

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytikkokoulutus

2019

Karla Saukkonen

PLASMAN KATEKOLIAMIINIEN ANALYSOINTI HPLC-EC - MENETELMÄLLÄ

– menetelmän optimointi ja menetelmäohjeen päivittäminen

Karla Saukkonen

PLASMAN KATEKOLIAMIINIEN ANALYSOINTI HPLC-EC-MENETELMÄLLÄ

- menetelmän optimointi ja menetelmäohjeen päivittäminen

Plasman katekoliamiinit ovat monipuolinen tutkimuskohde (Ribeiro ym. 2016). Katekoliamiinien pitoisuuksien määrittäminen biologisista näytteistä on edelleen analyttisesti haasteellista, huolimatta useista menetelmistä, joita tähän tarkoitukseen on kehitelty vuosien varrella. Suurimmat haasteet plasman katekoliamiinien analysoinnissa johtuvat niiden taipumuksesta hapettua helposti ja niiden pienistä pitoisuuksista. (Bicker 2013.)

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli analysoida erään taustamelun stressivaikutuksia arvioivan tutkimushankkeen näytteistä plasman katekoliamiinien pitoisuudet HPLC-EC -menetelmällä luotettavasti ja laadukkaasti. Tämä edellytti menetelmän optimointia. Opinnäytetyön toimeksianto tuli Turun yliopiston Biolääketieteen laitokselta ja opinnäytetyö toteutettiin Biolääketieteen laitoksen Bioanalyttisessa laboratoriossa. Bioanalyttinen laboratorio vastasi opinnäytetyön toteutuksen ohjauksesta ja kuluista. Opinnäytetyön tuotoksena syntyi päivitetty menetelmäohje Bioanalyttiselle laboratoriolle.

Tässä raportissa käsitellään plasman katekoliamiinien analysoinnin tietoperustaa ja esitellään opinnäytetyöprojektin toteutumista. Tietoperustassa käsitellään katekoliamiineja ja niiden analyttistä metodologiaa, erityisesti opinnäytetyöprojektissa käytettyä HPLC-EC-menetelmää ja alumiinioksiduuuttoa. Lisäksi raportissa kerrotaan toteutuneesta menetelmän optimoinnista ja syntyneestä tuotoksesta, menetelmäohjeesta.

Menetelmän optimoinnissa onnistuttiin parantamaan huomattavasti menetelmän herkkyyttä. Tulevaisuudessa voitaisiin vielä jatkaa työtä sopivan ajoliuoksen valmistamiseksi itse ja menetelmän herkkyyden parantamiseksi entisestään. Opinnäytetyön toimeksiantaja oli tyytyväinen syntyneeseen menetelmäohjeeseen ja uutta menetelmäohjetta hyödynnettiin tutkimushankkeen näytteiden analysoinnissa.

ASIASANAT:

Katekoliamiinit Noradrenaliini Adrenaliini HPLC Elektrokemiallinen detektori

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biomedical Laboratory Science

2019 | 31 of pages, 14 of pages in appendices

Karla Saukkonen

ANALYSING PLASMA CATECHOLAMINES WITH HPLC-EC

- optimizing the method and updating the method description

Determination of catecholamines in plasma is needed for several purposes (Ribeiro et al. 2016). Despite the wide range of methods developed for this purpose, determination of plasma catecholamines is still an analytical challenge. The greatest issues stem from oxidation of catecholamines in the samples and the low levels of catecholamines in blood. (Bicker 2013.)

This thesis project aimed to determination of plasma catecholamines with high quality in a research project concerned with the stressor effects of background noise. In order to perform the analysis, the HPLC-EC method needed to be optimized. The request for this thesis project came from the Institute of Biomedicine of the University of Turku, and the project was actualized at the Bioanalytical Laboratory of the Institute of Biomedicine. As an outcome, the thesis project produced an updated method description for the determination of plasma catecholamines to the Bioanalytical Laboratory.

Catecholamines, the methods used for their determination in plasma and especially the method used in this research project, HPLC-EC with alumina extraction of the samples, are discussed in this thesis report. Also, the process of optimizing the method for research and the new method description are introduced.

The work to optimize the method significantly improved the method's sensitivity. However, the experiments to improve the method's sensitivity and to prepare the running buffer, instead of using commercial product, could be continued in the future projects. The new method description was approved by the Institute of Biomedicine and used in determination of plasma catecholamines for this research project.

KEYWORDS:

Catecholamines Norepinephrine Epinephrine HPLC Electrochemical detection

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	6
1 JOHDANTO	7
2 KATEKOLIAMIINIT	8
2.1 Kemiallinen rakenne	8
2.2 Synteesi ja metabolia	8
2.3 Fysiologinen merkitys	9
2.4 Katekoliamiinit verenkierrassa ja verinäytteissä	10
2.5 Katekoliamiinit, melu ja stressi	11
3 KATEKOLIAMIINIPITOISUUKSIEN ANALYSOINTIMENETELMÄT	12
4 KORKEAN EROTUSKYVYN NESTEKROMATOGRAFIA JA ELEKTROKEMIALLINEN DETEKTOINTI	15
4.1 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia	15
4.2 Elektrokemiallinen detektointi	16
4.3 Näytteiden esikäsittely HPLC-EC -menetelmää varten	17
5 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS	19
5.1 Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoitteet	19
5.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	19
5.3 Toimintasuunnitelma ja aikataulu	20
5.4 Tutkimusnäytteiden analysointi	20
5.5 Eettisyyden ja luotettavuuden tarkastelu	21
6 MENETELMÄN OPTIMOINTI	22
6.1 Retentioaikoihin vaikuttaminen	22
6.2 Herkkyyden parantaminen	24
6.3 Standardit ja kontrollit	25
6.4 Muuta huomioitavaa	26
7 OPINNÄYTETYÖN TUOTOS: MENETELMÄOHJE 286 VERSIO 2	27
8 POHDINTA	29

LIITTEET

- Liite 1. Mittausalueen osoittaminen lineaarisiksi puhdasaineilla
- Liite 2. Mittausalueen osoittaminen lineaarisiksi uutetuilla standardeilla
- Liite 3. Menetelmäohje 286 v. 02

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

Adsorboida	Kiinnittää pinnalleen (Duodecim 2018)
Eksosytoosi	Aineiden kuljetusta solun sisäpuolelta ulos solusta kalvopäällysteisissä rakkuloissa (Solunetti 2006 a)
EC	Elektrokemiallinen detektointi (<i>electrochemical detection</i>)
Feokromosytooma	Lisämunuaisen ytimen kromaffiinisolukosta lähtöisin oleva kasvain, joka erittää adrenaliinia ja noradrenaliinia (Paronen ym. 2013)
HPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (<i>high performance liquid chromatography</i>) (Jaarinen & Niiranen 2005, 153)
Herkkyys, sensitiivisyys	Mittalaitteen signaalin arvon muutoksen suhde analyytin pitoisuuden muutokseen (Jaarinen & Niiranen 2005, 13)
Kromaffiininen solu	Lisämunuaisen ytimen erilaistunut hermosolu, joka tuottaa katekoliamiineja (Solunetti 2006 b)
Lineaarinen mittausalue	Konsentraatioalue, jolla tulokset ovat suoraan verrannollisia analyytin pitoisuuteen (Rautio ym. 2013, 149)
Määritys- eli kvantitointiraja	Näytetaustaa vastaan mitatun analyytin pienin pitoisuustaso, jolle kvantitatiivisia mittauksia voidaan suorittaa tietyllä luotettavuustasolla (Jaarinen & Niiranen 2005, 13)
Neuroblastooma	Lapsuusiän tavallisin pahanlaatuinen kiinteä kasvaintauti keskushermoston ulkopuolella ja tavallisin syöpätauti ensimmäisen elinvuoden aikana (Lohi ym. 2014)
Resoluutio	HPLC-asiayhteydessä resoluutiolla tarkoitetaan kahden vierekäisen piikin erottumista toisistaan (Jaarinen & Niiranen 2005, 147-149).
Retentioaika	Aika injektiohetkestä piikin huipun detektointiin (Jaarinen & Niiranen 2005, 149)
Spesifisyys	Spesifisyys tarkoittaa, että mittauksesta saatava signaali on peräisin vain tutkittavasta analyytistä (Jaarinen & Niiranen 2005, 11).
Validointi	Validointi tarkoittaa menettelyä, jolla osoitetaan, että menetelmä sopii käyttötarkoitukseensa ja antaa luotettavia tuloksia (Rautio ym. 2013, 147).

1 JOHDANTO

Eloperäisiin katekoliamiineihin kuuluvat dopamiini, noradrenaliini ja adrenaliini (Ribeiro ym. 2016). Katekoliamiinit ovat monipuolinen tutkimuskohde, koska ne ovat mukana monissa tärkeissä elimistön biologisissa toiminnoissa. Tieteellisessä tutkimuksessa ja käytännön lääketieteessä plasman katekoliamiinien määrittämiselle onkin lukuisia käyttökohteita. Muutokset elimistön katekoliamiinien toiminnassa on yhdistetty useisiin sairauksiin, kuten Alzheimerin tautiin ja Parkinsonin tautiin (Ribeiro ym. 2016). Kasvanut ymmärrys katekoliamiinien merkityksestä erilaisissa sairauksissa on tärkeää paitsi diagnostiikan kannalta, mutta myös tutkimuksen ja lääkekehityksen kannalta (Bicker ym. 2013). Katekoliamiinien vapautumista voidaan myös hyödyntää elimistön palkitsemisjärjestelmän toiminnan indikaattorina muun muassa päihde- ja lääke riippuvuuksissa (Ribeiro ym. 2016). Tämän lisäksi katekoliamiinipitoisuudet ovat käyttökelpoinen stressin mittari ihmisissä ja eläimissä (Grouzmann & Lamine 2013). Kliinisessä terveydenhuollossa plasman katekoliamiinipitoisuuksien määrittämisä käytetään neuroblastooman diagnosoinnissa (Grouzmann & Lamine 2013) sekä feokromosytooman osoittamisessa tapauksissa, joissa virtsasta tutkittujen katekoliamiinien metaboliittien pitoisuudet ovat ristiriidassa kliinisen kuvan kanssa (HUSLAB 2017).

Tämän toiminnallisen opinnäytetyön tarkoituksena oli analysoida HPLC-EC-menetelmällä erään taustamelun häiritsevyyttä koskevan tutkimushankkeen verinäytteiden plasman katekoliamiinipitoisuuksia laadukkaasti ja luoda käytetystä menetelmästä päivitetty menetelmäohje Turun yliopiston Biolääketieteen laitoksen Bioanalyttiselle laboratoriolle. Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli, että menetelmäohjeesta plasman katekoliamiinien analysoinnille tulisi entistä selkeämpi ja informatiivisempi. Menetelmää myös optimoitiin vastaamaan tämän tutkimushankkeen tarpeita, minkä vuoksi menetelmäohje piti päivittää ajantasaiseksi. Näytteiden analysoinnin tavoitteena oli saada luotettavia tuloksia tässä hankkeessa tutkittavien plasmanäytteiden katekoliamiinipitoisuuksista. Vastaavaa plasman katekoliamiinien analytiikkaa ei tällä hetkellä tehdä muualla Suomessa.

2 KATEKOLIAMIINIT

2.1 Kemiallinen rakenne

Oliver ja Schafer osoittivat vuonna 1895 lisämunuaisen ytimen verenpainetta kohottavan kemiallisen tekijän lähteeksi. Tämä yhdiste eristettiin ja tunnistettiin ensimmäisen kerran katekoliamiiniksi vuonna 1897. Vuonna 1901 Takamine ja Aldrich kuvailivat adrenaliinin rakenteen toisistaan riippumattomissa tutkimuksissa. Aldrich otti käyttöön nimityksen ”epinephrine”, kun taas Takamine nimesi yhdisteen ”adrenaliiniksi”. Vasta vuonna 1949 Peart osoitti noradrenaliinin tärkeimmäksi sympaattisen hermoston hermovälittäjäaineeksi. (Peaston & Weinkove 2004.)

Kemialliselta rakenteeltaan katekoliamiinit ovat monoamiineja, joiden osana on kaksi vie-rekkäistä hydroksyyli ryhmää sisältävä bentseenirengas. Bentseenirengas tekee katekoliamiineista luonnostaan fluoresoivia, mutta myös herkkiä valolle ja helposti hapettuvia. (Peaston & Weinkove 2004.)

2.2 Synteesi ja metabolia

Katekoliamiineja syntetisoidaan aminohappo tyrosiinista, jota voidaan saada sellaise-naan ravinnosta tai tuottaa maksassa fenyylialaniinista. Soluliman entsyymi tyrosiinihydroksylaasi muuttaa tyrosiinin L-dopaksi eli 3,4-dihydroksifenyylialaniiniksi, jonka jälkeen aromaattisten L-aminohappojen dekarboksylaasi muuttaa L-dopan dopamiiniksi pyridoksaalihapon toimiessa kofaktorina. Hermosolujen erikoistuneissa varastorakkuloissa dopamiini muuttuu noradrenaliiniksi dopamiinihydroksylaasin katalysoimassa reaktiossa. Lisämunuaisen ytimessä ja joissakin keskushermoston soluissa ilmentyvän fenyylietanolin-N-metyylitransferaasin (PNMT) vaikutuksesta noradrenaliiniin liitetään metyyli-ryhmä, jolloin syntyy adrenaliinia. Sympaattisen hermoston stimulaatio lisää tyrosiinihydroksylaasin toimintaa, kun taas L-dopa, noradrenaliini ja dopamiini puolestaan inhiboivat sen toimintaa. (Välimäki ym. 2009.)

