-ala sekä CV%.	28

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO

Lyhenne	Lyhenteen selitys (Lähdeviite)
CPF	<i>Carprofen</i> , karprofeeni
DIP	<i>Dipyrone</i> , dipyroni
HPLC	<i>High Performance liquid chromatography</i> , korkean erotuskyvyn nestekromatografia (Jaarinen & Niiranen, 2008)
MLX	<i>Meloxicam</i> , meloksikaami
NSAID	<i>Non-steroidal anti-inflammatory drug</i> , ei steroidinen tulehduskipulääke (Zoetis, 2013)
CV%	<i>Coefficient of variation</i> , variaatiokerroin
Termi	Termin selitys
Kromatografia	Menetelmä, jolla voidaan erottaa aineita toisistaan niiden vuorovaikutusten perusteella (Jaarinen & Niiranen, 2008)
Liikkuva faasi	Ajoliuos, eluentti (Jaarinen & Niiranen, 2008)
UV/Vis	<i>Ultraviolet/visible</i> , Ultravioletti/näkyvä

1 JOHDANTO

Eläinten lääkinnässä käytetään kipulääkkeitä erilaisten leikkausoperaatioiden jälkeen, kipulääkkeitä voi joutua käyttämään pidempiä ajanjaksoja, jolloin niiden antaminen oraalisesti tai kudoksenalaisesti neulalla säännöllisesti voivat olla epäkäytännöllisiä.

PreclinApps Oy:n avainosaamista on lääkeannosteluteknologia ja erityisesti tasaisesti lääkeainetta vapauttavat implantit eläinten lääkintään. Lääkeannostelu ja tasaisesti vapauttavat implantit vaativat lääkeaineen tarkan kvantitatiivisen pitoisuuden tuntemisen valmisteessa. PreclinApps käyttää tutkimuksiin sekä tuotteittensa pitoisuuksien määrittämiseen pääasiassa korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC).

HPLC:n avulla näytteestä voidaan erottaa eri komponentit toisistaan kolonnin stationääri- ja liikkuvan faasin komponenttien vuorovaikutusten avulla. Tuloksena saadaan tutkittavalle aineelle tyypillinen kromatogrammi. Standardien avulla voidaan laskea pitoisuuksia tuotteista ja tuntemattomista näytteistä sekä voidaan seurata aineen vapautumista. Työn tarkoituksena oli kehittää HPLC-menetelmät karprofeenille, meloksikaamille sekä dipyroneille, jotka ovat eläinlääkityksessä käytettyjä kipulääkkeitä. Tavoitteena oli, että HPLC-menetelmät olisivat isokraattisia, luotettavia ja sopisivat yrityksen rutiinimaiseen käyttöön.

Tutkimus tehtiin Turun ammattikorkeakoulun Lemminkäisenkadun toimipisteen laboratoriossa PreclinApps Oy:n toimeksiannosta

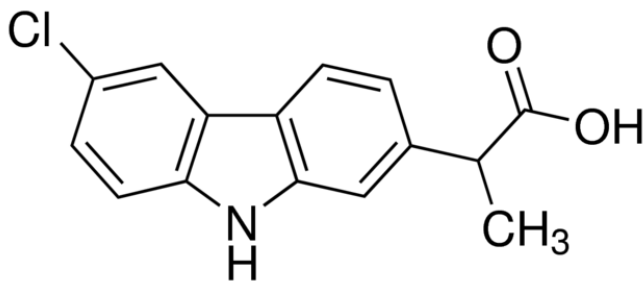
2 TUTKITTAVAT MOLEKYYLIT

2.1 Karprofeeni

Karprofeeni on eläinlääkinnässä käytetty ei steroidinen tulehduskipulääke, non-steroidal anti-inflammatory drug, (NSAID), joka kuuluu propionihappoihin (Zoetis, 2013). Karprofeenia käytetään eläinten kipulääkityksessä (Sigma-Aldrich, Carprofen 2018). Kipulääkitystä käytetään muun muassa leikkausten yhteydessä preoperatiivisesti tai postoperatiivisesti (Zoetis, 2013). Karprofeenin annostelu voidaan suorittaa oraalisesti tabletteina tai nahanalaisesti esimerkiksi ruiskulla (Zoetis, 2013).

NSAID lääkkeen kipua lievittävä vaikutus perustuu sen kykyyn inhiboida syklogenaaseja. Karprofeenin teho perustuu sen kykyyn inhiboida pääasiassa COX-2 syklo-oksigenaasientsyymin toimintaa (Zoetis, 2013).

Karprofeeni on valkoinen hienojakoinen jauhe, sen molekyylimassa on 273,72 g/mol. Sen liukoisuus +25 °C veteen on olematon, mutta se liukenee etanoliin, sekä liukoisuus dimetyylisulfoksidiin on 20 mg/ml. Sulamislämpötila on 195-199 °C. (Sigma-Aldrich, Carprofen, 2018) (Zoetis, 2013), (Berger, ym.,.1975)



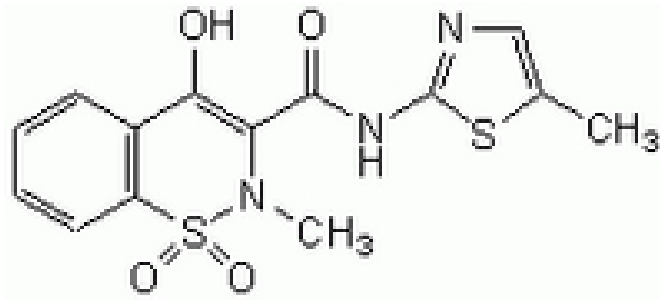
Kuva 1. Karprofeenin rakennekaava, C₁₅H₁₂ClNO₂.

2.2 Meloksikaami

Meloksikaamia käytetään ei-steroidisena tulehduskipulääkkeenä (NSAID) eläinten lääkinnässä. Meloksikaami kuuluu oksikaami-ryhmään. (Merck, 2008)

Meloksikaami vaikuttaa tulehdusta alentavasti, kipua lievittävästi, sekä sillä on havaittu inhiboivan peräsuolisyöpäsolujen kasvua *in vitro* olosuhteissa. Meloksikaami inhiboi pääpainoisesti COX-2-entsyymiä, kuten karprofeeni. (Merck, 2008) (Boehringer Ingelheim, 2012)

Meloksikaamin molekyylipaino on 350,40 g/mol ja sen liukenevuus dimetyylisulfoksidissa on 10 mg/ml (Sigma-Aldrich, Meloxicam, 2019). Työssä käytetty meloksikaami oli keltaista hienojakoista jauhetta.



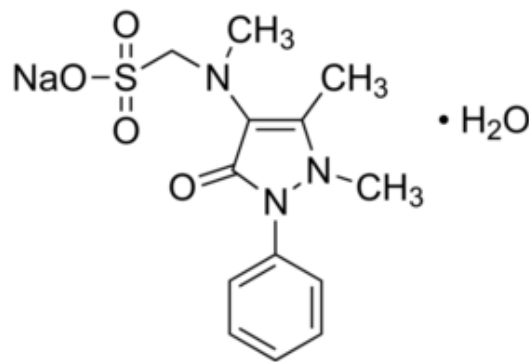
Kuva 2. Meloksikaamin rakennekaava, C₁₄H₁₃N₃O₄S₂.

2.3 Dipyroni

Dipyroni tunnetaan myös nimillä metamitsoli, metamitsolinatriummonohydraatti, (engl. Metamizole sodium monohydrate). Metamitsoli on potentti tulehduskipulääke, jota käytetään eläinten lisäksi ihmisillä. Dipyroni kuuluu karprofeenin ja meloksikaamin tavoin NSAID tulehduskipulääkkeisiin. (Sigma, metamizole sodium hydrate, 2019), (Jasiecka A, ym., 2014),

Dipyroni inhiboi syklo-oksigenaasia kuten muut tulehduskipulääkkeet, dipyronin antipyreettinen sekä analgeettinen vaikutus perustuu E_2 prostaglandiinin synteesin estoon. E_2 synteesillä on rooli kivun aistimuksessa keskus- sekä ääreishermostossa. Dipyroni on nopeasti imeytyvää, ja sillä on noin 100 % absoluuttinen hyötyosuus. (FaunaPharma)

Dipyronin molekyylipaino on 351,35 g/mol ja $pK_a = -1,2$. (Sigma, metamizole sodium hydrate, 2019) (Marra, ym., 2014)



Kuva 3 Dipyronin rakennekaava, $C_{13}H_{16}N_3O_4S \cdot Na \cdot H_2O$

3 ANALYYSIMENETELMÄ

3.1 Kromatografia

Kromatografialla tarkoitetaan menetelmää, jolla voidaan erottaa aineita toisistaan niiden vuorovaikutusten perusteella. Seoksen komponentit erottuvat kromatografiakolonnissa tai kromatografialevyllä. Siellä komponenttien jakautuminen tapahtuu stationääri-faasin ja liikkuvan faasin välillä. Liikkuvassa faasissa olevat eri komponentit tarttuvat eri voimakkuuksilla stationäärifaasiin ja kulkeutuvat sieltä eri nopeuksilla liikkuvan faasin mukana näin eri komponentit erottuvat analysoitaviksi. Kolonnin stationäärifaasi on usein valmistettu kiinteästä aineesta kuten silikasta, joka on pakattu kolonniin. Silika on yleinen HPLC-kolonnien materiaali. Stationäärifaasi voi myös olla viskoosia nestettä, joka on kemiallisesti sidottu kiinteään kantajaan (silika). (Jaarinen & Niiranen, 2008) (Harris, 2010)

Kromatografian tyyppejä on monenlaisia, yleisesti ne voidaan jakaa kahden liikkuvan faasin olomuodon mukaan: kaasukromatografiaan ja nestekromatografiaan. Nestekromatografiset menetelmät voidaan jakaa niiden erotustavan toimintaperiaatteen mukaan: adsorptio-, partitiio-, ioninvaihto-, eksluusio- ja affiniteettikromatografia. Nestekromatografiassa liikkuvana faasina on neste. (Jaarinen & Niiranen, 2008) (Harris, 2010)

Adsorptiokromatografiassa stationäärifaasi on kiinteä ja nestemäinen liikkuva faasi on käytössä. Liikkuvan faasin yhdisteet adsorboituvat stationäärifaasin pintaan, mitä vahvemmin ne adsorptoituvat sitä hitaammin ne kulkevat kolonnin läpi eli retentoituvat hitaammin. Silikaa voidaan käyttää stationäärifaasin materiaalina adsorptiokromatografiassa. (Harris, 2010)

Partitiokromatografiassa nestemäinen stationäärifaasi on sidottuna kiinteään pintaan, joka on valmistettu yleensä silikasta. Partitiokromatografiassa erottelukyky perustuu liikkuvan- ja stationäärifaasin välisiin poolisuus- ja liukoisuuseroihin. Poolittomat yhdisteet hidastuvat poolittomaan stationäärifaasin ja pooliset yhdisteet puolestaan pooliseen stationäärifaasiin. Partitiokromatografia on yleisin erotusmenetelmistä, jota käytetään HPLC:ssä. (Agilent Technologies, 2016) (Harris, 2010) (Jaarinen & Niiranen, 2008)