Katekoliamiinit varastoituvat synteesisensä jälkeen hermopäätteisiin ja lisämunuaisen ytimen solujen kalvopäällysteisiin varastorakkuloihin. Varastorakkuloissa katekoliamiinit ovat sitoutuneena liukenemattomiin proteiineihin. Varastointi pitää katekoliamiinit inaktiivisina ja estää niiden entsyymaattista hajotusta, kunnes ne vapautetaan eksosytoosin avulla. Suurin osa niistä otetaan takasin sympaattisen hermoston hermopäätteisiin. Vain pieni osa hermopäätteistä vapautuneista katekoliamiineista siirtyy verenkiertoon. (Peaston & Weinkove 2004.)

Verenkiertoon päässeet katekoliamiinit metaboloituvat mm. maksassa ja munuaisissa inaktiiviseen muotoon ja erittyvät sitten glukuronidi- tai sulfaattikonjugaatteina virtsaan. Vain noin 0,5 % niistä erittyy muuttumattomana virtsaan. Tärkein noradrenaliinin ja adrenaliinin metaboliatie on katekoli-o-metyylitransferaasin (COMT) katalysoima reaktio normetanefriiniksi tai metanefriiniksi. Nämä voivat metaboloitua edelleen monoamiinioksidaasien (MAO) vaikutuksesta 3-metoksi-4-hydroksimantelihapoksi (MOMA) eli vanilliinihapoksi (VMA) tai vastaavaksi alkoholijohdokseksi, 3-metoksi-4-hydroksifenyyliglykoliksi (MHPG). Dopamiini metaboloituu 3-metoksityramiiniksi ja edelleen homovanilliinihapoksi (HVA). (Välimäki ym. 2009.) Tämä on kuitenkin karkea yksinkertaistus katekoliamiinien metaboliasta. Eisenhofer (2004) varoittaa, että lähes kaikki katekoliamiinien metaboliaa käsittelevät oppikirjat ja katsaukset perustuvat vanhoihin tutkimuksiin ja sisältävät virheellistä tai epätasällistä tietoa. Katsauksessaan hän on pyrkinyt korjaamaan sitkeästi eläviä virhekäsityksiä katekoliamiinien metaboliasta ja kertoo myös metaboliareittien välituotteista.

2.3 Fysiologinen merkitys

Adrenaliini ja noradrenaliini ovat hermovälittäjäaineita ja hormoneja. Hermostollinen säätely vaikuttaa suuresti katekoliamiinien erittymiseen lisämunuaisen ytimestä eli niiden toimintaan hormoneina. (Nienstedt ym. 2004.) Katekoliamiinit vapautuvat lisämunuaisen ytimen kromaffiinisoluista verenkiertoon eksosytoosin kautta kolinergisen eli asetyylikoliniinivälitteisen hermoärsytyksen seurauksena. (Välimäki ym. 2009, 365.)

Katekoliamiinien vaikutuksen voimakkuus on riippuvainen muun muassa verenkierron vilkkaudesta kohdekudoksessa, sympaattisesta hermotuksesta ja solujen pinnalla olevien adrenergisten reseptorien määrästä ja laadusta. Adrenergisiä reseptoreja on yhdeksän alatyyppeä, joilla on erilaiset kudospinnat ja funktiot kohdesolujen aktiivisuuden säätelyssä. (Välimäki ym. 2009.)

Katekoliamiinit osallistuvat mm. glukoositasapainon säätelyyn. Katekoliamiinit vähentävät ruuansulatuskanavan toimintoja. Niiden vaikutuksesta elimistön hapenkulutus lisääntyy ja maksasta mobilisoituu glukoosia verenkiertoon. Noradrenaliini supistaa verisuonten seinämien sileälihassoluja, jolloin verisuonten virtausvastaus kasvaa ja verenväline nousee. Adrenaliini muun muassa nopeuttaa voimakkaasti sydämen sykettä sekä laajentaa lihasten ja maksan arterioleja eli pieniä valtimoita. Lisäksi adrenaliini veltostaa keuhkoputkien sileitä lihassoluja. (Nienstedt ym. 2004.)

2.4 Katekoliamiinit verenkierron ja verinäytteissä

Katekoliamiinien biologinen vaikutus väistyy nopeasti. Veren katekoliamiineista jopa kolme neljäsosaa inaktivoituu jo kulkiessaan ensimmäisen kerran maksan ja sydämen kautta. (Lamberg ym. 1997, 294.) Verenkierron adrenaliini ja noradrenaliini ovat osin löyhästi sitoutuneina valkuaisiin, kuten albumiiniin ja globuliineihin. Verenkierron adrenaliini on pääosin peräisin lisämunuaisen ytimestä. Adrenaliinin pitoisuus perifeerisissä laskimoissa on pienempi kuin valtimoissa, mikä kuvastaa adrenaliinin ekstraktiota ja metaboliaa perifeerisissä kudoksissa. Noradrenaliinin pitoisuus sitä vastoin on suurempi ääreislaskimoissa kuin valtimoissa, mikä johtuu noradrenaliinin vapautumisesta hermopäätteistä verenkiertoon. (Välimäki ym. 2009, 365.) Asento vaikuttaa merkittävästi veren noradrenaliinipitoisuuteen. Noradrenaliinin pitoisuus veressä kaksinkertaistuu seisomaan noustessa, ja tämä ilmiö voimistuu ikääntymisen myötä (Välimäki ym. 2009, 366).

Tutkittaessa katekoliamiinipitoisuuksia verinäytteistä tulee näytteenotossa huomioida useita tekijöitä, kuten noradrenaliinin erittymisen vuorokausirytmii, erot laskimo- ja valtimopitoisuuksien välillä, ja mm. stressin, asennon, kahvin ja tupakoinnin vaikutus. Katekoliamiinien ja niiden metaboliittien säilymisestä plasmanäytteissä on runsaasti tietoa. Katekoliamiinit säilyvät jopa kuusi viikkoa - 20 °C:ssa ja ainakin vuoden -80 °C:ssa. Säilytyslämpötila onkin tärkein näytteiden säilymiseen vaikuttava tekijä, ja plasmanäytteet tulisi säilöä - 80 °C:een aina kun se on mahdollista. (Peaston & Weinkove 2004.)

Vähimmäisvaatimuksena keskenään vertailukelpoisten näytteiden saamiseksi näytteenotossa tulisi käyttää kanyylia, joka on asennettu vähintään puoli tuntia ennen näytteenottoa, näytteet tulisi ottaa makuuasennossa, käyttää EDTA-veriputkia (tai hepariiniveriputkia), kuljettaa näytteet jäissä laboratorioon, sentrifugoida näytteet + 4 °C:ssä puolen

tunnin sisällä näytteenotosta ja pakastaa plasmanäytteet - 80 °C :een. (Peaston & Weinkove 2004.)

2.5 Katekoliamiinit, melu ja stressi

Adrenaliinia ja noradrenaliinia käytetään usein stressin mittareina. Melulle altistumisen voidaan odottaa lisäävän noradrenaliinin pitoisuutta veressä. Babisch nimeääkin artikkelissaan (2003) useita tutkimuksia, joissa tämä on osoitettu. Suuria adrenaliinin ja kortisolin pitoisuuksia veressä on puolestaan esiintynyt myös melualtistusten verrokkihenkilöillä. Epämukavuuden kokeminen, emotionaalinen stressi ja tavanomaisesta poikkeava melu on yhdistetty kohonneisiin adrenaliinitasoihin. Uusimmilla tutkimuksilla on kuitenkin ollut taipumusta keskittyä mittaamaan vapaan kortisolin ja sen tiettyjen metaboliittien määrää plasmassa tai virtsassa. Kortisolin mittaamisessa ongelmaksi voi muodostua sen vahva vuorokausivaihtelu, sekä liian lyhyet tarkkailuajat, sillä kortisolin pitoisuus laskee hitaasti. (Babisch 2003.)

Aiemmissä tutkimuksissa on usein ollut ongelmana, että koetilaisuus itsessään on stressaava, mikä voi peittää melun stressivaikutuksen. Sen lisäksi hormonitoiminnassa on sekä suuria yksilöiden välisiä eroja että fysiologista vuorokausi- ja viikkorytmeihin liittyvää vaihtelua. Kroonisen stressin määrän arvioiminen keräysvirtsanäytteiden avulla voi olla luotettavampi tapa mitata stressiä kuin tiettyssä aikapisteessä tehdyt hormonimittaukset plasmasta tai syljestä, koska keräysvirtsanäytteet ovat vähemmän alttiita hormonien vuorokausivaihtelun aiheuttamille muutoksille. Kun vuorokausivirtsanäytteiden yhteydessä määritetään myös virtsaan erittyneen kreatiniinin määrä, voidaan keräysvirtsan katekoliamiinipitoisuus suhteuttaa virtsan eritykseen. (Babisch 2003.)

3 KATEKOLIAMIINIPITOISUUKSIEN ANALYSOINTIMENETELMÄT

Katekoliamiinien pitoisuuksien määrittäminen biologisista näytteistä on edelleen analyttinen haaste, huolimatta useista menetelmistä, joita on kehitelty vuosien varrella. Suurimmat haasteet katekoliamiinien analysoinnissa asettavat niiden taipumus hapettua helposti ja niiden pienet pitoisuudet biologisissa näytteissä. Tämän vuoksi ei voida liikaa korostaa preanalyttisten tekijöiden merkitystä katekoliamiinien määrittämisessä. (Bicker ym. 2013.)

Katekoliamiinien ja niiden metaboliittien analyysi kudoksista ja biologisista nesteistä on tuottanut valtavan määrän menetelmäkirjallisuutta, kun mukaan luetaan kaikki fluorometriset, spektrofotometriset, radioentsyymaattiset, kaasukromatografiset, nestekromatografiset ja immunologiset menetelmät. Näistä vain HPLC on saavuttanut yleisen hyväksynnän katekoliamiinien analysoinnissa. (Peaston & Weinkove 2004.) Se onkin vakiintunut katekoliamiinien erotus- ja analyysimenetelmäksi. Kvantitatiivisten tulosten saamiseksi korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa täytyy yhdistää detektoriin – yleensä joko fluoresenssiin, kemiluminesenssiin, elektrokemiallisiin reaktioihin tai massaspektrometriaan perustuvaan detektoriin. (Bicker ym. 2013.)

Katekoliamiinit ovat luonnostaan fluoresoivia, mikä helpottaa fluorometristen menetelmien käyttöä. Monet muut yhdisteet ja lääkkeet plasmassa kuitenkin absorboivat ja emittoivat valoa parhaiten juuri samoilla aallonpituuksilla kuin katekoliamiinit, minkä vuoksi fluoresenssiin perustuvien menetelmien käyttö edellyttää erittäin spesifistä katekoliamiinien puhdistusta näyttemateriaalista. (Peaston & Weinkove 2004.)

Radioentsyymaattinen metodi puolestaan mahdollistaa herkän analyysin hyvin pienistä näyttemääristä. Menetelmä on monimutkainen ja työläs sekä vaatii suurta tarkkuutta, eikä siksi sovi rutiininomaiseen työskentelyyn. (Peaston & Weinkove 2004.)

HPLC yhdistettynä amperometriseen tai koulometriseen elektrokemialliseen detektoriin on hallitseva analyysimenetelmä. HPLC-menetelmien suurin etu on niiden monipuolisuus. Pienillä muutoksilla kromatografiaolosuhteissa voidaan analysoida myös virtsan

katekoliamiineja ja niiden metaboliitteja. Elektrokemiallisen detektorin signaalin taustakohina reagoi herkästi ajoliuoksen virtauksen muutokseen, mikä voi näkyä kohonneena taustasignaalina ja heikentää menetelmän sensitiivisyyttä. (Peaston & Weinkove 2004.)

HPLC-EC-menetelmässä katekoliamiinien esipuhdistus näytemateriaalista on välttämätöntä. Uutto aktivoituu alumiinioksidiin emäksisessä pH:ssa on yksi yleisimmistä näytteen esipuhdistusmenetelmistä. Esikäsittelyn tavoitteena on mahdollistaa riittävä menetelmän herkkyys ja samalla minimoida kaikki häiritsevät yhdisteet, jotka tulevat näytemateriaalista tai esikäsittelystä. Alumiinioksiduutto ei ole täysin selektiivinen prosessi, mutta noudattamalla erityistä tarkkuutta käytettävän HPLC-EC menetelmän vakioinnissa, voidaan alumiinioksiduuton avulla tehdä luotettavaa analyysiä. Erityistä huomiota tulee kiinnittää liikkuvan faasin valintaan ja elektrokemiallisten kennojen potentiaalien valintaan. Niillä voidaan parantaa huomattavasti menetelmän selektiivisyyttä. (Peaston & Weinkove 2004.)

Bicker ym. julkaisivat v. 2013 katsauksen nestekromatografisista menetelmistä katekoliamiinien ja niiden metaboliittien määrittämisessä biologisista näytteistä. Tässä katsauksessa vertailtiin erilaisia kromatografisia olosuhteita ja pohdittiin erilaisten detektorien etuja ja rajoituksia. Bicker ym. määrittivät katekoliamiinimäärittysten suurimmaksi haasteeksi katekoliamiinien taipumuksen hapettua ja niiden hyvin pienet pitoisuudet biologisissa näytteissä. Menetelmän kehittäminen katekoliamiinien määrittämiseksi pysyy edelleen kiehtovana haasteena, Bicker ym. toteavat katsauksessaan. (Bicker ym. 2013.)

Weinkove osoitti, että HPLC yhdistettynä elektrokemialliseen detektioon tarjoaa spesifisen ja sensitiivisen tekniikan, jossa on mahdollisuuksia automatisointiin. Tämä onkin edelleen yleisesti parhaana pidetty menetelmä. Lupaaviksi vaihtoehdoiksi ovat kehitymässä immunologiset menetelmät ja tandem-massaspektrofotometria. (Peaston & Weinkove 2004.)