Ioninvaihtokromatografiassa analysoidaan ionisoituvia yhdisteitä ja ioneja, ionikromatografia perustuu ioninvaihtoon. Ionikromatografiassa ionit tarttuvat stationäärifaasiin pintaan sähköisillä voimilla. Stationäärifaasissa on kohtia, joissa on varauksia, johon vastakkaismerkkiset ionit kiinnittyvät. Stationäärifaasi on usein hartsista valmistettu. Eluentina käytetään puskuriliuosta, jonka pH:ta säätämällä voidaan vaikuttaa yhdisteiden retentioon. (Jaarinen & Niiranen, 2008) (Harris, 2010)

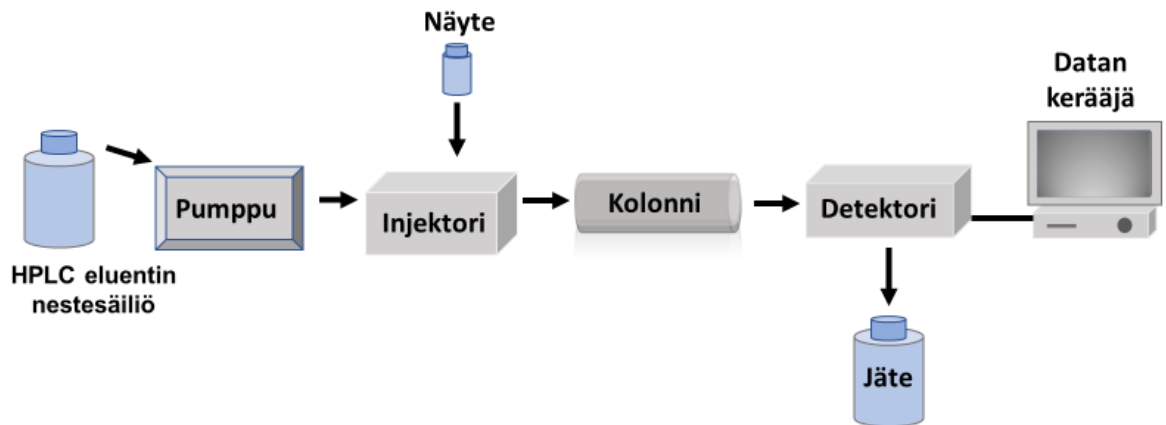
Ekсклюsiokromatografiassa joka tunnetaan myös geelisuodatuskromatografiana, stationäärifaasi on huokoinen, nimensä mukaan geelimäinen ja sen erottelukyky perustuu molekyylien kokoon. Ekсклюsiokromatografiassa liikkuvassa faasissa olevat suuremmat molekyylit eivät pääse tunkeutumaan syvälle huokosiin kokonsa puolesta tai ne eivät mahdu ollenkaan huokosiin ja retentoituvat nopeammin. Sitä vastoin pienemmät molekyylit tunkeutuvat stationäärifaasin huokosiin ja retentoituvat hitaammin. (Harris, 2010)

Affiniteetikromatografia on selektiivisin kromatografian lajeista. Siinä käytetään spesifistä ainetta, jolla stationäärifaasi on pinnoitettu. Pinnoite on spesifinen ja se vaikuttaa tiettyyn aineeseen sitoen sen stationäärifaasiin, jolloin muut ei halutut aineet huuhtoutuvat pois. Affiniteetikromatografiaa käytetään yleisesti proteiinien puhdistuksessa, jossa käytetään proteiinin vasta-ainetta pinnoitteessa, johon sitten haluttu proteiini kiinnittyy. Kiinnittynyt proteiini voidaan irrottaa eluentin pH:n muutoksella tai ionivahvuutta muuttamalla. (Harris, 2010) (Bio-Rad, 2019)

3.2 HPLC

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) eli korkean erotuskyvyn nestekromatografia on yleisesti käytetty analyysitekniikka, jota on käytetty epäorgaanisten sekä orgaanisten yhdisteiden analyysiin. HPLC on korvaamaton työkalu monien suurikokoisten orgaanisten molekyylien analysoinnissa. Näitä ovat aminohapot, lipidit, muut suuret biologiset molekyylit sekä lääkeaineet. HPLC:ssä käytetään korkeaa painetta, jonka avulla voidaan puskea liikkuvaa faasia (ajoliuosta eli eluenttia) suljetun kolonnin läpi. Kolonnissa oleva stationäärifaasi hidastaa tiettyjen molekyylien liikettä, jotka kulkevat liikkuvassa faasissa kolonnin stationäärifaasin läpi. Kolonnin hienojakoiset partikkelit yhdistettynä korkeaan paineeseen tuottavat hyvän erotuskyvyn. HPLC laitteistoon kuuluu:

pumppu, nestesäiliö(t), detektori, injektori, kaasunpoistaja, kolonniuuni, kolonni, kapillaarit, sekä tietokone, jolla voidaan ohjata laitteistoa ja käsitellä tuloksia. HPLC laitteistosta kaaviokuva (kuva 4). (Jaarinen & Niiranen, 2008) (Harris, 2010)



Kuva 4. HPLC laitteiston kaaviokuva.

HPLC:n rajoitteet ovat, että näyte on saatava liukoiseen muotoon siten että ne eivät reagoisi keskenään, sekä herkän yleisdetektorin puute. (Jaarinen & Niiranen, 2008)

Kolonniuunin avulla voidaan lämmittää kolonni haluttuun lämpötilaan, lämpötilan nosto alentaa useimmissa tapauksissa eluentin viskositeettia ja näin ollen se saattaa alentaa kolonniin kohdistuvaa painetta mahdollistaen isomman virtausnopeuden. Kolonniuunilla säädetty lämpötila parantaa myös toistettavuutta, sillä huoneen lämpötila voi vaihdella. (Harris, 2010)

HPLC:ssä tyypillisiä kolonneja ovat käänteisfaasikolonnit, ioninvaihtokolonnit, normaali-faasikolonnit. Stationäärifaasi eli kolonnin pakkausmateriaali vaihtelee käyttötarkoituksen mukaan, mutta hienojakoinen, pyöreäpartikkelinen huokoinen silika on yleisin tukimateriaali, jota käytetään kolonnin stationäärifaasissa. Useimmat silikat eivät kestä vahvasti emäksisiä olosuhteita ($\text{pH} > 8$), sillä se liukenee vahvassa emäksessä. Kolonnien suojaamiseksi voidaan käyttää esikolonnia, joka suojaa varsinaista kolonnia epäpuhtauksilta ja antaa sille pidemmän käyttöiän. Nestekromatografiakolonnit ovat tyypillisesti

3-30 cm pituisia teräsputkia, joissa sisähalkaisija vaihtelee 2-8 mm välillä. Kolonnin stationäärifaasin partikkelikoko vaihtelee 3-10 μm väliltä, yleensä partikkelikoko kasvaa kolonnin pituuden mukaan. Kolonneja kehitetään entistä tehokkaammiksi kehittämällä entistä pienempiä partikkeleja. (Jaarinen & Niiranen, 2008) (Harris, 2010)

Normaalifaasikolonnissa stationäärifaasi on voimakkaasti poolinen ja tämän takia käytettävän eluentin on oltava poolitonta. Eluenttina käytetään vedettömiä ja poolittomia liuottimia esimerkiksi heksaania ja sen seoksia. Mitä poolisempi näytemolekyyli sitä enemmän se tarttuu pooliseen stationäärifaasiin, jolloin se viipyy kolonnissa pidempään. Eluentin poolisuutta voidaan lisätä laittamalla esimerkiksi dikloorimetaania eluenttiin, tällä voidaan vaikuttaa erotukseen ja retentioaikoihin. Normaalikolonnin stationäärifaasimateriaali voi olla silikaa tai aluminaa (alumiinioksidia). (Jaarinen & Niiranen, 2008) (Harris, 2010)

Käänteisfaasikolonnissa tilanne on päinvastainen kuin normaalifaasikolonnissa, stationäärifaasi kolonnin sisällä on pooliton, käytettävä eluentti on poolista. Mitä poolittomampi näytemolekyyli sitä enemmän se tarttuu poolittomaan stationäärifaasiin, jolloin se viipyy kauemmin kolonnissa. Käänteisfaasikolonne soveltuu poolittomille näytemolekyylielle. Stationäärifaasi on valmistettu voimakkaasti poolittomasta materiaalista, esimerkiksi oktadekyylisilaanista (ODS, C18). (Jaarinen & Niiranen, 2008)

HPLC:ssä käytetään nestemäistä liikkuvaa faasia, jotka tunnetaan myös eluenttina (ajoliuos). Eluentti koostuu yleensä vähintään kahdesta komponentista, ja niiden välisiä suhteita muuttamalla voidaan etsiä analyysiolosuhteet, joissa eri komponentit saadaan eroteltua toisistaan. Eluentin on kyettävä myös liuottamaan tutkittava näyte, jotta se voidaan analysoida. Eluentin viskositeetti vaikuttaa virtausnopeuteen, mitä pienempi viskositeetti ja virtausnopeus, sitä vähemmän painetta kohdistuu kolonniin. Käänteisfaasikromatografiassa poolisimmat näytekomentit eluoituvat ensin, eluentin poolisuutta lisäämällä voidaan lisätä poolittomampien komponenttien retentioaikaa. (Jaarinen & Niiranen, 2008)

Kun analysoidaan happoja tai emäksiä, nyrkkisääntönä on, että eluenttiliuos on puskuroidava siten että liuoksen pH on -1 pienempi tutkittavan hapon pK_a -arvo, jolloin haposta yli 90 % on sähköisesti neutraalissa muodossa. Vastaavasti emästen kohdalla pH:n on oltava tarpeeksi korkea. Kun analysoitavan aineen mukaan on päätelty sopiva pH-arvo

eluentille, valitaan sopiva puskuriyhdiste, jolla päästään tavoiteltuun arvoon. Puskuriyhdisteen pK_a -arvon pitää olla lähellä liuoksen pH-arvoa, yleensä ± 1 yksikön sisällä tavoitellusta pH-arvosta. (Jaarinen & Niiranen, 2008)

Gradienttiajota voidaan käyttää silloin kun näytteen eri komponenttien poolisuudet ovat hyvin erilaisia. Poolisimmat näytekomponentit eluoituvat ensin, eivätkä erotu sellaisella eluentilla, jolla myöhemmin tulevat yhdisteet saataisiin kohtuullisessa ajassa ulos kolonnista. Gradienttiajossa eluentin koostumusta muuttamalla ajon aikana voidaan erottaa yhdisteet toisistaan. (Jaarinen & Niiranen, 2008)