Vuonna 2013 julkaistiin myös Grouzmannin ja Laminen artikkeli katekoliamiinien määrittämisestä plasmasta ja virtsasta. Artikkelin tarjosi päivitettyä tietoa katekoliamiinien määrittämisestä sekä esitteli yleisimpiä preanalyttisia ja analyttisiä virhelähteitä näissä analyyseissä. Grouzmann ja Lamine korostivat preanalyttisten tekijöiden tärkeyttä.

Ribeiro ym. kertoivat v. 2016 julkaistussa katsauksessaan elektrokemiallisista sensoreista ja biosensoreista katekoliamiinien määrittämisessä. Katsauksessaan he pyrkivät

kuvailemaan ja ryhmittelemään elektrokemiallisia sensoreita, sekä pohtivat elektrokemiallisten sensorien nykytilannetta ja tulevaisuutta katekoliamiinien analytiikassa. Ribeiron ym. mukaan elektrokemialliset sensorit voivat olla edullinen, yksinkertainen, nopea ja selektiivinen työväline katekoliamiinien tunnistamisessa. Katsauksessaan he kuvailevat, miten nanoteknologian kehittyminen mahdollistaa elektrokemiallisten sensorien käytön tulevaisuudessa sekä laboratorio-olosuhteissa että elävissä soluissa.

4 KORKEAN EROTUSKYVYN NESTEKROMATOGRAFIA JA ELEKTROKEMIALLINEN DETEKTOINTI

4.1 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

Kromatografiassa näyte erotellaan komponenteikseen tunnistamista ja pitoisuusmäärittäiksi varten. Nestekromatografiakolonnissa liikkuvana faasina on neste ja stationaari-faasina kiinteä faasi tai siihen sidottu neste. Nestekromatografiassa yhdisteiden erottamiseen vaikuttaa useimmissa sovelluksissa lähinnä niiden poolisuus. Nestekromatografialaitteisto koostuu pumpusta, injektorista, kolonnista ja detektorista. (Jaarinen & Niiranen 2005, 140-153.)

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC, *high performance liquid chromatography*) hyödyntää korkeaa painetta työntäkseen ajoliuoksen eli eluentin mikropartikkeleilla pakattujen kolonnien läpi. Pumppu pumppaa ajoliuosta laitteiston läpi. Pumpun täytyy pystyä tuottamaan pulssiton virtaus stationäärifaasilla täytetyn kolonnin aiheuttama vastapainetta vastaan. (Rautio ym. 2013, 131.)

Näyte syötetään nestekromatografiin injektorin eli näytteensyöttäjän avulla. Injektointi voidaan tehdä käsin tai automatisoidusti. Nykyään suurin osa klinisen kemian laboratorioista käyttää automaattisia näytteensyöttäjiä. Lämpötilatermostoidut näytteensyöttäjät mahdollistavat herkästi hajoavien yhdisteiden (kuten katekoliamiinien) analysoinnin. (Penttilä 2004, 103.)

Kolonnin sisällä oleva pake koostuu pienistä tasalaatuisista partikkeleista, joiden pintaa peittää kiinteäfaasi. Käänteisfaasinestekromatografiassa yleisin on C18-kolonne, jossa oktadekyylimolekyyli on sidottu silikapartikkeleihin muodostaen oktadekyylisilaa-niketjuja (ODS). (Penttilä 2004, 104.) Mitä pienempiä stationaarifaasin mikropartikkelit ovat, sitä enemmän niillä on aktiivista pinta-alaa ja sitä tehokkaampaa kromatografiaa voidaan odottaa (Jaarinen & Niiranen 2005). Tyypillisiä ajoliuoksia ovat veden tai puskuriliuoksen seokset metanolin ja asetonitriliin kanssa (Rautio ym 2013, 132).

Tiedonkäsittelyohjelmisto näyttää detektorin antaman signaalin eli vasteen kuvajana, kromatogrammina (Rautio ym. 2013, 131). Tässä opinnäytetyössä käytettiin Chromeleon 7.2. -ohjelmistoa. Ohjelmistolla määritettiin mittaustulosteista kunkin analyysin aiheuttaman piikin pinta-ala integroimalla ja laskettiin niiden suhde menetelmässä

käytetyn sisäisen standardin signaalin tuottaman piikin pinta-alaan. Näytteiden pitoisuudet saatiin laskettua kalibroitikuvaajaan vertaamalla.

Kun liikkuva faasi on poolisempi kuin stationaarifaasi, puhutaan käänteisfaasinestekromatografiasta. Valtaosa HPLC-analyyseistä tehdään tällä tekniikalla. Normaalifaasines-tekromatografiassa sitä vastoin paikallaan pysyvä eli stationaarifaasi on poolisempi kuin liikkuva faasi. Verrattuna normaalifaasines-tekromatografiaan, käänteisfaasines-tekromatografian etuina ovat halvemmat eluentit ja stabiilimmat olosuhteet. (Jaarinen & Niiranen 2005, 155 -156.)

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia on laajalti käytetty sekä epäorgaanisten että orgaanisten yhdisteiden analyysitekniikka, joka mahdollistaa monen aineen saman- kaisen analysoinnin. Periaatteessa HPLC:n soveltamisen ainoa edellytys on, että analysoitava yhdiste saadaan liukenemaan johonkin liuottimeen. (Jaarinen & Niiranen 2005, 153.) Korkean erotuskyvyn nestekromatografia on keskeinen tekniikka kvantitatiivisessa lääketutkimuksessa (Rautio ym. 2013, 131). Kliinisessä lääketieteessä HPLC:tä käytetään muun muassa lääkeaine-, vitamiini-, hormoni-, katekoliamiini-, aminohappo-, pep- tidi- ja proteiinimäärityksiin (Penttilä 2004, 101). HPLC:n suurimmat edut muihin erottelu- ja analyysimenetelmiin verrattuina ovat suuri erotuskyky, nopeus, herkkyys, automaatti- nen toiminta ja soveltuvuus lähes kaikille kuviteltavissa oleville yhdisteille (Penttilä 2004, 101).

4.2 Elektrokemiallinen detektointi

Elektrokemiallinen detektointi eli sähkökemiallinen detektointi soveltuu hapettuvien ja pelkistyvien yhdisteiden analysointiin (Jaarinen & Niiranen 1997, 156). Amperometri- sessä detektorissa analyytit hapetetaan tai pelkistetään elektrodin pinnalla vakiojännit- teen avulla. Hapetus- tai pelkistysreaktiossa syntyvän sähkövirran määrä on suoraan verrannollinen ohi virtaavassa liuoksessa olevien hapettuvien tai pelkistyvien yhdisteiden pitoisuuteen. (Penttilä 2004.) Amperometrisessä detektorissa näytteessä olevasta aine- määrästä hapettuu tai pelkistyy yleensä noin 5 – 15 % (Thermo Scientific 2012).

Koulometrinen detektori on amperometristä herkempi. Siinä näyte kulkee huokoisen elektrodin läpi, jolloin voidaan saavuttaa lähes 100 %:n hapetus- tai pelkistystulos, kui- tenkaan taustakohinan kasvamatta samassa suhteessa. (Thermo Scientific 2012.) Klii-

nisessä kemiassa koulometristä detektoria sovelletaan erityisesti Cl-titrauksissa ja katekoliamiinien analytiikassa (Penttilä 2004, 78). HPLC yhdistettynä elektrokemiallisia reaktiivita mittaavaan detektoriin voi tarjota vaadittavan sensitiivisyyden ja spesifisyyden, mutta katekoliamiinien esipuhdistus näytemateriaalista on edelleen välttämätöntä. (Peaston & Weinkove 2004.)

4.3 Näytteiden esikäsittely HPLC-EC -menetelmää varten

Opinnäytetyössä käytettiin näytteiden esikäsittelymenetelmää, jossa näytteiden katekoliamiinit adsorboidaan tutkittavasta plasmanäytteestä alumiinioksidiin ja uutetaan sitten alumiinioksidista 2 % etikkahappoliuokseen. Adrenaliini- ja noradrenaliinipitoisuudet määritettiin korkean erotuskyvyn nestekromatografialla koulometrisellä elektrokemiallisella detektorilla käyttäen sisäisen standardin menetelmää. Sisäisenä standardina käytettiin 3,4-dihydroksibentsyyliamiinia. (Orpana 2016.)

Opinnäytetyössä käytetty alumiinioksidiuuttotekniikka perustuu alun perin Antonin ja Sayren vuonna 1962 julkaisemaan kuvaukseen katekoliamiinien alumiinioksidiuuttoon vaikuttavista tekijöistä. Ko. tutkimuksessa verinäytteet kerättiin hepariinia ja natriummetabisulfaattia sisältäviin veriputkiin, sentrifugoitiin kylmässä ja plasma eroteltiin ja pakastettiin analysointia varten. Näytetilavuus oli 30 ml, mikä helpotti pienten pitoisuuksien analysointia. Näytteet käsiteltiin ja analysoitiin yksi kerrallaan. Alumiinioksidi pestiin vähintään neljä kertaa. Kaikki sentrifugoinnit tapahtuivat kylmässä. Katekoliamiinit eluoi- tiin perkloorihappoon. (Anton & Sayre 1962.)

Vuonna 1991 Ganhao ym. osoittivat, että alumiinioksidiuutto voidaan myös tehdä nopeasti ja yksinkertaisesti. Kriittisiä tekijöitä olivat lähinnä alumiinioksidin laatu, alumiinioksidin määrä ja pH. Sen sijaan he eivät nähneet vaikutusta sillä, oliko näytteet sentrifugoitu heti, 30 min sisällä vai 60 min sisällä näytteenotosta ja käytettiinkö näyteputkissa (hepariini) glutatonia antioksidanttina vai ei. Eroa ei myöskään havaittu sen suhteen, annettiinkö alumiinioksidin, plasman ja pH:n säätämiseksi käytetyn Tris-puskurin sekoitusta 15, 30 vai 60 min, eikä sen suhteen, annettiinkö katekoliamiinien eluotua happoon 15, 30 vai 60 min ajan. Kaiken kaikkiaan he pitivät alumiinioksidiuuttoa yksinkertaisena, nopeana, taloudellisena ja suhteellisen vaarattomana näytteenkäsittelytekniikkana. (Ganhao ym. 1991.)

Antonin ja Sayren kuvailema alumiinioksidisuutto on muodostanut perustan useille HPLC-näytteiden käsittelyohjeille. Bouloux osoitti, että kaupallinen happopesty alumiinioksidi sopii korvaamaan laboratorioden omat alumiinioksidin happokäsittelyt, ja että eluointiliuoksen valinta voi vaikuttaa kromatografiaan. Monet hapot, esim. fosforihappo, perkloorihappo ja etikkahappo, ovat sopivia ja laajalti käytettyjä. Alumiinioksidisuuton rajoituksia on, että alumiinioksidin adsorboituvat kaikki yhdisteet, joissa on katekoliaamiinirengas ja siksi sen spesifisyys on rajallinen. Erityisesti käytettäessä elektrokemiallista detektoria alumiinioksidisuuton yhdistäminen toiseen näytteenkäsittelytekniikkaan, kuten kiinteäfaasiuuttoon voi ratkaista monia ongelmia. Tällöin kuitenkin sekä kulut että näytteenkäsittelyyn kuluva aika lisääntyvät. (Peaston & Weinkove 2004.) Katekoliaamiinien analytiikassa pyritään pitämään näytteiden käsittelyaika mahdollisimman lyhyenä, sillä katekoliaamiinit hapettuvat helposti huoneenlämmössä ja valoisassa.

5 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

5.1 Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoitteet

Tämän toiminnallisen opinnäytetyön tarkoituksena oli mahdollistaa tutkimushankkeen tarvitsema plasman adrenaliini- ja noradrenaliinipitoisuuksien analysointi HPLC-EC-menetelmällä laadukkaasti. Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli saada luotettavia tuloksia tässä hankkeessa tutkittavien näytteiden katekoliamiinipitoisuuksista. Laboratorioanalyysien luotettavuus on tärkeä edellytys tutkimuksen luotettavuudelle. Tutkimusnäytteiden luotettava ja laadukas analysointi edellytti menetelmän optimointia.

Tuotoksena tässä opinnäytetyössä syntyi päivitetty menetelmäohje katekoliamiinien määrittämiseksi HPLC-EC-menetelmällä Turun yliopiston Biolääketieteen laitoksen Bioanalyttiselle laboratoriolle (Liite 3). Tämän menetelmäohjeen päivittäminen oli ajankohtaista ja tärkeää, koska se edesauttoi tutkimushankkeen näytteiden analysoinnin toteuttamista.

Tässä opinnäytetyössä opinnäytetyön tekijän henkilökohtaisena ammatillisen kasvun tavoitteena oli oppia työskentelemään itsenäisesti ja laadukkaasti uudessa moniammatillisessa ympäristössä, samalla osallistuen sen työtapojen kehittämiseen. Tämän opinnäytetyön tekijän tavoitteena oli myös osoittaa kykyä yhdistää käytännön osaaminen ja teoreettinen tieto innovatiivisella ja työyhteisöä hyödyttävällä tavalla.

5.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Tämä opinnäytetyö on toiminnallinen opinnäytetyö. Toiminnallisella opinnäytetyöllä on kehittämistehtävä ja se perustuu useimmiten toimeksiantoon (Turku AMK Messi 2018). Kehittämistyötyyppisiä opinnäytetöitä yhdistää, että ne koostuvat kahdesta osasta: tuotteesta ja sitä taustoittavasta raportista (Hakala 2004, 28). Toiminnallisen opinnäytetyön kehittämistehtävä tavoittelee esimerkiksi käytännön toiminnan ohjeistamista, toiminnan järjestämistä tai sen toteuttamista entistä paremmalla tavalla. Toiminnallisessa opinnäytetyössä syntyvä tuote tai tuotos voi olla esimerkiksi ohje, opastus, ohjeistus tai tapahtuman toteuttaminen (Vilkkä & Airaksinen 2004, 9). Uuden kehittäminen perustetaan lähdeaineistosta rakennettavaan tietoperustaan (Turku AMK Messi 2018).