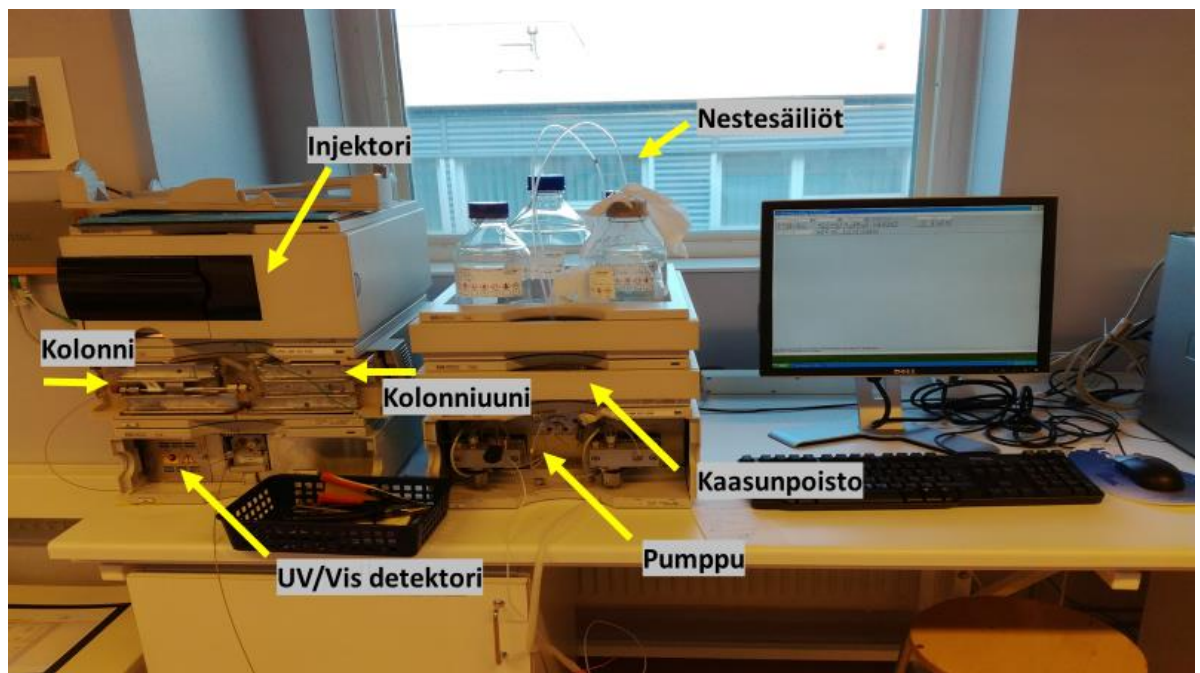
Eluentti on hyvä suodattaa ennen käyttöä sillä liuottimessa olevat mahdolliset partikkelit tukkivat kolonnin nopeasti, jolloin paine nousee ja kolonni voi vahingoittua. Yleensä eluentti suodatetaan 0,22-0,45 μm membraanisuodattimella. Mitä pienempi stationääri-faasin partikkelikoko sitä pienempi huokoista membraanisuodatinta käytetään. Membraanien valinnassa on hyvä muistaa valita membraani materiaali, joka ei liukene liuottimeen ja huokosen maksimikoko voi olla noin 10 % stationääri-faasin partikkelikoosta. Eluenttiin liuennut ilma tai ilmakuplat voivat olla HPLC-laitteistolle vahingollisia, sillä ne voivat häiritä pumppausta sekä detektointia, tämän vuoksi eluentista on poistettava ilma esimerkiksi ultraäänihaudetta käyttämällä. (Jaarinen & Niiranen, 2008)

HPLC-detektoreita on monentyyppisiä eri käyttötarkoituksiin, jokaisella on omat hyvät puolensa ja huonot puolensa. UV/Vis detektori on vaihtoehdoista paras, silloin kun tutkittavilla yhdisteillä on absorptio UV-säteilyn tai näkyvän valon alueella. UV/Vis detektoreita on kolmea eri tyyppiä ja niissä on: suodatin, monokromaattori tai diodrivä. Suodattimella toimiva detektori mittaa tiettyä aallonpituutta, ja eri suodatinta käyttämällä voidaan vaihtaa aallonpituutta, suodattimella toimivat laitteet ovat vanhempaa perua ja ovat väistymässä. Monokromaattorilla toimiva detektori pystyy vaihtamaan aallonpituutta ja pystyy kattamaan koko UV-alueen sekä osan näkyvää valoa. Esimerkiksi deuterium lampulla emissio on 190-600 nm alueella, ja mittausaallonpituus on portaattomasti säädettävissä tältä väliltä. Valtaosa detektoreista on monokromaattorilla toimivia vaihtelevaa aallonpituuteen kykeneviä detektoreita. Diodrivillä toimiva detektori pystyy mittaamaan UV/Vis aallonpituusalueen samanaikaisesti koko ajon ajan. HPLC-detektorista saatava signaali, piikin korkeus sekä pinta-ala noudattavat Lambert-Beerin lakia. (Jaarinen & Niiranen, 2008) (Harris, 2010)

4 KOKEELLINEN OSUUS

4.1 Käytetyt laitteet ja reagenssit

Laitteistona oli Agilentin 1100 sarjan HPLC-laitteisto, joka koostui nestesäiliöstä, pumpusta, kaasunpoistajasta, kolonniuunista, injektorista, UV/Vis detektorista, kolonnista sekä niitä ohjaavasta tietokoneyksiköstä. Laitteistosta kuva (kuva 5).



Kuva 5. Analyseissä käytetty HPLC laitteisto.

Analyysivaakaa käytettiin standardeissa käytettävien lääkeaineiden punnitsemiseen. pH-mittari viritettiin työkerran alussa aina kun tehtiin eluenttia meloksikaamille. Standardilaimennosten pipetoinnit tehtiin Biohitin mekaanisilla pipeteilla. Kaikille kolmelle tutkitavalle yhdisteille käytettiin Agilent Eclipse plus C18 3,5 μm 4,6x150 mm käänteisfaasikolonnia, ajoissa ei ollut esikolonnia käytössä.

Työssä käytetyt karprofeeni ja meloksikaami olivat Hyper Chemiltä. Karprofeenin puhtaus oli 99,3 % ja meloksikaamin vastaavasti 98,007 % valmistajan erätietojen mukaan. Dipyrone oli Sigma-Aldrichin Dipyrone monohydrate VETRANAL™, analytical standardia. Eluenteihin käytetyt liuottimet (vesi, asetonitrili ja metanoli) olivat HPLC laatua.

4.2 Karprofeenin standardit ja kokeellinen osuus

Karprofeenin menetelmän kehityksessä hyödynnettiin Wu:n julkaisua (Wu, A, ym. 2001). Eluenttina oli asetonitriili: vesi: jäätikkaliuos tilavuussuhteessa 50:49:1.

Karprofeenille tehtiin kantaliuos, jossa oli karprofeenia 100 µg/ml punnitsemalla 20 mg karprofeenia mahdollisimman tarkasti 200 ml mittapulloon, karprofeeni liuotettiin aluksi käyttämällä pientä määrää eluenttia ja lopuksi mittapullo täytettiin viivaan asti. 100 µg/ml kantaliuosta laimentamalla tehtiin muut standardit. Kaikkien liuosten liuottimena käytettiin eluenttia. Karprofeenistandardeille tehtiin taulukon 1 mukainen laimennossarja. Standardit suodatettiin käyttämällä 0,45 µm PTFE 13 mm ruiskusuodattimia. Työssä oli tavoitteena tehdä standardisuora laajalle pitoisuusalueelle. Työssä käytetty karprofeenin HPLC-menetelmä oli taulukon 1 mukainen.

Taulukko 1. Karprofeenin HPLC-menetelmän tiedot.

Kolonni	Agilent Eclipse plus C18 3,5 µm 4,6x150 mm käänteisfaasikolonni
Eluentti	Asetonitriili: vesi: jäätikkaliuos tilavuussuhteessa 50:49:1
Injektio-tilavuus	10 µl
Kolonniuunin lämpötila	+25 °C
Aallonpituus	260 nm
Ajoaika	10 min
Virtausnopeus	1 ml/min
Mitattu paine	106 bar
Retentioaika	7 min

Jokainen standardiliuos injektoidiin kaksi kertaa. Kolonniuunin lämpötilaksi säädettiin +25 °C paremman toistettavuuden vuoksi. Mittausaallonpituudeksi valittiin 260 nm, jota käytettiin Wu:n tutkimuksissa, koska sillä oli absorbanssi tällä aallonpituudella (Wu, A, ym. 2001). Ajon ajaksi 10 min, tämä määräytyi kolonnin koeajolla, ja 10 minuutin jälkeen standardi oli poistunut kolonnista. Karprofeenin retentioaika oli 7 min. Menetelmässä käytettiin isokraattista ajoa. Lopuksi standardien/näytteiden jälkeen kolonnin pesu 50:50 metanoli/vesi pesuliuksella 1 ml/min virtauksella 30 min ajan.

Taulukko 2. Karprofeenin standardien valmistus.

Nro	STD (µg/ml)	V (laimennettava tilavuus) (ml)	Pipetoitava STD (µg/ml)	Mittapullon koko (ml)
1	100	0	0	200
2	75	3,75	100	5
3	50	2,5	100	5
4	25	1,25	100	10
5	12,5	0,625	100	5
6	10	0,5	100	5
7	7,5	0,5	75	5
8	5	0,5	50	5
9	2,5	0,5	25	5
10	1,25	0,5	12,5	5
11	0,25	0,5	2,5	5

4.3 Meloksikaamin standardit ja kokeellinen osuus

Meloksikaamille sovellettiin Araynen tutkimusta (Arayne M, ym. 2005). Eluenttina oli metanoli: vesiliuos, tilavuussuhteessa 70:30, joka oli säädetty pH 2,60 väkevällä (85 %) fosforihapolla. Työssä käytetty meloksikaamin HPLC-menetelmä oli taulukon 3 mukainen.

Meloksikaamille tehtiin 25 µg/ml kantaliuos 200 ml mittapulloon punnitsemalla 5 mg meloksikaamia pulloon, joka on erittäin pieni määrä punnittavaksi. Meloksikaami liuotettiin aluksi käyttämällä pientä määrää eluenttia, ja täytettiin viivaan asti lopuksi eluentilla. 200 ml mittapulloa käytettiin, jotta meloksikaami liukenesi kokonaan sen huonon liukenevuuden vuoksi (Sigma-Aldrich, Meloxicam, 2019). Kantaliuosta käyttämällä tehtiin taulukon 4 mukaiset standardit. Standardit suodatettiin 0,2 µm PTFE ruiskusuodattimilla. Kaikki liuokset tehtiin eluenttiin.

Taulukko 3. Meloksikaamin HPLC-menetelmän tiedot.