Opinnäytetyöllä halutaan osoittaa kykyä yhdistää käytännöllinen osaaminen ja teoreettinen tieto niin, että siitä voidaan hyötyä (Vilka & Airaksinen 2004,160). Korkeakoulutasoinen opinnäytetyön tulee olla toteutettu tutkimuksellisella otteella ja se tulee raportoida tutkimusviestinnän keinoin (Vilka & Airaksinen 2004,10).

Tämän opinnäytetyön toimeksianto tuli Turun yliopiston Biolääketieteen laitokselta ja opinnäytetyö toteutettiin Biolääketieteen laitoksen Bioanalyttisessä laboratoriossa. Bioanalyttinen laboratorio vastasi opinnäytetyön toiminnalliseen osuuteen perehdyttämisestä ja opinnäytetyöprojektin kuluista. Tämän opinnäytetyön tuotoksena syntyi päivitetty menetelmäohje Bioanalyttiselle laboratoriolle ja sitä taustoittava raportti.

5.3 Toimintasuunnitelma ja aikataulu

Tähän opinnäytetyöhön rekrytoiminen tapahtui maaliskuussa 2018. Rekrytoinnin tapahtuttua alkoi käytännön toteutuksen suunnittelu yhdessä muun tutkimusryhmän kanssa. Tällöin suunniteltiin tarkemmin opinnäytetyön aihetta, tarkoitusta ja tavoitetta, sekä sovittiin opinnäytetyöhön liittyvistä vastuualueista. Toukokuussa 2018 käsiteltiin vielä tämän opinnäytetyön aiheen rajausta tarkemmin aihe-seminaarissa yhdessä opettajan kanssa.

Tietoperustan rakentamista HPLC-EC-menetelmästä jatkettiin kesän 2018 aikana. Elokuussa saatiin perehdytys Turun yliopiston Biolääketieteen laitoksella HPLC-EC-menetelmästä ja yleisistä laboratorion käytännöistä, kuten turvallisuusasioista.

Opinnäytetyön suunnitelma valmistui syksyllä 2018. Menetelmän optimointi ja näytteiden analysoinnin aloittaminen tapahtuivat loppuvuoden aikana. Opinnäytetyön raportointia täydennettiin koko prosessin ajan. Valmis menetelmäohje hyväksyttiin ja opinnäytetyö esitettiin keväällä 2019.

5.4 Tutkimusnäytteiden analysointi

Toimeksianto opinnäytetyöhön tuli Turun yliopiston Biolääketieteen laitokselta. Biolääketieteen laitoksen Bioanalyttinen laboratorio vastasi opinnäytetyön toiminnallisessa osuudessa käytettävään laitteistoon ja menetelmään perehdyttämisestä, tarvikkeista ja

kuluista. Näytteiden alumiinioksidiuutto ja analysointi tapahtuivat Medisiina C:ssä Bio­ lääketieteen laitoksen tiloissa. Opinnäytetyön tekijän työparina menetelmän optimoinnissa ja näytteiden analysoinnissa toimi toinen bioanalyttikko-opiskelija.

Adrenaliini- ja noradrenaliinipitoisuuksien määrittämisessä hyödynnettiin Turun yliopiston Bioanalyttisen laboratorion menetelmäohjetta 286, versio 01 vuodelta 2016. Ennen tutkimushankkeen näytteiden analysointia menetelmää optimoitiin toteutettavan tutkimuksen tarkoitusta vastaavaksi. Menetelmän optimoinnin jälkeen menetelmäohjeesta luotiin uusi versio.

Analysoitavia tutkimushankkeen näytteitä oli 540 kappaletta. Analysoitavat näytteet oli otettu varta vasten tätä taustamelututkimusta varten. Tutkittaville koehenkilöille oli ohjeistettu näytteenottoon valmistautuminen. Näytteet oli otettu kylmänäytteenottona kannylin kautta. Näytteet oli sentrifugoitu jäähdytettävässä sentrifugissa (0 - + 4 °C) ja pakastettu väliaikaisesti – 20 °C:een, josta ne oli siirretty saman päivän aikana – 80 °C:een syväjäähän. Näytteiden keräämisestä ja käsittelystä vastasivat toiset bioanalyttikko-opiskelijat.

Yhden tutkimushenkilön kaikki näytteet käsiteltiin ja mitattiin aina samalla analysointikerällä, jotta näytteistä saatavat tulokset olisivat mahdollisimman vertailukelpoisia keskenään. Tutkimusnäytteiden tulokset ja kromatogrammit kerättiin tutkimuskansioon. Tässä opinnäytetyössä ei tulkittu tutkimustuloksia, vaan ne lähetettiin analysointipalvelun tilaajalle.

5.5 Eettisyyden ja luotettavuuden tarkastelu

Tämä opinnäytetyö toteutettiin Tutkimuseettisen neuvottelukunnan (2012) määrittelemän hyvän tieteellisen käytännön mukaisesti. Tämän opinnäytetyön tekemisessä noudatettiin rehellisyyttä ja huolellisuutta kaikissa sen vaiheissa. Näytteiden analysoinnissa toteutettiin tieteellisen tiedon luonteeseen kuuluvaa avoimuutta ja vastuullista viestintää. Tutkittavien anonymiteetin suojelemiseksi näytteet oli yksilöity koodeilla. Missään käsitellyissä näytteissä ei ollut koehenkilöiden tunnistamisen mahdollistavia tietoja. Jätteet hävitettiin Turun yliopiston ohjeistuksen mukaisesti.

6 MENETELMÄN OPTIMOINTI

Menetelmän optimointi oli välttämätöntä tutkimushankkeen katekoliamiinien määrittämiselle tarkoituksenmukaisesti ja luotettavasti. Menetelmän optimointi ja validointi olivat osa menetelmäohjeen päivittämistä.

Kromatografia oli muuttunut HPLC-pumpun huollon jälkeen. Erityisesti noradrenaliinin retentiota haluttiin hidastaa niin, että sen aiheuttama piikki kromatogrammissa siirtyisi kauemmas liuotinrintamasta tasaisemmalle alueelle pohjaviivaa. Koska orgaanisen liuottimen osuutta muuttamalla ei saatu haluttua lopputulosta, kokeiltiin vaikuttaa kromatografiaan ajoliuoksen pH:ta säätämällä ja muuttamalla ioniparireagenssin määrää ajoliuoksessa.

Aiemman menetelmäohjeen mukainen menetelmä oli toiminut hyvin laboratorion edellisessä projektissa. Nyt tutkimusasetelma oli erilainen ja tarvittiin suurempaa herkkyyttä. Injektio- ja uuttolavuutta muuttamalla pystyttiin toteamaan entistä pienempiä pitoisuuksia.

Työskentelystä pidettiin laboratoriapäiväkirjaa, josta käy ilmi muun muassa kuka analyysi teki sekä milloin ja mitä havaintoja työn aikana tehtiin. Olennainen raakatieto kerättiin projektikansioon. Laitekohtaiset käyttötiedot kirjattiin laitekansioihin tai -päiväkirjoihin.

6.1 Retentioaikoihin vaikuttaminen

Retentioaika kuvaa aikaa näytteen injektiohetkestä analyysin piikin huipun detektoimiseen. Retentioaikoihin vaikuttaessa on keskeistä huolehtia riittävän resoluution säilymisestä. Resoluutio kuvaa piikkien erottumista toisistaan (Jaarinen & Niiranen 2005, 147 - 149). Pienin ja yksinkertaisin muutoksin, kuten muuttamalla orgaanisen aineksen määrää ajoliuoksessa tai lisäämällä ioniparireagenssia voidaan vaikuttaa merkittävästi kromatografiaan (Peaston & Weinkove. 2004). Ajoliuoksen koostumusta muuttamalla pyritään säätämään analyysiolosuhteita niin, että analysoitavat komponentit erottuvat parhaalla mahdollisella tavalla.

Käänteisfaasinestekromatografiassa analysoitavien yhdisteiden täytyy olla neutraaleja molekyyleja. Eluentin poolisuuden lisääminen kasvattaa neutraalien yhdisteiden reten-

tioaikaa. (Jaarinen & Niiranen 2005, 160 -161.) Heikot hapot ja emäkset esiintyvät vesiliuoksissa sekä ionisoituneina että molekyyli muodossa. Näiden muotojen keskinäinen esiintymissuhde riippuu liuoksen pH-arvosta ja yhdisteen pK_a -arvosta. pK_a -arvo ilmoittaa liuoksen pH-arvon, jossa puolet yhdisteestä on ionisoituneena ja puolet ionisoitumattomassa muodossa. (Rautio ym. 2013, 19.) Analyyttien ionisoituminen vaikuttaa merkittävästi niiden retentioon. Ionisoitumattomat yhdisteet sitoutuvat paremmin poolittomaan stationäärifaasiin. Ajoliuksena on yleensä puskuriliuos, koska pienetkin vaihtelut ajoliuoksen pH:ssa saattavat vaikuttaa merkittävästi analyyttien retentioon. (Rautio ym. 2013, 132.) Jos yhdiste on niin voimakas happo tai emäs, että se ionisoituu käytettävällä pH-alueella, voidaan soveltaa ioniparikromatografiaa, jossa eluentin joukkoon lisätään vastaioni analyyttille (Rautio ym. 2013, 157).

Menetelmän optimoinnissa ei kyetty löytämään sopivaa ajoliuosta ja siksi käyttöön valittiin kaupallinen ajoliuos. Huolena oli erityisesti odotettua suuremmat noradrenaliinipiikit. Tämän syynä saattoi olla, että noradrenaliinin kanssa yhtä aikaa retentoitui jokin toinen yhdiste. Useilla kokeilla ajoliuksilla ongelmana oli myös, että dopamiinin metaboliitti DOPAC ja menetelmässä käytetty sisäinen standardi eivät erottuneet riittävästi toisistaan. Menetelmän optimointia olisi haluttu jatkaa, mutta siihen ei voitu käyttää enempää aikaa. Kaupallinen ajoliuos oli turvallinen valinta.

Virtausnopeus valittiin ajoliuoksen ominaisuuksien mukaan. Ajoliuoksen viskositeetti sekä kolonnin ja stationäärifaasin ominaisuudet määräävät mahdollisen virtausnopeuden. (Jaarinen & Niiranen 2005, 162 – 163.) Menetelmän optimoinnissa kokeiltiin eri virtausnopeuksia omien ajoliuosten kanssa. Mitä suurempi virtausnopeus oli, sitä nopeammin yhdisteet eluoiuivat. Samalla taustapaine kasvoi. Kaupallisen ajoliuoksen kanssa käytettiin virtausnopeutta 1,0 ml/min, jonka totesimme hyväksi. Ajoaika valittiin niin, että kaikki tutkittavat yhdisteet retentoituivat riittävästi. Näytteensyöttäjän ja kolonniunin lämpötilaa ei muutettu.

Todistimme referenssiaineiden puhtasliuoksilla noradrenaliinin, adrenaliinin, dopamiinin ja sisäisen standardin retentioajat näissä ajo-olosuhteissa sekä muutimme ne menetelmäohjeeseen. Todistimme myös, että katekoliamiinien dihydroksyloidut metaboliitit DOPAC ja DHPG eivät näy näissä ajo-olosuhteissa, eivätkä häiritse määrittystä.

Menetelmän optimoinnissa tultiin yhteisymmärrykseen siitä, että ajoliuosta voidaan kierättää, kun ajoliuoksen tilavuus on riittävän suuri verrattuna näytteiden injektio-tilavuuteen ja katekoliamiinipitoisuuteen. Tällöin pohjaviivan laatua ja nollanäytteitä täytyy kuitenkin

tarkkailla erityisen huolellisesti. Käytännössä ajoliuos ohjattiin jättepulloon tämän projektin aikana, koska pohjaviivan laatu oli kriittinen riittävän herkkyuden kannalta. Ajoliuoksen kierrättäminen mahdollisuuksien mukaan haluttiin kuitenkin pitää vaihtoehtona menetelmäohjeessa, koska se on taloudellista ja myös vähentää liuotinjätteen määrää.

6.2 Herkkyuden parantaminen

Katekoliamiinien analytiikan suurimpia haasteita on niiden pienet pitoisuudet biologisissa näytteissä (Bicker ym. 2013). Terveysthuollon käyttämässä katekoliamiinien analytikassa riittää, että pystytään erottamaan patologiset katekoliamiinien pitoisuudet fysiologisista. Tutkittavissa plasmanäytteissä odotettiin olevan fysiologisia pitoisuuksia katekoliamiineja ja haluttiin pystyä vertailmaan näitä pitoisuuksia luotettavasti. Edeltävissä tutkimuksissa tutkimusasetelma oli ollut erilainen ja tämän takia käytössä ollut mittausalue ei soveltunut nyt odotettaville tuloksille. Menetelmän optimoinnissa tutkittiin mittausalueen LLOQ:ta eli kvantitoinnin alarajaa useilla matalan pitoisuuden rinnakkaisilla kontrollinäytteillä. Tämän perusteella menetelmään tehtiin muutoksia herkkyuden parantamiseksi.

Näytteen injektioilavuutta suurennettiin suuremman vasteen saamiseksi. Injektioilavuuden kasvattaminen leventää piikkejä jonkin verran, mikä ei ole toivottua. Tämä johtuu siitä, että pienempi näytevolyymi kulkee kolonnin läpi nopeammin kuin suurempi näytevolyymi (Jaarinen & Niiranen 2005, 174).

Uuttotilavuutta etikkahappoon pienennettiin näytteiden katekoliamiinipitoisuuden konsentroimiseksi ja paremman herkkyuden saavuttamiseksi. Haittapuolena pipetointi alumiinioksidisuutossa täytyi olla nyt entistä tarkempaa HPLC-kolonnin suojelemiseksi alumiinioksidisakalta. Analysoinnissa jouduttiinkin vaihtamaan esikolonne huomattavasti useammin kuin ennen. Haasteeksi voidaan myös listata, että tämä näytetilavuus riittää vain yhteen injektioon. Olikin erittäin tärkeää, että näytteille oli otettu varaputket, jotta ne voitiin tarvittaessa analysoida uudestaan.

Chromeleon-ohjelmaan pyrittiin löytämään sellaiset parametrit, että ohjelma pystyisi automaattisesti integroimaan kaikki piikit. Toistaiseksi jouduttiin vielä käyttämään paljon manuaalista integrointia, mutta työ automaattisen integroinnin hyödyntämiseksi tulevissa projekteissa jatkuu.

Menetelmän optimoinnin myötä menetelmän herkkyys parani huomattavasti ja saavutettu mittausalue oli optimaalinen tämän tutkimushankkeen plasmannäytteiden noradrenaliinipitoisuuden määrittämiselle. Suuri osa tutkimushankkeen plasmanäytteiden adrenaliinipitoisuuksista jäi kuitenkin alle saavutetun mittausalueen.

6.3 Standardit ja kontrollit

Menetelmän mittausalue todettiin lineaariseksi ensin puhtasaineliuosten laimennossarjalla (Liite 1) ja sen jälkeen uutetuilla standardeilla (Liite 2). Standardit haluttiin vastamaan mahdollisimman hyvin näytteiden odotettua pitoisuutta. Standardien pitoisuudet valittiin niin, että ne jakaantuvat kattavasti mittausalueelle, kuitenkin painottuen pieniin pitoisuuksiin. Aikaisemman menetelmäohjeen perusteella tiesimme, että menetelmä on lineaarinen ainakin kymmenen kertaa suurempiin pitoisuuksiin kuin mittausalueemme yläraja. Tässä tutkimuksessa odotimme pieniä pitoisuuksia ja halusimme, että lineaarisuuden osoitus kuvaa mahdollisimman hyvin menetelmän lineaarisuuden toteutumista tutkimusnäytteillä. Lineaarisuuden osoitukset puhtasaineliuoksilla toistettiin aina, kun valmistettiin uudet katekoliamiinien kanta- ja välilaimennokset.

Päivittäisessä työskentelyssä ja tulosten laskemisessa käytettiin yhden pisteen kalibrointia. Tulosten laskemiseen käytettävä standardinäyte uutetaan ja ajetaan päivittäin näytesarjan mukana. Tulosten laskemiseen käytettävä standardi valittiin sijoittumaan mittausalueen puoliväliin (2,5 nM). Laatukontrollien pitoisuuksien valintaan ohjasivat Bioanalyttisen laboratorion vakioidut toimintaohjeet. Käytimme pienen pitoisuuden kontrollia (0,4 nM) ja suuren pitoisuuden kontrollia (3,0 nM). Jokaisessa näytesarjassa oli ainakin yksi kontrollinäyte. Käytännössä pyrimme siihen, että jokaisessa näytesarjassa olisi sekä pienen että suuren pitoisuuden kontrollinäyte.

Standardit ja laatukontrollit valmistettiin kaupalliseen lääkevapaaseen K₂EDTA-plasmaan. Kaupallisesta plasmasta tehtiin katekoliamiinivapaata seisottamalla sitä huoneenlämmössä päivänvalossa. Jokaisessa sarjassa oli myös blank-näyte, jolla varmennettiin, että kaupallisessa plasmassa ei ole jäljellä endogeenisiä katekoliamiineja, eikä näytteenkäsittelyssä tai analysoinnissa ole tapahtunut näytteiden kontaminoitumista katekoliamiineilla.

Katekoliamiinien menetystä näytteenkäsittelyssä kontrolloitiin sisäisen standardin avulla, joka pipetoitiin jokaiseen näytteeseen, standardiin ja laatukontrolliin ennen alumiinioksiduuttoa. Näytteet, joissa sisäisen standardin pitoisuus oli poikkeava, hylättiin ja tehtiin uudestaan.

6.4 Muuta huomioitavaa

Menetelmäohjeen laitteet ja tarvikkeet -kappale tarkistettiin ja siihen lisättiin vialien ja inserttien tiedot. Menetelmän optimoinnin yhteydessä käytössä oli lasisia näytteesyöttäjäpulloja ja -inserttejä. Menetelmäohjeen kirjoittamisen yhteydessä tutkittiin lasi- ja muovivialien eroja pienimuotoisesti, koska katekoliamiinien mahdollinen adsorboitumisesta lasiin aiheutti huolta. Eroja lasi- ja muovivialien välillä ei pidetty merkittäviä ja lasivialien käyttöä jatkettiin. Mitatut pitoisuudet näyttivät kuitenkin olevan säännönmukaisesti hieman suurempia muovivialeja käytettäessä. Tätä voisi jatkossa tutkia lisää.

Menetelmän optimoinnissa kohdattiin ongelmia nollanäytteiden kontaminoitumisella katekoliamiineilla. Kontaminaation lähde ei selvinnyt, mutta alumiinioksiduutossa opittiin kiinnittämään erityistä huomiota aseptiikkaan. Pipetoidessa käytettiin kertakäyttöisiä kärsineitä, kertakäyttöisiä pipetin kärkiä ja varottiin koskemasta pipetillä näyteastiaa, jos pipetoitiin jotakin reagenssia samalla kärjellä useaan näyteastiaan. Erityisesti väkevien kantaliuosten käsittelyssä tuli varoa, että käytettävät pipetit eivät joutuneet suoraan kosketukseen katekoliamiiniliuosten kanssa. Suodattimellisten kärkien käyttöä pohdittiin, mutta niitä ei koettu tarpeellisiksi, sillä kontaminaation ei uskottu tulevan pipetin sisältä. Haluttaessa niitä voitaisiin kuitenkin käyttää varotoimena väkevien kantaliuosten pipetoinnissa. Suodattimelliset kärjet ovat kalliimpia kuin tavalliset. Sen sijaan pipetin kärjen ulkoreunan puhdistamisesta pipetointien välillä koettiin hyödylliseksi, etenkin pipetoitaessa kantaliuoksien välilaimennoksia kapeista 15 ml Falcon-putkista. Kromatografiin oli ohjelmoitu pesu- ja puhdistustoimintoja, jotka estivät mahdolliset kontaminaatiot näytteesyöttäjän välityksellä näytteestä toiseen. Kromatografi esimerkiksi pesi näytteesyöttäjäneulan näytteiden välissä. Tarkemmat tiedot kromatografiaolosuhteista on liitetty menetelmäohjeeseen.

7 OPINNÄYTETYÖN TUOTOS: MENETELMÄOHJE 286

VERSIO 2

Tämän opinnäytetyön tuotoksena syntyi päivitetty menetelmäohje Turun yliopiston Bio­ lääketieteen laitoksen Bioanalyttiselle laboratoriolle (Liite 3). Menetelmäohje on asia­ kirja, jota noudattamalla varmistetaan, että validoinnin yhteydessä määritellyt luotetta­ vuuden kriteerit toteutuvat (Jaarinen & Niiranen 2005). Syntyneen menetelmäohjeen ra­ kenne perustuu Bioanalyttisen laboratorion vakioituihin toimitaohjeisiin eli SOP:in. Päi­ vitettyyn menetelmäohjeeseen korjattiin menetelmän optimoinnin yhteydessä tehdyt muutokset, jäsenneltiin menetelmäohjetta helppolukuisemmaksi, täsmennettiin ohjeita yksiselitteisemmiksi ja painotettiin näytteenkäsittelyssä ehdottomasti huomioitavia asi­ oita kuten näytteiden pitämistä kylmänä.

Menetelmäperiaatteeseen lisättiin, että menetelmä voi sopia myös dopamiinin määrittä­ miseen. Tällöin dopamiini täytyy kuitenkin lisätä standardeihin ja kontrolleihin. Menetel­ mähjeeseen lisättiin myös lyhyt kappale näytteille asetetuista vaatimuksista.

Liuosten valmistusohjeita yhdenmukaistettiin ja tarkennettiin selkeyden vuoksi. Liuosten valmistusohjeista käy nyt myös ilmi vaadittu mittaustarkkuus. Liuokset-kappale supistui, kun siirryimme kaupalliseen ajoliuokseen itse valmistetun ajoliuoksen sijasta. Luettelo laitteista ja tarvikkeista sekä kemikaaliluettelo tarkistettiin ja päivitettiin.

Määrittysarjassa on aina tutkimusnäytteiden lisäksi mukana yksi 2.5 nM standardinäyte tulosten laskemista varten ja ainakin yksi kontrolli. Blank-näyte eli nollanäyte tulee ajaa kerran päivässä ennen näyteajoja. Aiemmassa menetelmäohjeessa blank-näytteen li­ säksi ollut zero-näytettä ei pidetty tarpeellisena. Tässä menetelmässä blank (matrix) tarkoittaa katekoliamiinitonta humaaniplasmaa. Zero on blank-näyte, johon on lisätty si­ säinen standardi.

Aiemmassa menetelmäohjeessa standardien valmistus oli ohjeistettu niin, että standar­ dien lopputilavuus on 1000 mikrolitraa, joka vaaditaan näytteenkäsittelyyn. Näytteenkä­ sittelyssä todettiin, että standardeihin tarvitaan pieni hukkatilavuus pipetointia varten. Laskimme uusien standardien valmistusohjeet niin, että lopputilavuudeksi tuli 1100 mik­ rolitraa, jolloin siitä pystytään pipetoimaan tarkasti 1000 mikrolitraa näytteenkäsittelyyn.

Yhden pisteen kalibrointiin käytettävän standardin haluttiin olevan mittausalueen keskivaiheilta. Myös se laskettiin tarkan pipetoimisen mahdollistamiseksi siten, että lopputilavuudeksi tuli 1100 mikrolitraa.

Kontrolleja valmistettiin kerralla iso erä niiden tasalaatuisuuden takaamiseksi ja mittausvirheen minimoimiseksi. Kontrollit jaettiin kerta-annoksiin ja pakastettiin – 70 asteeseen. Valitettavasti pakastettu kontrollierä ei tällä kertaa vastannut odotuksia, vaan myöhemmin siirryttiin tekemään uudet kontrollit näytesarjojen mukana. Jatkossa suositellaan kuitenkin tekemään kerralla iso erä kontrollinäytteitä. Kun laatukontrollit pakastetaan samoihin olosuhteisiin kuin tutkimusnäytteet, voidaan ajatella kontrollien käyttäytyvän kuten tutkimusnäytteiden. Pakastamisen ei pitäisi kirjallisuuden eikä Bioanalyttisen laboratorion aiemman vankan kokemuksen perusteella vaikuttaa katekoliamiinien pitoisuuksiin.

8 POHDINTA

Opinnäytetyön tarve tuli työelämästä ja se toteutettiin tutkimuksellisella otteella moniammatillisessa työyhteisössä. Aihe oli haastava. Vastaavaa plasman katekoliamiinien analytiikkaa ei tällä hetkellä tehdä muualla Suomessa. Opinnäytetyössä syntyi uutta tietoa ja sillä oli selkeä kehittämistehtävä. Yhteistyö Bioanalyttisen laboratorion kanssa sujui hyvin ja toimeksiantaja oli tyytyväinen tehtyyn työhön.

Menetelmän optimointi vei arviotua enemmän aikaa, mutta se oli välttämätöntä ennen tutkimusnäytteiden analysointia. Menetelmän optimoinnissa ei syntynyt ajoliuosta, joka olisi vastannut tutkimuksen tarpeita. Analysoinnissa päädyttiin käyttämään kaupallista ajoliuosta ja kromatografiaolosuhteet valittiin tälle ajoliuokselle sopiviksi. Sen sijaan menetelmään tehtiin muita parannuksia. Uttotilavuuden pienentäminen ja injektio-tilavuuden suurentaminen mahdollistivat huomattavasti aiempaa pienempien pitoisuuksien määrittämisen. Kääntöpuolena pipetoimisen tarkkuuden merkitys kasvoi ja kolonnin rasitus lisääntyi. Saavutettu mittaosalue oli sopiva tämän tutkimushankkeen plasmanäytteiden noradrenaliinin määrittämiselle. Valitettavasti edes tämä herkkyys ei kuitenkaan riittänyt plasmanäytteiden adrenaliinipitoisuuksien luotettavaan vastaamiseen. Menetelmäohje päivitettiin vastaamaan menetelmän optimoinnissa tapahtuneita muutoksia. Tarpeettomiksi tulleet osiot poistettiin, muuttuneet osiot päivitettiin ja näytteenkäsittelyohje jäsenneltiin selkeämmäksi.

Projekti saatiin kunniakkaasti päätökseen keväällä 2019. Näytteiden analysoinnissa hyödynnettiin menetelmän optimoinnissa syntynyttä tietoa ja valmistunutta menetelmäohjetta.

Tulevaisuudessa voitaisiin muun muassa jatkaa työtä sopivan ajoliuoksen valmistamiseksi itse sekä pyrkiä kehittämään menetelmästä vielä aiempaa herkempi. Projektin lopuksi todettiin, että oksidaatiokennon vaihtamisesta uuteen voisi olla jonkin verran apua herkkyiden parantamisessa. Lisäksi voitaisiin tutkia lisää muovi- ja lasivialien eroja katekoliamiinien analytiikassa.