Kolonne	Agilent Eclipse plus C18 3,5 µm 4,6x150 mm käänteisfaasikolonne
Eluentti	Metanoli: vesiliuos, tilavuussuhteessa 70:30, joka oli säädetty pH 2,60 väkevällä (85 %) fosforihapolla
Injektio­tilavuus	10 µl
Kolonne­uunin lämpötila	+25 °C
Aallon­pituus	230 nm
Ajoaika	8 min
Virtaus­nopeus	1 ml/min
Mitattu paine	166 bar
Retentio­aika	4 min

Jokainen standardiliuos injektointiin kaksi kertaa paitsi systeemitestiä varten 2,5 µg/ml kuusi kertaa. Kolonne­uunin lämpötilaksi säädettiin +25 °C paremman toistettavuuden vuoksi. Mittausaallon­pituudeksi valittiin 230 nm, jota käytettiin Araynen tutkimuksissa ja meloksikaamilla oli absorbanssi tällä aallon­pituudella. Ajon ajaksi 8 min, tämä määräytyi kolonne­n koeajolla, ja 8 minuutin jälkeen standardi oli poistunut kolonne­sta eikä muita piikkejä näkynyt sen jälkeen. Menetelmässä käytettiin Isokraattista ajoa. Meloksikaamin retentio­aika oli noin 4 min. Lopuksi standardien/näytteiden jälkeen kolonne­n pesu 50:50 metanoli/vesi pesuliuksella 1 ml/min virtauksella 30 min ajan.

Taulukko 4. Meloksikaamin standardit.

Nro	STD (µg/ml)	V (laimennettava tilavuus) (ml)	Mitä STD Pipetoidaan (µg/ml)	Mittapullon koko (ml)
1	25	0	0	200
2	12,5	2,5	25	5
3	5	1	25	5
4	2,5	1	25	10
5	1,25	0,5	12,5	5
6	0,5	0,5	5	5
7	0,25	0,5	2,5	5
8	0,125	0,5	1,25	5
9	0,05	0,5	0,5	5

4.4 Dipyronin standardit ja kokeellinen osuus

Menetelmän kehityksessä sovellettiin Hongin tutkimusta (Hong, J, 2004). Eluenttina käytettiin metanoli:vesi-liuosta tilavuussuhteessa 60:40, johon lisätään 1 ml jäätikkää (99,79 %) litraa kohden 60:40 metanoli:vesiliuosta. Työssä käytetty dipyronin HPLC-menetelmä oli taulukon 5 mukainen. Dipyronille tehtiin 1000 µg/ml kantaliuos, josta tehtiin taulukon 6 mukainen laimennossarja. Standardit suodatettiin lopuksi 0,2 µm PTFE ruiskusuodattimilla.

Taulukko 5. Dipyronin HPLC-menetelmän tiedot.

Kolonni	Agilent Eclipse plus C18 3,5 µm 4,6x150 mm käänteisfaasikolonni
Eluentti	Metanoli:vesiliuosta tilavuussuhteessa 60:40, johon lisätään 1 ml jäätikkää (99,79 %) litraa kohden 60:40 metanoli:vesiliuosta
Injektio-tilavuus	10 µl
Kolonniuunin lämpötila	+25 °C
Aallonpituus	231 nm
Ajoaika	7 min
Virtausnopeus	0,8 ml/min
Mitattu paine	142 bar
Retentioaika	2 min

Injektioiden määrä oli kolme standardia kohden paitsi 125 µg/ml standardista tehtiin kuuden injektion systeemitesti. Kolonniuunin lämpötilaksi säädettiin +25 °C paremman toistettavuuden vuoksi. Mittausaallonpituudeksi valittiin 231 nm, koska dipyronilla oli absorptanssi tällä aallonpituudella (Hong, J, 2004). Ajon ajaksi 7 min, tämä määräytyi kolonnin koeajolla, ja 7 minuutin jälkeen standardi oli poistunut kolonnista eikä muita komponentteja näkynyt. Menetelmässä käytetty ajo oli isokraattinen. Dipyronin retentioaika noin 2 min. Lopuksi kolonnin standardien/näytteiden jälkeen pesu 50:50 metanoli/vesi pesuliuosella 1 ml/min virtauksella 30 min ajan.

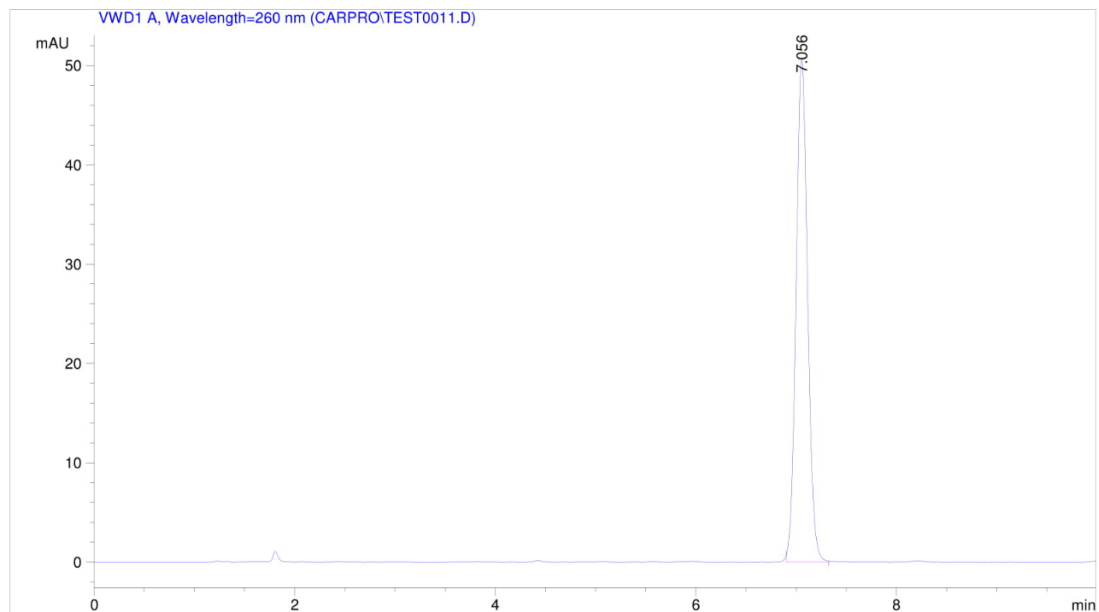
Taulukko 6. Dipyronin standardit.

nro	STD (µg/ml)	V (laimennettava tilavuus) (ml)	Mitä STD Pipetoidaan (µg/ml)	Mittapullon koko (ml)
1	1 000	0	0	10
2	500	5	1 000	10
3	250	5	500	10
4	125	5	250	10
5	50	0,5	500	5
6	12,5	0,5	125	5
7	1,25	0,5	12,5	5

5 TULOKSET

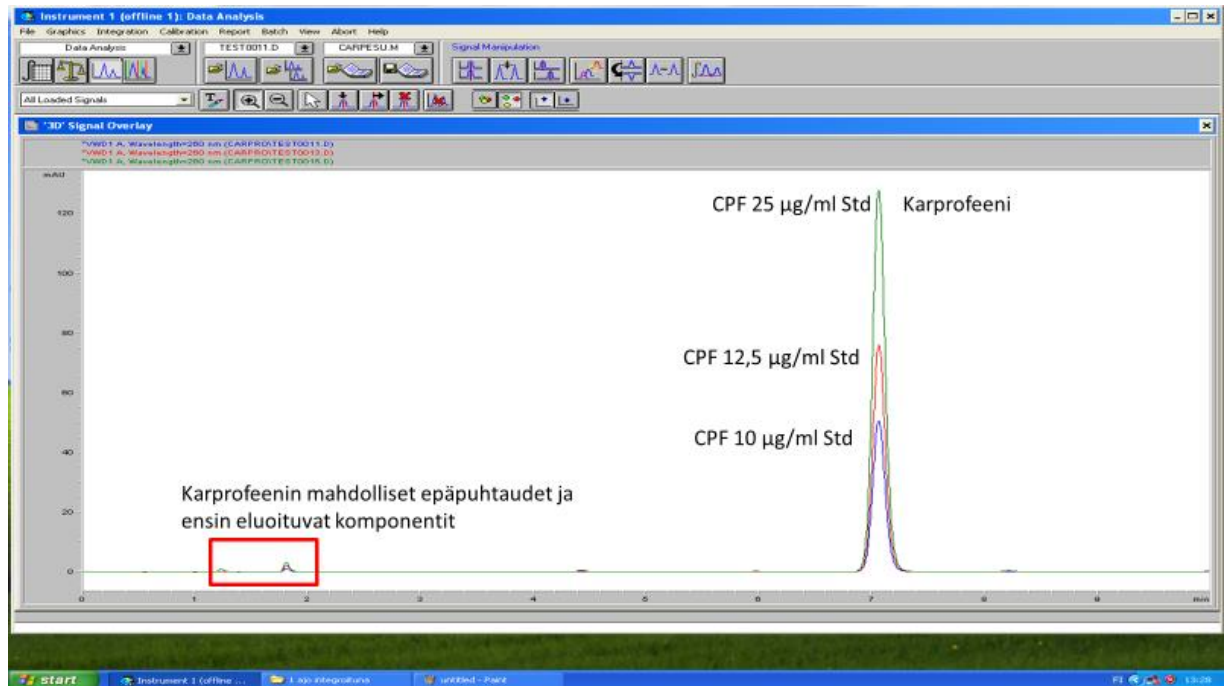
5.1 Karprofeenin tulokset

Kuvassa 6 on tyypillinen kromatogrammi karprofeenille, retentioaika oli noin 7 minuuttia.



Kuva 6. Karprofeenin 10 µg/ml standardin kromatogrammi.

Kromatogrammissa oleva piikki ennen 2 minuuttia (kuva 7) on mahdollisista epäpuhtauksista ja/tai muita nopeammin eluittuvia komponentteja, ja se näyttää kasvavan samassa suhteessa kuin standardit.



Kuva 7. Karprofeenin standardit 10 µg/ml, 12,5 µg/ml sekä 25 µg/ml kromatogrammit päällekkäin.

Karprofeenin standardien integroinnissa käytettiin automaattista integrointia, jonka tarkoitus oli nopeuttaa tulosten käsittelyä, sekä samalla poistaa käsin integroinnista aiheutuvaa käyttäjän käsiälaa ja siten parantaa toistettavuutta. Parametreina käytettiin taulukon 7 mukaisia arvoja.

Taulukko 7. Karprofeenin integrointiparametrit.