LÄHTEET

Anton, A. & Sayre D. 1962. A study of factors affecting the aluminium oxide-trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Vol. 138, No 3, 360-375. Viitattu 11.10.19 <http://jpet.aspetjournals.org/content/138/3/360.long>

Babisch, W. 2003. Stress hormones in the research on cardiovascular effects of noise. *Noise Health*. Vol. 5, 1-11. Viitattu 10.12.18. <http://www.noiseandhealth.org/text.asp?2003/5/18/1/31824>

Bicker, J.; Fortuna, A.; Alves, G. & Falcão, A. 2013. Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples. *Analytica Chimica Acta*. Viitattu 11.10.19. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.030>

Duodecim. 2018. Lääketieteen sanasto. Adsorboida. Viitattu 8.4.2019. https://www.terveyskirjasto.fi/kotisivut/tk.koti?p_artikkeli=ltt00029

Eisenhofer, G; Kopin, I. & Goldstein, D. 2004. Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine. *Pharmacological Reviews*. Vol 56, No 3, 331 – 349. Viitattu 15.08.19. <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/56/3/331>

Ganhao, M.; Hattingh, M.; Hurwitz, M. & Pitts, I. 1990. Evaluation of a simple plasma catecholamine extraction procedure prior to high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. *Journal of Chromatography*, Vol 564, No 1, 55-66. Viitattu 1.8.19. <https://www.sciencedirect.com.ezproxy.utu.fi/science/article/pii/0378434791800690>

Grouzmann, E. & Lamine, F. 2013. Determination of catecholamines in plasma and urine. *Best Practise and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*. Viitattu 15.10.19. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2013.06.004>

Hakala, J. 2004. Opinnäytetyöopas ammattikorkeakouluille. Helsinki. Gaudeamus Kirjapaino Oy.

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 1997. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki. Edita.

Jaarinen, S & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki. Edita.

Laki lääketieteellisestä tutkimuksesta. 9.4.1999/488. Finlex. Viitattu 15.09.19. <https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/1999/19990488>

Lamberg, B-A.; Koivisto, V. & Pelkonen, R.; 1992. Kliininen endokrinologia. Jyväskylä. Gummerus Kirjapaino Oy.

Lohi, O.; Jahnukainen, K.; Huttunen, P.; Taskinen, M.; Taskinen, S.; Pakarinen, M.; Koivusalo, A.; Rintala, R.; Kanerva, J.; Grönroos, M.; Heikinheimo, M. & Vettenranta, K. 2014. Lasten kiinteät kasvaimet. *Duodecim*. Viitattu 31.03.19. <https://www.duodecimlehti.fi/lehti/2014/20/duo11894>

Nienstedt, W.; Hänninen, O.; Arstila, A. & Björkqvist, S. 2004. Ihmisen fysiologia ja anatomia. WSOY.

Opetushallitus. Analyysimenetelmät. Viitattu 15.09.19. http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-6_nestekromatografia.html

Orpana, W. 2015. Menetelmäohje 286 v. 01. Bioanalyttinen laitos. FALL. Turun yliopisto.

Paronen, J.; Väisänen, M. & Leijon, H. 2003. Feokromosytooma voi olla salakavala tauti. Tapauselostus. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim*. Vol 129, No 22, 2375-2378.

Peaston, R. & Weinkove, C. 2004. Measurement of catecholamine and their metabolites. *Ann Clin Biochem.* Vol 41, No 1, 17–38. Viitattu 16.10.19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14713382>

Penttilä, I. 2004. Kliiniset laboratoriotutkimukset. Porvoo. WSOY.

Rautio, J.; Laine, K.; Jarho, P.; Wallèn, E.; Vuorensola, K.; Wikberg, T. & Lindeke, B. 2013. Farmaseuttisen kemian perusteet. Farmasian opiskelijayhdistys Fortis ry. Kuopio.

Ribeiro, J.; Fernandes, P.; Pereira, C. & Silva, F. 2016. Electrochemical sensors and biosensors for determination of catecholamine neurotransmitters. *Talanta.* Viitattu 01.08.19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27591662>

Solunetti. 2006a. Eksosytoosi. Viitattu 08.04.19. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/eksosytoosi/2/>

Solunetti. 2006b. Lisämunuainen, ydin. Viitattu 25.03.19. <http://www.solunetti.fi/fi/histologia/binjuremarg/>

Thermo Scientific. 2012. Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Series - Electrochemical Detector ECD-3000RS Operating Instructions (Original Operating Instructions).

Turku AMK:n intranet Messi. 2018. Opinnäytetyön lajit. Viitattu 9.4.19.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. 2012. Viitattu 15.9.2018. http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf

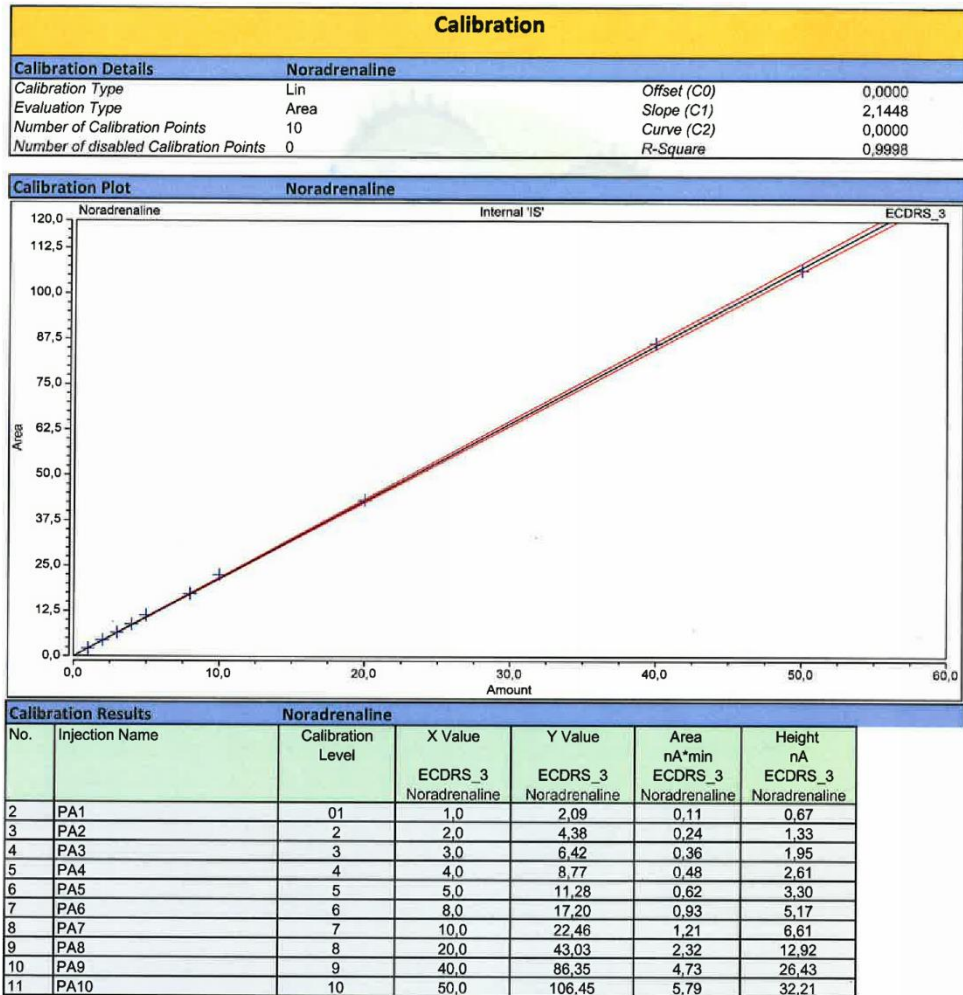
Vilka, H. & Airaksinen, T. 2004. Toiminnallinen opinnäytetyö. Helsinki. Tammi.

Välimäki, M.; Sane, T. & Dunkel, L. 2009. Endokrinologia. Hämeenlinna. Kustannus Oy Duodecim.

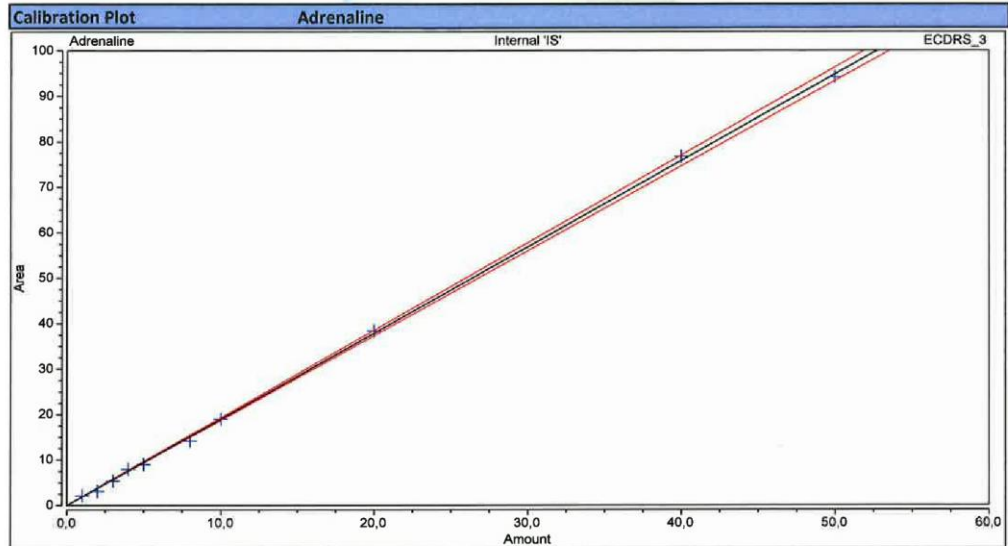
Liite 1: Mittausalueen osoitus lineariseksi puhdasaineilla

Instrument:ULTIMATE Sequence:20190206_PAsuora_DA

Page 1 of 1



Calibration			
Calibration Details		Adrenaline	
Calibration Type	Lin	Offset (C0)	0,0000
Evaluation Type	Area	Slope (C1)	1,8951
Number of Calibration Points	10	Curve (C2)	0,0000
Number of disabled Calibration Points	0	R-Square	0,9996

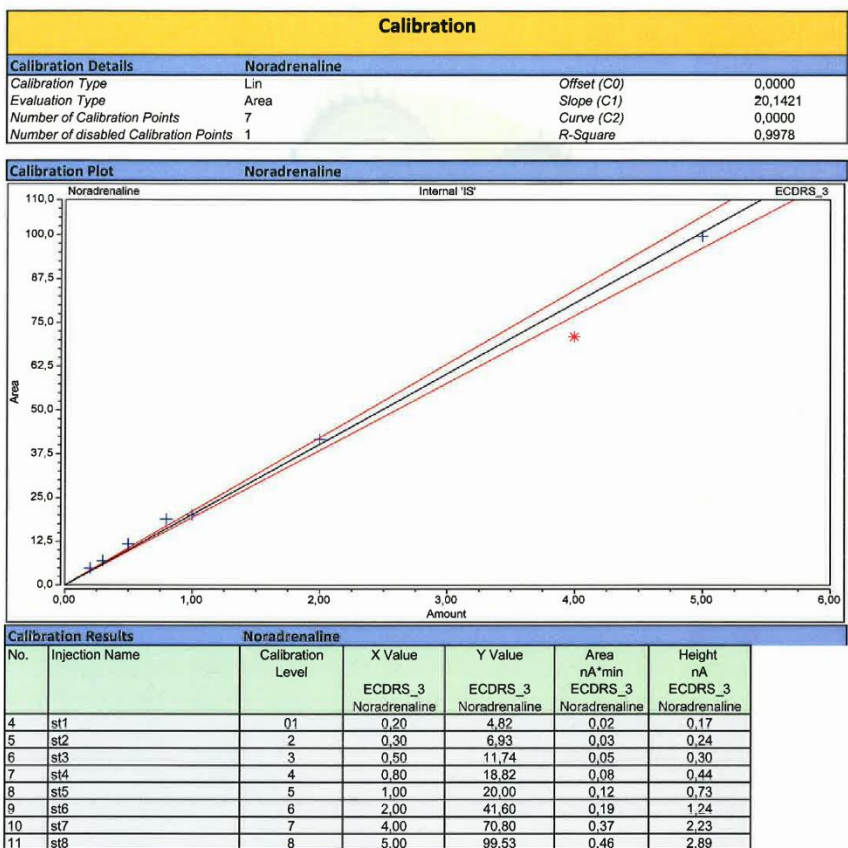


Calibration Results		Adrenaline				
No.	Injection Name	Calibration Level	X Value		Y Value	
			ECDRS_3 Adrenaline	ECDRS_3 Adrenaline	Area nA*min ECDRS_3 Adrenaline	Height nA ECDRS_3 Adrenaline
2	PA1	01	1,0	2,08	0,11	0,48
3	PA2	2	2,0	3,09	0,17	0,89
4	PA3	3	3,0	5,30	0,29	1,38
5	PA4	4	4,0	7,93	0,43	1,93
6	PA5	5	5,0	8,93	0,49	2,30
7	PA6	6	8,0	14,14	0,77	3,69
8	PA7	7	10,0	18,94	1,02	4,79
9	PA8	8	20,0	38,32	2,07	9,60
10	PA9	9	40,0	76,71	4,20	19,59
11	PA10	10	50,0	94,10	5,11	23,86

Liite 2: Mittausalueen lineaarisuuden osoitus humaaniplasmasta uutetuilla standardeilla