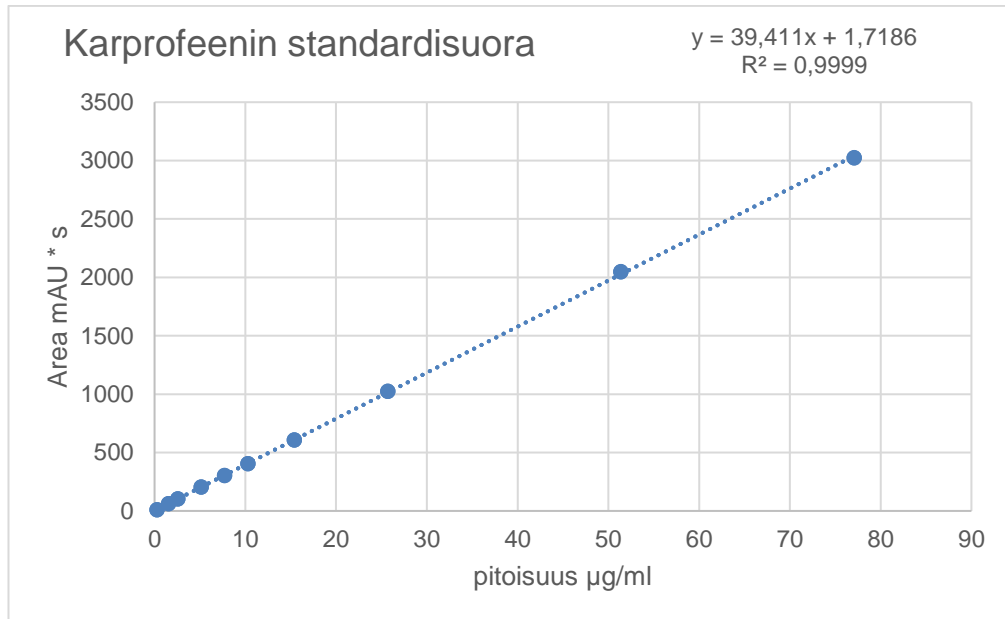
Integration Events	Value
Slope Sensivity	6
Peak Width	0,27
Area Reject	0,2187
Height Reject	0,038
Shoulders	Off

Standardisuoraa varten karprofeenin standardien todellinen pitoisuus laskettiin punnitustulosten ja karprofeenin puhtauden perusteella. Todelliset pitoisuudet ja kromatogrammeista saadut vastaavat pinta-alat näkyvät taulukossa 8.

Taulukko 8. Karprofeenin standardien absorbanssit.

pitoisuus ($\mu\text{g/ml}$)	Pinta-ala inj. 1 (mAU * s)	Pinta-ala inj. 2 (mAU * s)	Pinta-alojen keskiarvo (mAU * s)
0,257	9,998	10,046	10,022
1,542	60,687	60,549	60,618
2,569	101,481	101,437	101,459
5,139	203,403	203,213	203,308
7,708	302,168	302,413	302,290
10,278	404,118	404,064	404,091
15,416	607,083	606,556	606,819
25,694	1024,273	1023,217	1023,745
51,388	2048,967	2046,557	2047,762
77,082	3024,800	3023,136	3023,968
102,776	4706,913	4717,405	4712,159

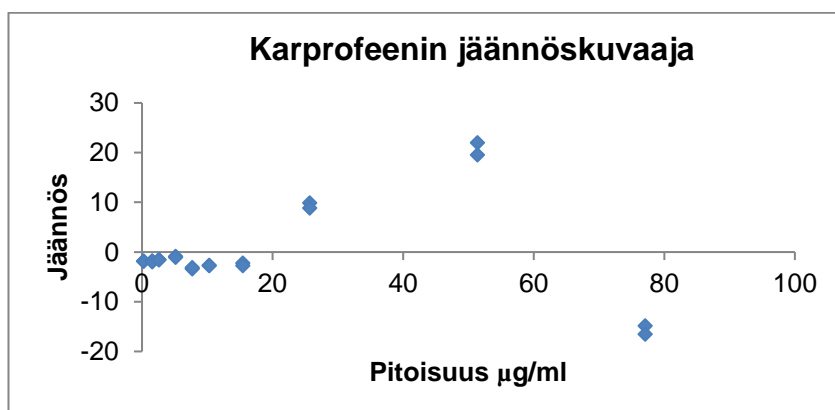
Karprofeenin absorbansseista laadittiin standardisuora (kuva 8). Standardisuorasta saatiin korrelaatiokertoimen neliö $R^2 = 0,9999$ mikä viittaa siihen, että suora on lineaarinen standardien (0,25 $\mu\text{g/ml}$ – 75 $\mu\text{g/ml}$) alueella. Taulukosta 9 jäännöskuvaajan tiedoista nähdään että 95 % luottamustasolla suora kulkee origon kautta, sillä alemman luottamustason arvo on alle nollan ja ylempi arvo on yli nollan. Kuvasta 9 karprofeenin jäännöskuvaajassa pisteet eivät sijoitu tasaisesti suoran molemmille puolille. Pienimmillä pitoisuuksilla pisteet sijoittuvat pääasiassa hieman negatiiviselle puolelle, mutta suuremmilla pitoisuuksilla pisteet sijoittuvat molemmille puolille suoraa. (Miller & Miller, 2010)



Kuva 8. Karprofeenin standardisuora.

Taulukko 9. Karprofeenin jäännöskuvaajan data

	<i>Lower</i> 95%	<i>Upper</i> 95%
Intercept	-4,00868	7,445876
X Variable	39,22739	39,59554

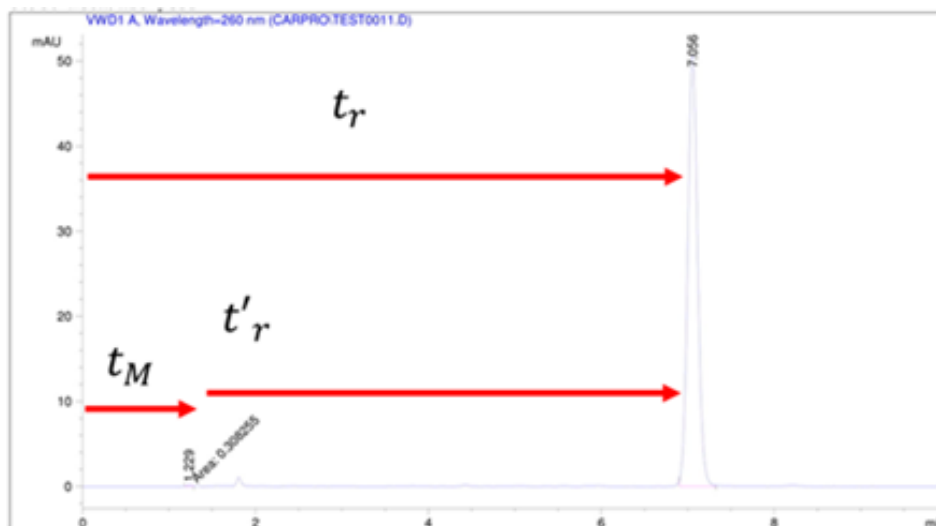


Kuva 9. Karprofeenin jäännöskuvaaja

Karprofeenille laskettiin myös retentiotekijä k 10 µg/ml standardille (kaava 1), joka ilmaisee, kauanko kyseinen aine viipyy stationäärifaasissa. Kuvassa 10 on kromatogrammi merkintöineen, jota käytettiin laskussa.

Kaava 1. Karprofeenin retentiotekijän kaava ja lasku 10 µg/ml standardille.

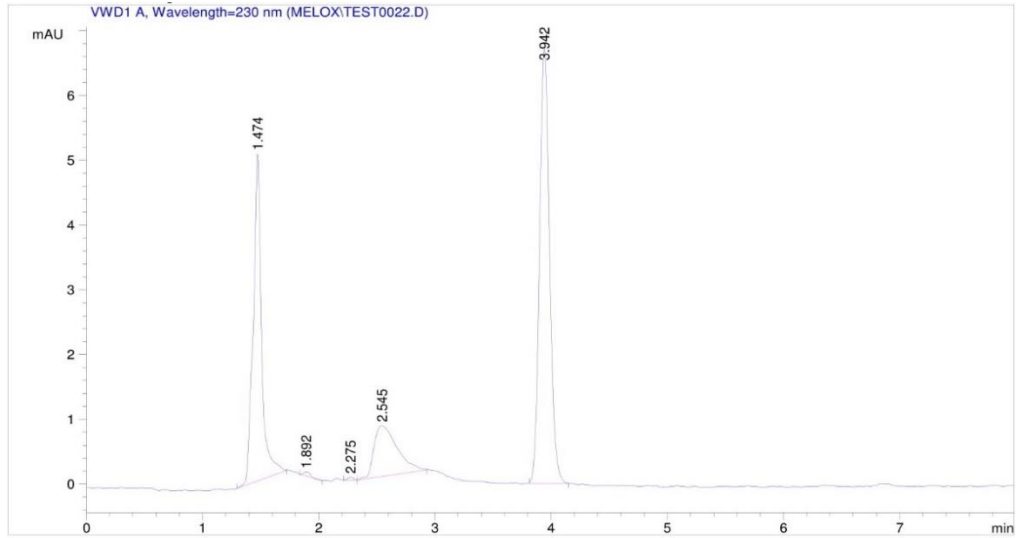
$$k = \frac{t_r - t_M}{t_M} = \frac{7,056 \text{ min} - 1,229 \text{ min}}{1,229 \text{ min}} \approx 4,74$$



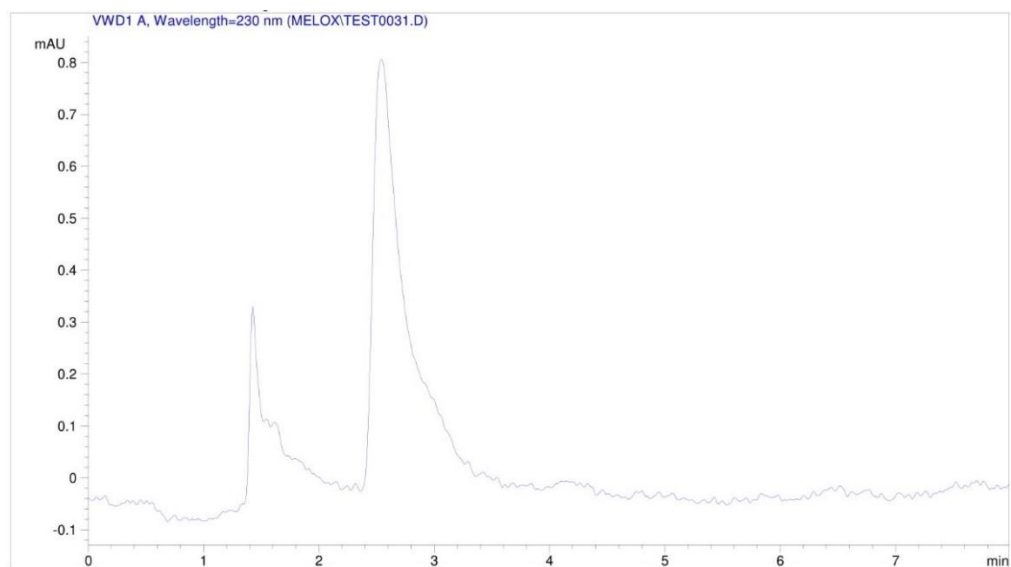
Kuva 10. Karprofeenin 10 µg/ml retentiotekijä kromatogrammi.

5.2 Meloksikaamin tulokset

Kuvassa 11 on tyypillinen kromatogrammi meloksikaamille. Meloksikaamin retentioaika oli noin 4 minuuttia. Noin 1,5 min ja 2,5 min kohdalla tulevat eluentin pohjaviivan piikit (kuva 12). Mahdolliset epäpuhtaudet ja muut aikaisemmin eluoituvat komponentit näyttäisi tulevan myös noin 1,5 min ja 2,5 min kohdalla, kun vertaa 5 µg/ml standardia (kuva 11) ja eluenttia (kuva 12).

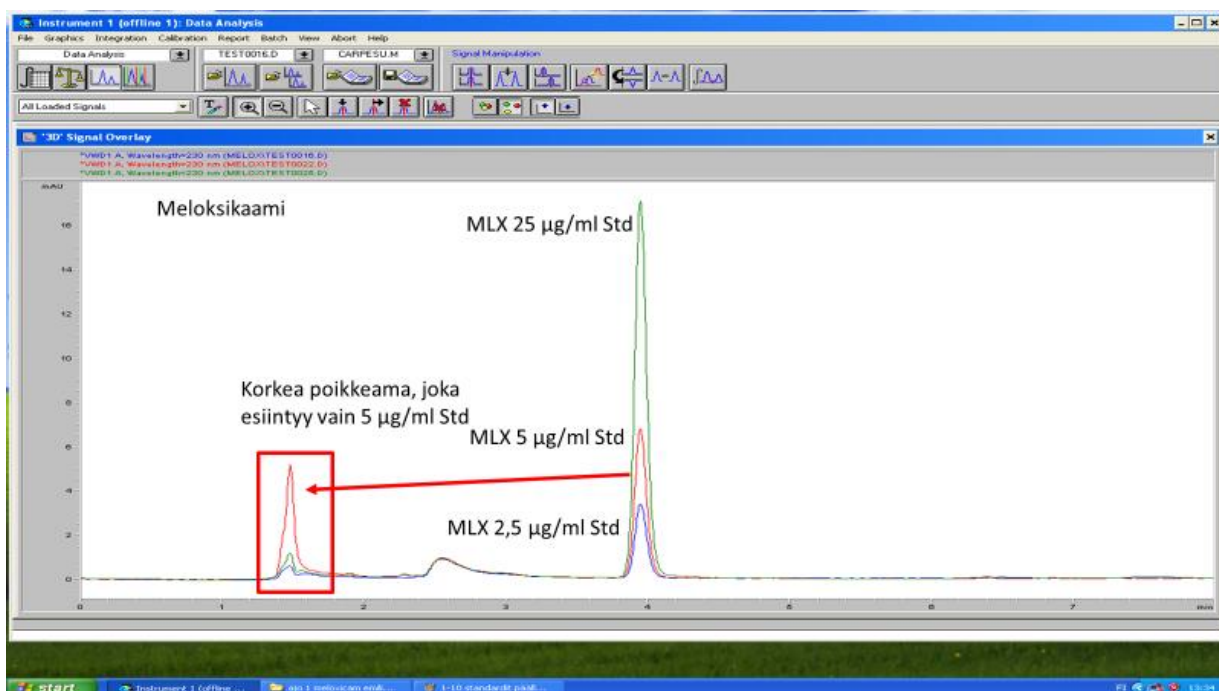


Kuva 11. Meloksikaamin 5 µg/ml standardin kromatogrammi.



Kuva 12. Meloksikaamin eluentin kromatogrammi.

5 µg/ml standardissa on poikkeava 5 (mAU * s) piikki 1,474 min kohdalla (kuva 11), sekä 0,5 µg/ml standardissa, joka tehtiin laimentamalla 5 µg/ml standardista näkyy olevan samanlainen poikkeava piikki samassa ajankohdassa. Muissakin standardeissa esiintyi samassa ajankohdassa piikki mutta ei tässä suhteessa. Tämän mittakaavan piikkiä ei havaittu muissa standardeissa, syyksi voidaan epäillä mahdollista kontaminaatiota 5 µg/ml standardin kohdalla (kuva 11) (kuva 13). On erikoista, että mahdollisen kontaminaation signaali osuu juuri kyseiselle aikaikkunalle eikä näyttänyt aiheuttavan muita piikkejä. Meloksikaamin standardien kromatogrammien päällekkäiskuvassa 25 µg/ml kantaliuoksessa ei havaittu vastaavan korkuista piikkiä (kuva 13), joten kantaliuos ei ole todennäköisesti kontaminoitunut valmistuksessa.



Kuva 13. Meloksikaamin 2,5 µg/ml, 5 µg/ml sekä 25 µg/ml standardit kromatogrammit päällekkäin.

Meloksikaamin ajon kromatogrammit integroitiin taulukon 10 mukaisilla parametreilla. Käsintegrointia vältettiin sen hitauden sekä mahdollisesti heikomman toistettavuuden vuoksi.

Taulukko 10. Meloksikaamin integrointiparametrit.

Integration Events	Value
Slope Sensivity	0,9
Peak Width	0,004
Area Reject	0,0112
Height Reject	0,0127
Shoulders	Off

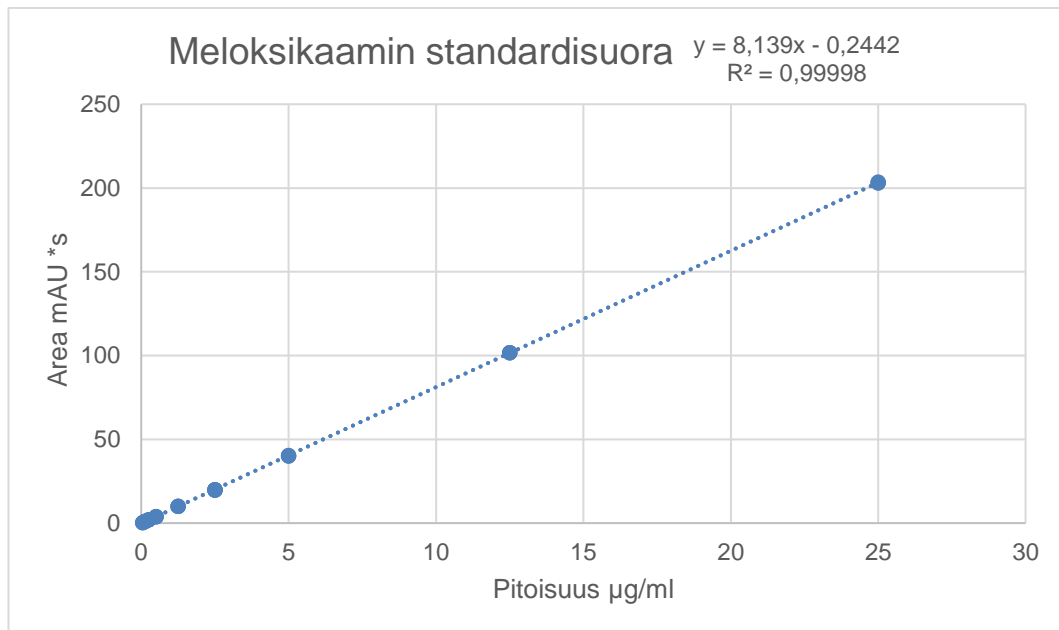
Meloksikaamin standardien pinta-alat (taulukko 11), standardien pitoisuus on laskettu punnitus tuloksen ja reagenssin puhtauden perusteella. Meloksikaamin standardisuoran 0,05 µg/ml toista injektiota sen poikkeavuuden vuoksi.

Taulukko 11. Meloksikaamin standardien pinta-ala sekä CV%.

Standardin pitoisuus (µg/ml)	Injektointien lkm	Pinta-alojen keskiarvo (mAU * s)	s	CV%
0,05	3	0,3628	0,0007	0,1910
0,125	3	0,9385	0,0500	5,3298
0,25	3	1,9553	0,0115	0,5856
0,5	3	3,8353	0,0456	1,1893
1,25	3	10,0138	0,0193	0,1926
2,5	6	19,8642	0,0686	0,3455
5	3	40,1551	0,1770	0,4408
12,5	3	101,7258	0,0766	0,0753
25	3	203,2144	0,2959	0,1456

Meloksikaamille laadittiin standardisuora standardien pinta-aloista (kuva 14), standardisuoran $R^2 = 0,99998$, viittaa siihen, että suora on lineaarinen. Meloksikaamista saatu standardisuora oli koko standardien alueella hyvin lineaarinen, vaikka ero pienimmän

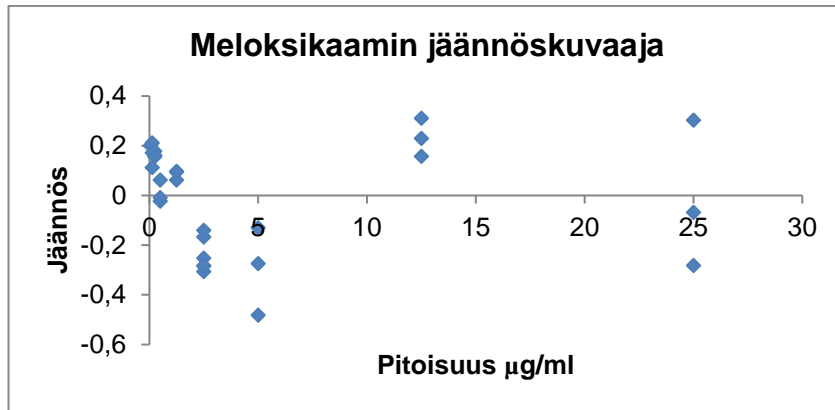
(0,05 µg/ml) ja suurimman standardin (25 µg/ml) välillä oli 500-kertainen (taulukko 4). Taulukosta 12 jäännöskuvaajan tiedoista nähdään, että 95 % luottamustasolla ei suora kulje aivan origon kautta, sillä alemman luottamustason arvo on alle nollan ja ylempi arvo on myös alle nollan. Kuvasta 15 meloksikaamin jäännöskuvaajassa pisteet ovat sijoittuneet tasaisesti suoran molemmiin puolin eri pitoisuuksilla.



Kuva 14. Meloksikaamin standardisuora, jossa 0,05 µg/ml 2 injektio on jätetty pois.

Taulukko 12. Meloksikaamin jäännöskuvaajan data.