Instrument:ULTIMATE Sequence:20181214_standardit_KS

Page 1 of 1



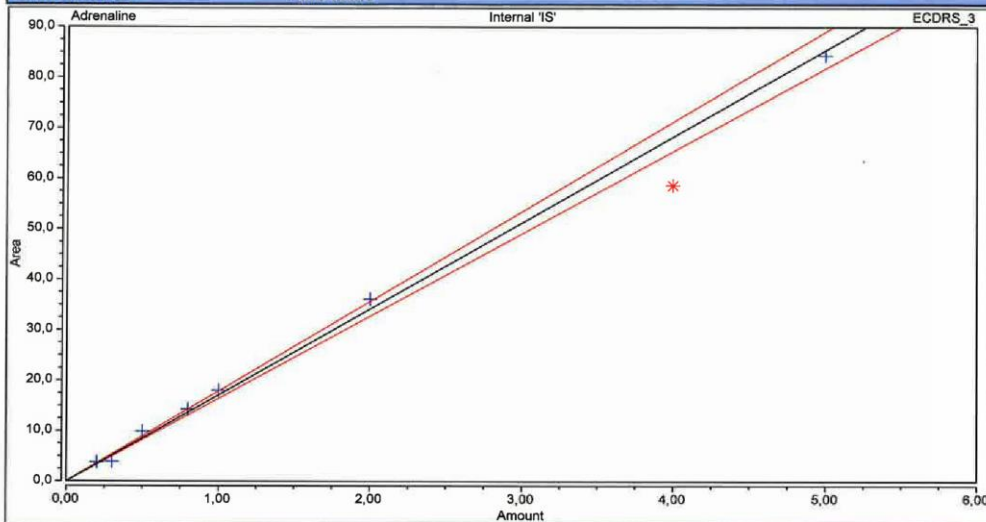
Default/Calibration

Chromleon (c) Dionex
Version 7.2.8.10783

Calibration

Calibration Details		Adrenaline	
Calibration Type	Lin	Offset (C0)	0,0000
Evaluation Type	Area	Slope (C1)	17,0852
Number of Calibration Points	7	Curve (C2)	0,0000
Number of disabled Calibration Points	1	R-Square	0,9981

Calibration Plot Adrenaline



Calibration Results Adrenaline

No.	Injection Name	Calibration Level	X Value		Y Value		Area nA*min ECDRS_3 Adrenaline	Height nA ECDRS_3 Adrenaline
			ECDRS_3 Adrenaline	ECDRS_3 Adrenaline	ECDRS_3 Adrenaline	ECDRS_3 Adrenaline		
4	st1	01	0,20	3,75	0,02	0,13		
5	st2	2	0,30	3,89	0,02	0,12		
6	st3	3	0,50	9,84	0,04	0,21		
7	st4	4	0,80	14,27	0,06	0,30		
8	st5	5	1,00	17,96	0,11	0,53		
9	st6	6	2,00	36,10	0,17	0,84		
10	st7	7	4,00	58,59	0,30	1,49		
11	st8	8	5,00	84,31	0,39	1,97		

Liite 3: Menetelmäohje 286 versio 02

Turun yliopisto
Biolääketieteen laitos
Bioanalyttinen laboratorio


MENETELMÄOHJE 286
versio 02

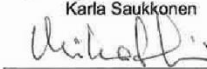
1(8)

MENETELMÄOHJE 286 Versio 02

Otettu käyttöön pvm 11.03.2019

Poistettu käytöstä pvm _____

Laatinut  04.03.19
Karla Saukkonen pvm

Hyväksynyt  11.03.2019
Mika Scheinin pvm

Virallinen kopio no /

Kopio (nro/pvm/pm) 13.03.2019 RS

KATEKOLIAMIINIEN MÄÄRITYS PLASMASTA HPLC-EC-LAITTEISTOLLA

SISÄLLYSLUETTELO

1	PERIAATE	2
2	LAITTEET JA TARVIKKEET	2
3	KEMIKAALIT	2
4	LIUOKSET	3
5	STANDARDIT JA KONTROLLIT	4
6	MÄÄRITYSSARJA	6
7	MÄÄRITYS	7
8	PIPETOINTIKAAVIO	8
9	TULOSTEN LASKEMINEN	8

1 PERIAATE

Katekoliamiinit (noradrenaliini ja adrenaliini) adsorboidaan plasmasta alumiinioksiidiin, josta ne uutetaan 2 % etikkahappoon. Pitoisuudet määritetään HPLC-EC:llä käyttäen sisäisen standardin menetelmää. Sisäisenä standardina käytetään 3,4-dihydroksibentsyyliamiinia. Menetelmää voidaan soveltaa myös plasman dopamiinipitoisuuden määrittämiseen.

2 LAITTEET JA TARVIKKEET

Analyysivaaka, Mettler Toledo AG135 (Mettler Instrumente AG)
Analyysivaakan printteri, Mettler Toledo LC-P45 (Mettler Instrumente AG)
Koeputkiravistelijä (Vortex)
Koeputkisekoittaja (FinePCR)
Finnpipette – pipettejä ja niihin kärkiä
Mikrosentrifuugiputkia (Eppendorf-putkia), 1,5 ml
15 ml ja 50 ml Falcon-putkia
Näyteensyöttäjäpullot (lasivialit 1,5 ml) ja insertit (Micro-Insert, 0,1 ml, kirkas lasi, 15 mm)
Mikrosentrifuugi Eppendorf 5415D
Sentrifuugi Eppendorf 5810R
pH-mittari, Mettler Toledo Seven compact pH/Ion S220

HPLC-EC-laitteisto

Thermo Scientific Ultimate 3000 ISO-3100BM HPLC-pumppu
Thermo Fisher Scientific WPS-3000RS automaattinen näyteensyöttäjä
Thermo Scientific Ultimate 3000 kolonniuuni
Chromleon 7.2 (tai uudempi) systeemiohjain
Thermo Scientific Dionex Ultimate ECD-3000RS koulometrinen detektor, jossa 6020RS omni coulometric sensor-elektrodi ja 6011RS ultra coulometric analytical sensor-kaksoiselektrodi (Thermo Fisher Scientific)
Kolonni: Thermo Scientific HR-80 C18 4,6 mm x 80 mm, 3 µm
Esikolonni: Phenomenex SecurityGuard C18 (2 esikolonnia peräkkäin), 4 mm x 3 mm (AJ0-4287)

3 KEMIKAALIT

Noradrenaliini, M = 169,2 g/mol (Sigma Aldrich, A7257)
Adrenaliini, M = 183,2 g/mol (Sigma Aldrich, E4250)
Dopamiini HCl, M= 189,6 g/mol (Sigma Aldrich, H8502)3,4 -
Dihydroksibentsyyliamiini HBr, M= 220,1 g/mol (Sigma Aldrich, 858781)
3,4 -Dihydroksifenyylietikkahappo, M=168,15 g/mol (Sigma Aldrich, 850217)
Natriummetabisulfiitti (Na₂S₂O₅), M= 190,1 g/mol (Fisher, S/5210/53)
Titriplex III, EDTA-Na₂, M= 372,2 g/mol (Merck, 1084180100)
Jäätikkahappo (CH₃COOH) reagentplus ≥ 99 % (Sigma Aldrich, A6283)
Tris-(hydroxymethyl)aminomethane, M=121,14 g/mol (Sigma Aldrich, T1378)
Aktivoitu alumiinioksidi (Al₂O₃), M=101,96 g/mol (Merck, 101814923)
HCl (Merck, 1.00317.1000)
Mobile Phase CAT-A-Phase II (Thermo Scientific, LOT: 070318)

4 LIUOKSET

Kaikki käytetty vesi on jälkipuhdistettua käänteisosmoosivettä, ellei toisin mainita.

5 mM Na₂S₂O₅ / 21,5 mM EDTA

Liuos valmistetaan 50 millilitran mittapullossa.
Punnitaan kevyessä astiassa 47,5 mg natriummetabisulfiittia ja 400 mg Titriplex III:a ja liuotetaan ne pieneen vesimäärään mittapullossa.
Täytetään mittapullo 50 millilitran merkkiviivaan asti.
Siirretään liuos puhtaaseen lasipulloon.

Liuos säilyy n. 1 kk jääkaapissa suljetussa lasipullossa.

1 % etikkahappo

Valmistetaan liuos 500 ml:n mittapullossa.
Täytetään mittapullo puolilleen vettä.
Pipetoidaan tai mitataan mittalasilla 5 millilitraa jäätikkahappoa ja liuotetaan se veteen mittapullossa.
Täytetään mittapullo 500 millilitran merkkiviivaan asti.
Siirretään liuos puhtaaseen lasipulloon

Liuos voidaan valmistaa myös mittalasitarkkuudella.

Liuos säilyy n. 1 kk huoneenlämmössä suljetussa lasipullossa.

2 % etikkahappo

Valmistetaan liuos 50 ml:n mittapullossa.
Täytetään mittapullo puolilleen vettä.
Pipetoidaan tai mitataan mittalasilla 1 millilitra jäätikkahappoa ja liuotetaan se veteen mittapullossa.
Täytetään mittapullo 50 millilitran merkkiviivaan asti.
Suodatetaan liuos Millipore-laitteistolla 0,22 µm suodattimen läpi.
Siirretään liuos puhtaaseen lasipulloon.

Liuos säilyy n. 1 kk huoneenlämmössä suljetussa lasipullossa.

Tris-puskuri

45,5 g Tris-(hydroxymethyl)aminomethane
500 ml vettä
pH 8.6 (väk. HCl)

Liuos valmistetaan 500 millilitran mittapullossa.
Punnitaan Tris ja liuotetaan se pieneen vesimäärään mittapullossa.
Täytetään mittapullo 500 millilitran merkkiviivaan asti.
Säädetään pH 8.6:ksi väkevällä suolahapolla.
Suodatetaan Millipore-laitteistolla 0,22 µm suodattimen läpi.
Jaetaan 5 x 100 ml lasipulloihin.

Liuos säilyy n. 1 kk jääkaapissa suljetussa lasipullossa.

5 STANDARDIT JA KONTROLLIT

Katekoliamiinien kantaliukset ja välilaimennokset säilyvät jääkaapissa valolta suojattuna n. 1 kk ajan.

Kaikki kantaliukset ja välilaimennokset tehdään mittapulloissa, jotka on huuhdottu ensin 1 % etikkahapolla. Kantaliukset ja välilaimennokset siirretään heti valmistamisen jälkeen kertakäyttöisiin Falcon-putkiin, jotka on myös huuhdottu 1 % etikkahapolla. Kantaliuosten ja välilaimennosten valmistuksessa voidaan varotoimena käyttää suodatimellisiä pipetin kärkiä pipettien suojelemiseksi mahdollisilta kontaminaatioilta.

Katekoliamiinit noradrenaliini ja adrenaliini

Katekoliamiinit 1 mM kantaliuos

Punnitaan 8,5 mg noradrenaliinia ja 9,2 mg adrenaliinia. Jos aiotaan määrittää myös dopamiinin pitoisuus, punnitaan lisäksi 11,7 mg dopamiinia (HCl).
Liuotetaan punnitut katekoliamiinit 1 % etikkahappoon 50 millilitran mittapullossa ja täytetään mittapullo merkkiviivaan asti. Siirretään kantaliuos 50 ml Falcon-putkeen.

Katekoliamiinit 500 nM välilaimennos

Pipetoidaan ja liuotetaan 25 µl noradrenaliinin 1 mM kantaliuosta ja 25 µl adrenaliinin 1 mM kantaliuosta 1 % etikkahappoon 50 millilitran mittapullossa. Täytetään mittapullo merkkiviivaan asti. Siirretään välilaimennos 50 ml Falcon-putkeen.

Katekoliamiinit 50 nM välilaimennos

Pipetoidaan ja liuotetaan 1 millilitra katekoliamiinien 500 nM välilaimennosta 1 % etikkahappoon 10 millilitran mittapullossa. Täytetään mittapullo merkkiviivaan asti. Siirretään välilaimennos 15 ml Falcon-putkeen.

Katekoliamiinit 5 nM välilaimennos

Pipetoidaan ja liuotetaan 1 millilitra katekoliamiinien 50 nM välilaimennosta 1 % etikkahappoon. 10 millilitran mittapullossa. Täytetään mittapullo merkkiviivaan asti. Siirretään välilaimennos 15 ml Falcon-putkeen.

Sisäinen standardi 3,4-dihydroksibentsyyliamiini (DHBA)

Sisäinen standardi 1 mM kantaliuos

Punnitaan 17,4 mg 3,4-dihydroksibentsyyliamiinia (HBr), liuotetaan se 1 % etikkahappoon 50 millilitran mittapullossa ja täytetään mittapullo merkkiviivaan asti.

Sisäinen standardi 500 nM välilaimennos

Pipetoidaan ja liuotetaan 25 µl sisäisen standardin 1 mM kantaliuosta 1 % etikkahappoon 50 millilitran mittapullossa ja täytetään mittapullo merkkiviivaan asti.

Sisäinen standardi 50 nM välilaimennos

Pipetoidaan ja liuotetaan 1 millilitra sisäisen standardin 500 nM välilaimennosta 1 % etikkahappoon 10 millilitran mittapullossa ja täytetään se merkkiviivaan asti.

Standardit menetelmän lineaarisuuden tarkastamista varten

Standardit 0.2 – 5.0 nmol/l menetelmän lineaarisuuden tarkastamista varten valmistetaan jäävesihauteessa pidettyihin mikrosentrifuugiputkiin lisäämällä katekoliamiinien väilaimennosta kylmään, katekoliamiinittomaan humaaniplasmaan seuraavan taulukon mukaisesti:

Lyhenne	Pit. (nM)	Katekoliamiinit (väilaimennos)	Plasma (µl)
St1	0.2	44 µl (5.0 nM)	1056
St2	0.3	66 µl (5.0 nM)	1034
St3	0.5	110 µl (5.0 nM)	990
St4	0.8	176 µl (5.0 nM)	924
St5	1.0	22 µl (50.0 nM)	1078
St6	2.0	44 µl (50.0 nM)	1056
St7	4.0	88 µl (50.0 nM)	1012
St8	5.0	110 µl (50.0 nM)	990

Pipetoimisen jälkeen standardit vorteksoidaan hyvin, pidetään kylmänä ja käsitellään analysointia varten heti.