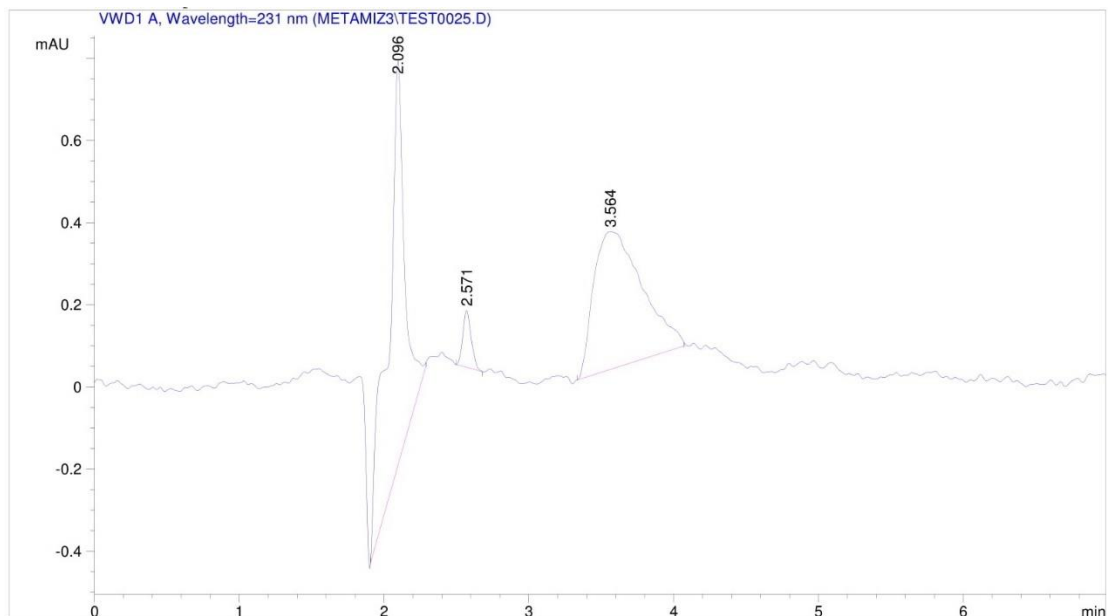
	<i>Lower</i> 95%	<i>Upper</i> 95%
Intercept	-0,34556	-0,14286
X variable	8,128003	8,150002



Kuva 15. Meloksikaamin Jäännöskuvaaja.

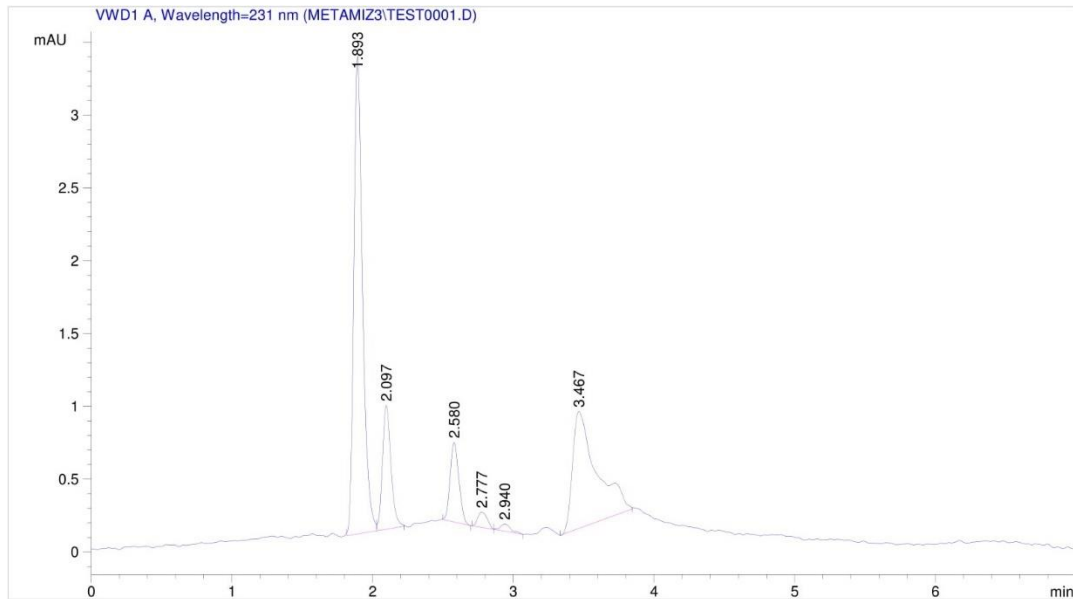
5.3 Dipyronin tulokset

Dipyronin eluentille saatiin oma kromatogrammi, eluentista tuli kolme eri piikkiä, joilla oli positiivinen pinta-ala 2 min, 2,5 min ja 3,5 min kohdilla (kuva 16). Piikkien pinta-alat olivat pieniä.



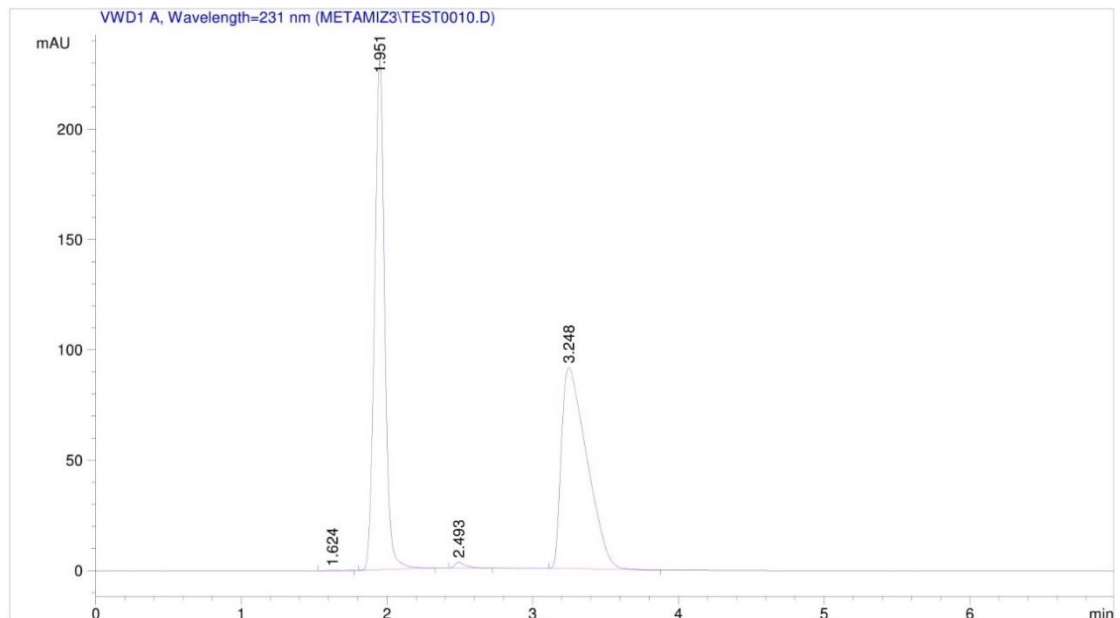
Kuva 16. Dipyronin eluentin kromatogrammi.

Kuvassa 17 on tyypillinen kromatogrammi dipyronille, jonka retentioaika noin 2 min kohdalla. 2,097 min ajalla tuleva piikki on eluentista (kuva 16) johtuvaa.



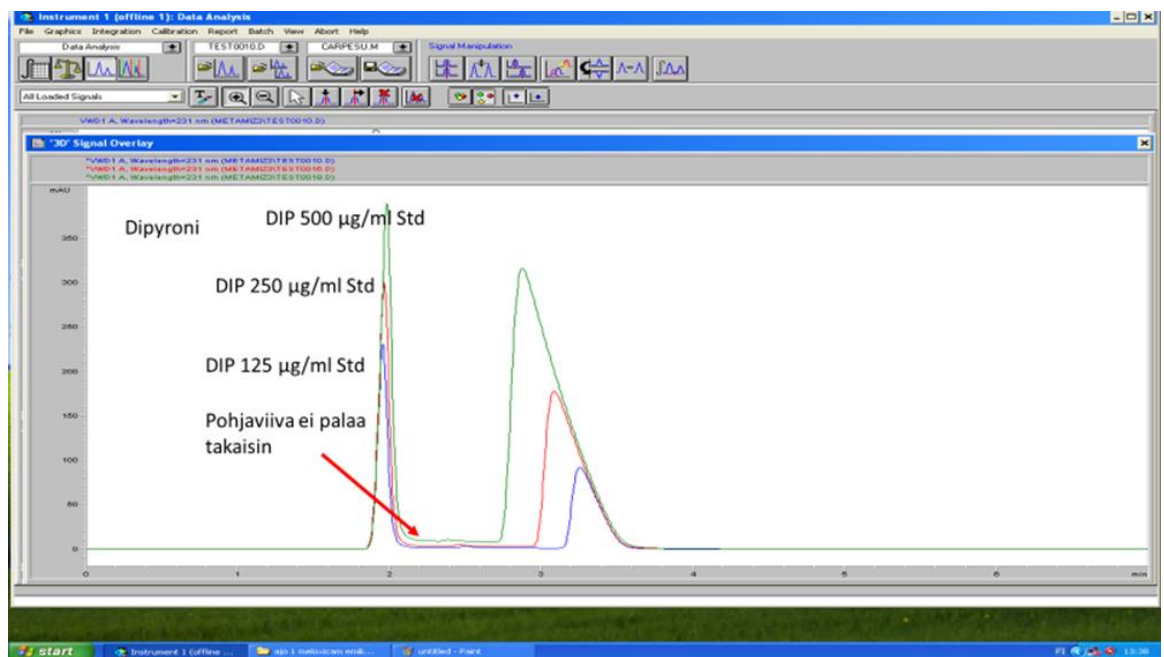
Kuva 17. Dipyronin 1,25 µg/ml standardin kromatogrammi.

Kuvassa 18 on tyypillinen dipyronin kromatogrammi 125 µg/ml standardille. Isommilla standardien piikeissä havaittiin häntimistä ja se ei palautunut pohjaviivan tasolle.



Kuva 18. Dipyronin 125 µg/ml standardin kromatogrammi.

Suuremmilla pitoisuuksilla kuten 125 µg/ml standardi ja sitä suuremmilla standardeilla näytti siltä, että dipyronin piikin retentioaika oli muuttunut hieman myöhemmäksi (kuva 19). Suurimmilla standardipitoisuuksilla (125-1000 µg/ml) piikki ei palautunut pohjaviivan tasolle, jolloin integrointi on epätarkempaa ja vaikutti myös siten suoran lineaarisuuteen. Jälkimmäinen noin 3,2 minuutin kohdalla tuleva piikki häntii merkittävästi.



Kuva 19. Dipyronin Standardit 125 µg/ml, 250 µg/ml ja 500 µg/ml päällekkäin.

Dipyronin standardien pinta-alat, integroitiin parametreja käyttämällä parametreja (taulukko 13).

Taulukko 13. Dipyronin integrointiparametrit.

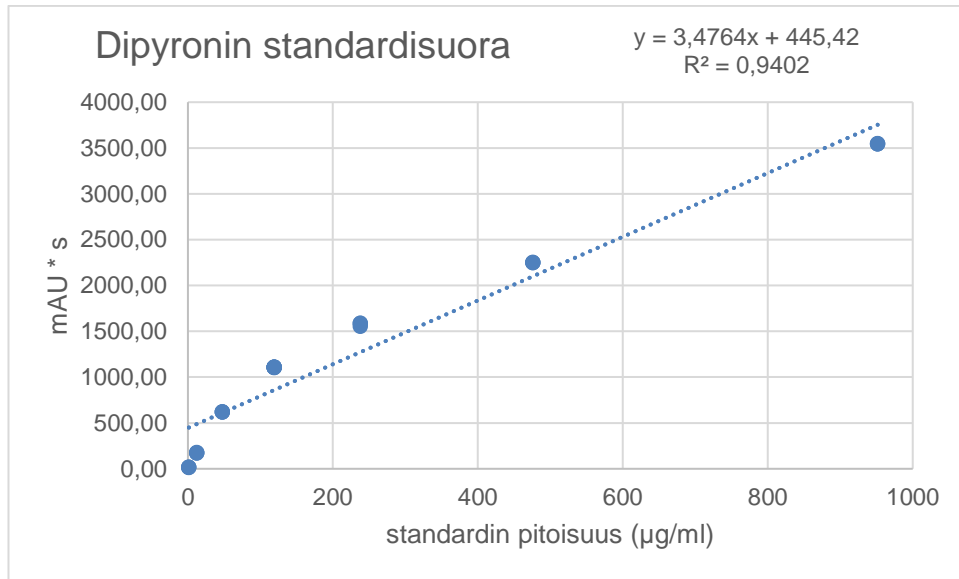
Integration Events	Value
Slope Sensivity	0,9
Peak Width	0,004
Area Reject	0,0112
Height Reject	0,0127
Shoulders	Off

Standardien todellinen pitoisuus laskettiin punnitustuloksen ja dipyronin puhtauden perusteella. Dipyronille tehtiin myös systeemitesti kuudella injeksiolla, josta laskettiin CV% sekä absorbanssien keskiarvot eri standardeille (taulukko 14).

Taulukko 14. Dipyronin standardien pinta-ala sekä CV%.

Standardin pitoisuus ($\mu\text{g/ml}$)	Injektointien lkm	Pinta-alojen keskiarvo ($\text{mAU} \cdot \text{s}$)	s	CV%
1,19 $\mu\text{g/ml}$	3	14,7333	0,3536	2,4000
11,90 $\mu\text{g/ml}$	3	174,5267	2,5703	1,4727
47,58 $\mu\text{g/ml}$	3	619,5400	1,4674	0,2368
118,95 $\mu\text{g/ml}$	6	1106,3633	1,3622	0,1231
237,91 $\mu\text{g/ml}$	3	1574,6500	19,7105	1,2517
475,82 $\mu\text{g/ml}$	3	2249,0600	1,1247	0,0500
951,63 $\mu\text{g/ml}$	3	3545,5400	1,0173	0,0287

Dipyronin ajoista saatiin tuloksia, mutta menetelmä ei ollut niin hyvin optimoitu eikä standardisuoran korrelaatiokertoimen neliö (kuva 20) ollut yhtä hyvä kuin mitä karprofeenin ja meloksikaamin tapauksessa. Koska lineaarisuus ei ollut kovinkaan hyvä, menetelmää ei otettu yrityksen käyttöön, ja resurssien vähyyden vuoksi sen kehitys hylättiin tässä työssä.



Kuva 20. Dipyronin standardisuora.

POHDINTA

Työssä kehitettiin toimeksiantajalle toimivat HPLC-menetelmät karprofeenille sekä meloksikaamille. Menetelmät olivat tavoitteiden mukaisia, sillä ne olivat isokraattisia ja kummassakin menetelmässä oli käytössä sama kolonni (Agilent Eclipse plus C18 3,5 µm 4,6x150 mm).

Karprofeenin menetelmä oli lineaarinen laajalla konsentraatioalueella (0,25 µg/ml- 100 µg/ml). Tutkitulla alueella korrelaatio kertoimen neliö $R^2= 0,9999$. Karprofeenin retentiötekijä oli $k= 4,7$. Lineaarisen regression mukaan suora kulkee origon kautta. Jäännöskuvaajassa pienemmät pitoisuudet sijoittuvat viivan alapuolelle, kun suuremmat pitoisuudet sijoittuivat molemmiin puolin suoraa.

Standardien laajan pitoisuusalueen vuoksi yhteisten integrointiparametrien etsiminen oli haastavaa. Manuaalista integrointia haluttiin välttää, sillä se vie paljon aikaa varsinkin silloin, kun standardeja ja näyteitä on paljon. Aika on rajallinen resurssi, joten parametreilla integroimista suosittiin.

Standardeja tehtäessä punnittiin hyvin pieni määrä (10,35 mg) karprofeenia kantaliuoksen valmistusta varten. Pienen määrän punnitus lisää merkittävästi mittausepävarmuutta. Lisäksi itse aineen punnitus oli haastavaa aineen staattisuuden takia. Jatkossa, kun menetelmää käytetään näytteiden pitoisuuksien määrittämiseen, tämä asia tulee ottaa huomioon ja kehityskohteina menetelmällä voisi olla mahdollisesti kantaliuos, johon punnittaisiin enemmän karprofeenia, jotta mittausepävarmuutta voitaisiin minimoida.

Meloksikaamille kehitetty menetelmä oli karprofeenin tavoin lineaarinen laajalla konsentraatioalueella (0,05 µg/ml -25 µg/ml). Menetelmä oli lineaarinen laajalla konsentraatioalueella. Standardisuoran korrelaatiokertoimen neliö $R^2= 0,99998$. Meloksikaamin retentioaika oli käytetyissä olosuhteissa 4 minuuttia ja systeemin toistettavuus 0,3 %.

Meloksikaamin kromatogrammin alkuosassa oli nähtävissä mahdollisista epäpuhtauksista aiheutuvia piikkejä, piikit tulevat mahdollisesti meloksikaamin epäpuhtauksista ja muista aikaisemmin eluoituvia komponenteista sillä standardeihin käytetty meloksikaamin puhtaus oli 98,007 %. Kun vertaillaan päällekkäisiä kromatogrammeja, voidaan nähdä, että alussa olevat piikit kasvavat myös lineaarisesti. Meloksikaamia punnittiin

5,10 mg, mikä on erittäin pieni määrä punnittavaksi ja aiheuttaa mittausepävarmuutta. Menetelmää kannattaa jatkossa parantaa kantaliuoksen osalta niin että siihen punnittaisiin enemmän meloksikaamia mittausepävarmuuden minimoimiseksi.

Dipyronin menetelmää testattiin tässä työssä. Standardisuoran korrelaatiokertoimen neliö $R^2 = 0,9402$ kun dipyronin konsentraatioalueena oli 1,25 µg/ml -1000 µg/ml. Systeemin toistettavuus 0,1%. Retentioaika käytetyissä olosuhteissa oli 2 minuuttia. Suurimmilla standardeilla havaittiin että dipyronin signaali ei palaa pohjaviivan tasalle.

Dipyronia punnittiin kantaliuosta varten hyvin pieni määrä (10,05 mg) mikä on pieni määrä suhteessa suositellun 50 mg punnitusrajan alapuolella, tämä lisää punnitusepävarmuutta. Dipyronin menetelmän optimointi, kehitystyö ja kokeilut jäivät kesken tässä työssä. Kehityskohteena olisi piikin häntämisen poisto, joka olisi todennäköisesti ratkaistavissa käyttämällä eri eluenttia tai kolonnia.

Kolmesta tutkituista aineista karprofeenista, sekä meloksikaamista saatiin alustavasti menetelmät, jossa suorat olivat lineaariset ja niillä voitaisiin mitata kvantitatiivisesti tuntemattomia näytteitä. Opinnäytetyöstä saadut menetelmät, standardisuorat ja kromatogrammit karprofeenista ja meloksikaamista olivat toimeksiantajalle riittäviä tässä vaiheessa ja menivät yrityksen käyttöön.

LÄHTEET

Agilent Technologies, 2016. *The LC Handbook Guide to LC Columns and Method development*.

Arayne, M., Sultana, N., Siddiqui, F. 2005. A new RP-HPLC method for analysis of meloxicam in tablets. *Pak J Pharm Sci*. 2005 Jan;18(1):58-62.

Berger, L. Corraz, A., 1975. US patent 3,896,145; July 22,1975; assigned to Hoffmann LaRoche, Inc.

Bio-Rad, 2019. [Internet]. Viitattu 6.5.2019. Saatavilla sähköisesti osoitteesta: <http://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/types-chromatography?ID=MWHARM15>

Boehringer Ingelheim, 2012. Metacam ® [Internet]. Viitattu 3.5.2019. Saatavilla sähköisesti osoitteesta: https://www.metacam.com/docs/Metacam_Oral_Suspension_Dogs_PI.pdf

FaunaPharma, 2019. Spasium Vet, [Internet]. Viitattu 28.4.2019. Saatavilla sähköisesti osoitteesta: <http://spc.nam.fi/indox/nam/html/nam/vetspc/6/16448096.pdf>

Harris, D. C., 2010, *Quantitative Chemical Analysis* 8th Edition. New York: W.H. Freeman and Company.

Hong, J. 2004. Determination of metamizole sodium in metamizole sodium tablets by HPLC. *Anhui Medical and Pharmaceutical Journal* 2004-01.

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2008. *Laboratorion analyysitekniikka* 5.-6. painos. Helsinki: Edita

Jasiecka, A., Maślanka, T., Jaroszewski J. 2014. Pharmacological characteristics of metamizole, *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2014;17(1):207-14

Marra, M., Silva, P., Muñoz, R., Richter, E. 2014. Ultra-fast determination of scopolamine, orphenadrine, mepyramine, caffeine, dipyrone, and ascorbic acid by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection, *J. Braz. Chem. Soc.* vol.25 no.5 São Paulo May 2014.

Merck, 2008. Meloxicam, [Internet]. Viitattu 27.4.2019. Saatavilla sähköisesti osoitteesta: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/y0001080?lang=fi®ion=FI>

Miller, J. & Miller, J. 2010. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry sixth edition*. Harlow: Pearson Education Limited.

Sigma-Aldrich, 2018. Carprofen, [Internet]. Viitattu 19.11.2018. Saatavilla sähköisesti osoitteesta: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sml1713?lang=fi®ion=FI>

Sigma-Aldrich, 2019. Meloxicam, [Internet]. Viitattu 27.4.2019. Saatavilla sähköisesti osoitteesta: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/USP/1379401?lang=fi®ion=FI&cm_sp=Insite-_-prodRecCold_xviews-_-prodRecCold5-2

Sigma-Aldrich, 2019. Metamizole sodium hydrate, [Internet]. Viitattu 28.4.2019. Saatavilla sähköisesti osoitteesta: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sml1488?lang=fi®ion=FI>

Wu, A., Chen, C., Chu, S., Tsai, Y., & Chen, F. 2001. Stability-Indicating High-Performance Liquid Chromatographic Assay Method and Photostability of Carprofen. *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 39, January 2001.

Zoetis, 2013. Rimadyl ® revised 2013 [Internet]. Viitattu 26.4.2019. Saatavilla sähköisesti osoitteesta: <https://www.zoetisus.com/products/pages/rimadyl-injectable/pdf/fpi.pdf>