Standardien matriisiksi pyritään hankkimaan EDTA-plasmaa, joka sisältää mahdollisimman vähän endogeenisiä katekoliamiineja. Katekoliamiinien määrää plasmassa voidaan vähentää esim. seisottamalla plasmaa huoneenlämmössä ja valoisassa. Kunkin matriisierän sisältämät katekoliamiinit pitää mitata ennen erän käyttöönottoa.

Standardi tulosten laskemista varten

Kun menetelmän lineaarisuus on tarkastettu, voidaan päivittäisessä työskentelyssä ja tulosten laskennassa käyttää ns. yhden pisteen menetelmää. Tulosten laskemista varten valmistetaan kussakin näytesarjassa yksi standardinäyte, jonka vahvuus on 2.5 nM. Se valmistetaan määrittämissarjojen käsittelyn yhteydessä mikrosentrifuugiputkessa lisäämällä 55 µl 50 nM katekoliamiinien väilaimennosta 1045 µl:aan kylmää humaaniplasmaa. Pipetoimisen jälkeen standardi vorteksoidaan hyvin, pidetään kylmänä ja käsitellään analysointia varten heti. Standardi käsitellään työohjeen mukaan kuten tutkimusnäytteetkin.

Kontrollit menetelmän toiminnan tarkastamista varten

Kontrollit (KA ja KB) ja Blank valmistetaan humaaniplasmaan. Niiden matriisiksi pyritään hankkimaan EDTA-plasmaa, joka sisältää mahdollisimman vähän endogeenisiä katekoliamiineja. Katekoliamiinien määrää plasmassa voidaan vähentää esim. seisottamalla plasmaa huoneenlämmössä ja valoisassa. Kunkin matriisierän sisältämät katekoliamiinit pitää mitata ennen erän käyttöönottoa.

Lyhenne	Pit. (nM)	Katekoliamiinit	Plasma (µl)
Blank	0	-	1000
KA	0.4	272 µl (50 nM)	33728
KB	3.0	204 µl (500 nM)	33796

Kontrollit valmistetaan kertakäyttöisiin Falcon-putkiin, jotka on ensin huuhdottu 1 % etikkahapolla. Kontrollit KA ja KB jaetaan 1,1 ml eriin mikrosentrifugiputkiin ja säilytetään -80 °C:ssa. Ennen käyttöönottoa kontrollit sulatetaan huoneenlämmössä valolta suojattuna. Sulamista seurataan tarkasti ja kontrollit laitetaan jäävesihauteeseen heti, kun ne ovat sulat.

Blank ja kontrollit käsitellään näytteenkäsittelyohjeen mukaan kuten tutkimusnäytteetkin. Blank-näytteeseen ei tule sisäistä standardia.

6 MÄÄRITYSSARJA

Blank-näyte ajetaan kerran päivässä. Määrityssarjassa ovat aina tutkimusnäytteiden lisäksi mukana 2.5 nM standardinäyte ja ainakin yksi kontrolli.

Näytteet

Määritykseen tarvitaan 1 millilitra EDTA-plasmaa. Jäävesihauteessa jäädytetyt EDTA-veriputket suositellaan sentrifugoitavan puolen tunnin kuluessa näytteenotosta + 4 °C:ssa. Näytteitä säilytetään -70 °C:ssa. Ennen käyttöönottoa näytteet sulatetaan varovasti huoneenlämmössä valolta suojattuna. Sulamista seurataan tarkasti ja näytteet laitetaan jäävesihauteeseen heti, kun ne ovat sulat. Mm. stressi, pystyasento, monet lääkeaineet ja jotkin ruoka-aineet, kuten banaani, suklaa ja vanilja voivat vaikuttaa plasman katekoliamiinien pitoisuuteen.

Kromatografia

HPLC-EC -olosuhteet on kuvattu tarkemmin tämän menetelmäohjeen liitteessä.

Virtausnopeus 1,000 ml / min
Injektioilavuus 50,00 µl
Autosamplerin lämpötila + 4 °C (± 1 °C)
Kolonneuunin lämpötila + 30 °C
Retentioajat (ohjeelliset):
Noradrenaliini 3,9 min
Adrenaliini 4,6 min
DHBA (IS) 6,9min
Dopamiini 9,2 min

Ohjeellisten retentioaikojen tunnistus on tehty menetelmän kehittämisympäristössä.

Menetelmän optimoinnin yhteydessä on varmistettu, että katekoliamiinien plasmassa esiintyvät aineenvaihduntatuotteet 3,4-dihydroksifenyylietikkahappo (DOPAC) ja DHPG eivät häiritse määrittystä.

Detektorin potentiaalit
ECDRS_1: + 350 mV
ECDRS_2: +250 mV
ECDRS_3: - 200 mV

Ensimmäinen kenno eli Omni cell on yhdistetty Peek-kapillaarilla pumpun ja injektorin väliin. Toisen kennon molemmat elektrodit ovat käytössä näytteiden hapettamiseen ja pelkistämiseen.

7 MÄÄRITYS

Näytteenkäsittely

Näytteenkäsittelyssä pyritään toimimaan niin, että näytteet eivät tarpeettomasti lämpene missään vaiheessa. Näytteenkäsittely viedään alusta loppuun yhtäjaksoisesti ilman taukoja. Näytteenkäsittelyssä noudatetaan erityistä huolellisuutta mahdollisten kontaminaatioiden välttämiseksi mm. puhdistamalla pipetin ulkopuoli ja vaihtamalla suojakäsineitä tarpeeksi usein.

1. Mikrosentrifuugiputkiin punnitaan n. 10 mg aktivoitua Al-oksidia.
2. Pipetoidaan mikrosentrifuugiputkiin Al-oksidin päälle 50 µl 5 mM Na-metabisulfiittia ja 60 µl 50 nM DHBA:ta sisäiseksi standardiksi (IS 3 nM). Lisätään putkiin 1000 µl plasmaa (näyte, kontrolli tai standardi) ja lopuksi 400 µl Tris-puskuria.
Huom. Blank-näytteeseen ei tule sisäistä standardia, vaan sen tilalle pipetoidaan 60 µl vettä.
3. Putket suljetaan ja kopautetaan alassuin, jotta Al-oksidi lähtee pohjalta liikkeelle.
4. Näyteputkia sekoitetaan FinePCR-laitteessa 10 minuuttia.
5. Näytteitä sentrifugoidaan Eppendorf Centrifuge 5415D:llä 2 min 13 000 rpm.
6. Alumiinioksidi pestään kaksi kertaa. Alumiinioksidin pesu tapahtuu pipetoimalla varovasti mutta tarkasti supernatantti pois, pipetoimalla jääkylmää vettä (noin 1 ml) alumiinioksidin päälle, vorteksoimalla ja sentrifugoimalla Eppendorf Centrifuge 5415D:llä 1 min 13 000 rpm. Pesujen jälkeen vesi pipetoidaan pois tarkasti ja varovasti.
7. Pipetoidaan alumiinioksidin päälle 100 µl 2 % etikkahappoa ja vorteksoidaan n. 10 sekuntia.
8. Sentrifugoidaan näytteet Eppendorf Centrifuge 5415D: llä 5 min 13 000 rpm.
9. Siirretään supernatantti uuteen mikrosentrifuugiputkeen. Varotaan pipetoimasta alumiinioksidisakkaa.
10. Sentrifugoidaan putkia Eppendorf Centrifuge 5415D:llä 1 min 13 000 rpm.
11. Siirretään näytteet näytteensyöttäjäpullohin, joissa on insertit ja sentrifugoidaan vielä 2 min 2000 rpm Eppendorf 5810R -sentrifuugilla.

Analysoidaan näytteet heti tai tarvittaessa säilytetään muutama päivä -20 °C:ssa. Pakastetut näytteet sulatetaan valolta suojattuna ja sentrifugoidaan ennen analyysiä 2 min 2000 rpm Eppendorf 5810R -sentrifuugilla.

HPLC

Ajoliuoksenä käytetään kaupallista Thermo Scientific Mobile Phase CAT-A-PHASE II -liuosta. Ajoliuosta kierrätetään. Haluttaessa ajoliuos voidaan myös ohjata jätepulloon näyteajojen aikana. Muussa tapauksessa pohjaviivaa ja Blank-näytettä tarkkaillaan erityisen huolellisesti ja ajoliuos vaihdetaan tarvittaessa. Ajoliuos säilytetään alkuperäisessä pakkauksessaan huoneenlämmössä.

8 PIPETOINTIKAAVIO

	Blank	Kontrollit	Standardi	Näyte
Al-oksidi	n. 10 mg	n. 10 mg	n. 10 mg	n. 10 mg
5 mM Na ₂ S ₂ O ₅	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
50 nM IS	-	60 µl	60 µl	60 µl
Plasma	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Tris-puskuri	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl

9 TULOSTEN LASKEMINEN

Mittaustulosteista lasketaan kunkin analyytin piikin pinta-alan suhde sisäisen standardin piikin pinta-alaan. Piikkien pinta-alojen määrittämiseen käytetään tarvittaessa manuaalista integrointia. Kalibrointikuvaaja esittää standardinäytteiden pinta-alasuhteet pitoisuuksien funktiona. Näytteiden pitoisuudet luetaan kalibrointikuvaajalta, joka on yhden pisteen (2.5 nM) ja origon kautta sovitettu suora. Laskemiseen käytetään Chromeleon 7.2 (tai uudempi versio) -ohjelmistoa.

Instrument Method: Catecholamine method 181116_1,0mlmin
 Last Update Operator: daalra

Script

Stage	Time min	Command	Value	Comment
Instrument Setup				
	initial	ECDRS.PostCellCleanDuration	10,00 [min]	
		ECDRS.ECC_ColumnOven.WaitForTempReady	Yes	
		ECDRS.ECC_ColumnOven.TemperatureNominal	30 [°C]	
		ECDRS.ECC_ColumnOven.TempCtrl	On	
		ECDRS.Data_Collection_Rate	10 [Hz]	
		Sampler.InjectWash	AfterDraw	
		Sampler.WashSpeed	20,000 [µl/s]	
		Sampler.WashVolume	100,000 [µl]	
		Sampler.SampleHeight	5,000 [mm]	
		Sampler.WasteSpeed	32,000 [µl/s]	
		Sampler.DispenseDelay	0,000 [s]	
		Sampler.DispSpeed	20,000 [µl/s]	
		Sampler.DrawSpeed	2,000 [µl/s]	
		Sampler.DrawDelay	5,000 [s]	
		Sampler.InjectMode	Normal	
		Sampler.PumpDevice	"Pump"	
		Sampler.LoopWashFactor	2,000	
		Sampler.TempCtrl	On	
		Sampler.Temperature.Nominal	4,0 [°C]	
		Sampler.ReadyTempDelta	1,0 [°C]	
		Sampler.Temperature.LowerLimit	4,0 [°C]	
		Sampler.Temperature.UpperLimit	45,0 [°C]	
		PumpModule.Pump.%A.Equate	"fosfaattipuskuri pH 3.1 "	
		PumpModule.Pump.Pressure.LowerLimit	20 [bar]	
		PumpModule.Pump.Pressure.UpperLimit	401 [bar]	
		PumpModule.Pump.MaximumFlowRampUp	5,001 [ml/min ²]	
		PumpModule.Pump.MaximumFlowRampDown	9,996 [ml/min ²]	
		ECDRS.ECDRS_1.Potential	350 [mV]	
		ECDRS.ECDRS_1.FilterConstant	5,0 [s]	
		ECDRS.ECDRS_1.CellClean	Off	
		ECDRS.ECDRS_1.CellCleanPotential	0 [mV]	
		ECDRS.ECDRS_1.CellCleanDuration	1,0 [s]	
		ECDRS.ECDRS_2.Potential	250 [mV]	
		ECDRS.ECDRS_2.FilterConstant	5,0 [s]	
		ECDRS.ECDRS_2.CellClean	Off	
		ECDRS.ECDRS_2.CellCleanPotential	0 [mV]	
		ECDRS.ECDRS_2.CellCleanDuration	1,0 [s]	
		ECDRS.ECDRS_3.Potential	-200 [mV]	
		ECDRS.ECDRS_3.FilterConstant	5,0 [s]	
		ECDRS.ECDRS_3.CellClean	Off	
		ECDRS.ECDRS_3.CellCleanPotential	0 [mV]	
		ECDRS.ECDRS_3.CellCleanDuration	1,0 [s]	
Inject Preparation				
	0,000	ECDRS.Autozero		

Instrument Method: Catecholamine method 181116_1.0mlmin
 Last Update Operator: daalra

Script

	Wait	ECDRS.Ready And Sampler.Ready And PumpModule.Pu mp.Ready
Inject	0,000	
	Sampler.Inject	
Start Run	0,000	
	ECDRS.ECDRS_1.AcqOn ECDRS.ECC_ColumnOven.AcqOn PumpModule.Pump.Pump_Pressure.AcqOn ECDRS.ECDRS_2.AcqOn ECDRS.ECDRS_3.AcqOn	
Run	0,000	Duration = 12,000 [min]
	PumpModule.Pump.Flow.Nominal PumpModule.Pump.Curve	1,000 [ml/min] 5
	12,000	
	PumpModule.Pump.Flow.Nominal PumpModule.Pump.Curve	1,000 [ml/min] 5
Stop Run	12,000	
	ECDRS.ECDRS_1.AcqOff ECDRS.ECC_ColumnOven.AcqOff PumpModule.Pump.Pump_Pressure.AcqOff ECDRS.ECDRS_2.AcqOff ECDRS.ECDRS_3.AcqOff	
End		