

Reetta Uusalo

# Kiinteäydinkolonnin käyttö lääkeaineiden määrityksessä

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Laboratorioanalyttikko  
Laboratorioalan koulutusohjelma  
Opinnäytetyö  
3.11.2011

## **Alkulause**

Tämä opinnäytetyö tehtiin Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n huume-, lääkeaine- ja dopinganalytiikan osastolla. Haluan kiittää sekä kemisti Arja Heiskasta että yliopettaja Jukka Niirasta opinnäytetyöni ohjaamisesta ja työhön kannustamisesta. Kiitokset myös koko osaston työntekijöille, jotka neuvoivat ja opastivat minua työni eri vaiheissa.

Kiitos myös perheelle ja ystäville tuesta ja kannustuksesta.

Helsingissä 3.11.2011

Reetta Uusalo

Tekijä Otsikko	Reetta Uusalo Kiinteäydinkolonnin käyttö lääkeaineiden määrittämisessä
Sivumäärä Aika	37 sivua + 3 liitettä 3.11.2011
Tutkinto	Laboratorioanalyytikko
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaajat	yliopettaja Jukka Niiranen kemisti Arja Heiskanen
<p>Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia uudenlaisen kolonnityypin, kiinteäydinkolonnin, käyttöä lääkeainemäärittämisessä. Kiinteäydinkolonnin sanotaan nopeuttavan analyysia ja sen avulla saatavan parempia ja tarkempia tuloksia. Kiinteäydinkolonnin partikkelit ovat erilaisia kuin perinteisissä nestekromatografian kolonneissa, ja se mahdollistaa parannukset vanhoihin menetelmiin.</p> <p>Tässä opinnäytetyössä tutkittiin kiinteäydinkolonnin käyttöä kahdessa erilaisessa analyysissa. Ensimmäinen analyysi oli seulonta, jossa saatiin selville minkälaisia bentsodiatsepeineja, opioideja ja niiden kaltaisia yhdisteitä potilas on syönyt esimerkiksi myrkytystapauksissa. Tämän analyysin osalta keskityttiin testaamaan vain ajo-olosuhteita.</p> <p>Toinen analyysi koski epilepsialääkkeinä käytettyjen antikonvulsanttien määrittämistä seerumista. Tämän analyysin osalta testattiin ensin ajo-olosuhteita, jonka jälkeen menetelmä validoitiin. Validoitavia parametreja olivat täsmällisyys, toteamis- ja määrittämiss raja, spesifisyys ja selektiivisyys, häiriöalttius, herkkyys, tarkkuus, mittausepävarmuus ja näytteiden säilyvyys näytteensyöttäjässä.</p> <p>Bentsodiatsepiinien, opioidien ja niiden kaltaisten yhdisteiden kohdalla menetelmä todettiin toimivaksi, jos analyysi saadaan tehtyä samana päivänä kuin näytteet on uutettu. Jotkut yhdisteet alkoivat hajota aina enemmän mitä pidempään ne olivat liuotettuna ajoliuokseen. Tämän epäiltiin johtuvan ajoliuoksen happamuudesta.</p> <p>Antikonvulsanttien osalta validointi onnistui hyvin, muutkin menetelmälle asetetut tavoitteet saavutettiin. Näitä olivat ajoajan lyheneminen, piikkien symmetrisyys ja yhdisteiden erottuminen pohjaviivaan asti. Ajoaikaa saatiin lyhennettyä jopa puoleen entisestä, mikä on nopeuttanut analyysia huomattavasti.</p>	
Avainsanat	kiinteäydinkolonne, validointi, antikonvulsantti, bentsodiatsepiini, opioidi, nestekromatografia

Author Title	Reetta Uusalo Core-shell Technology in Determination of Drugs
Number of Pages Date	37 pages + 3 appendices 3 November 2011
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Jukka Niiranen, Senior Lecturer Arja Heiskanen, Chemist
<p>The objective of this thesis was to see if a new kind of liquid chromatography column would suit the determination of different kind of drugs. This column represents core-shell technology which is said to speed up the analysis and to bring in better and more accurate results. In core-shell technology the particles are different from those in conventional liquid chromatography columns, and it brings improvements to the old methods.</p> <p>This thesis investigated the use of a core-shell column in two different analyses of different kinds of drugs. The first analysis was a screening, which determines what kind of benzodiazepine, opioids and compounds similar to those the patient has taken for example in overdose cases. This analysis focused on testing only the conditions for analysis.</p> <p>The second analysis concerned the antiepileptic drugs called anticonvulsants and their determination in serum. First the conditions of analysis were tested and after that the method was validated. The validated parameters were accuracy, detection and quantification limits, specificity and selectivity, ruggedness, sensitivity, accuracy, measurement uncertainty and the stability of the samples in the sampler.</p> <p>For benzodiazepines, opioids and similar compounds the method was found to work, if the analysis is done on the same day as the samples are extracted. Some of the compounds began to decompose the longer they were dissolved in mobile phase. This is suspected to be due to mobile phase acidity.</p> <p>The validation for anticonvulsants was successful and the other goals set to method were achieved. These were the shortening of runtime, peak symmetry and base-line separation. The analyzing time was shortened by up to half from the former, which speeds up the analysis considerably.</p>	
Keywords	core-shell technology, validation, anticonvulsant, benzodiazepine, opioid, liquid chromatography

## Sisälllys

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Kiinteäydinkolonne	2
2.2	Tutkitut lääkeaineet	4
2.2.1	Bentsodiatsepiinit, opioidit ja samankaltaiset yhdisteet	4
2.2.2	Antikonvulsantit	9
2.3	Nestekromatografia	12
2.4	Validointi	13
3	Bentsodiatsepiinien ja opioidien seulonnan ajo-olosuhteiden testaus	16
3.1	Ajo-olosuhteet	16
3.2	Säilyvyyden testaus	18
4	Antikonvulsanttien määrittäminen seerumista	19
5	Validointitulokset	21
5.1	Täsmällisyys	21
5.2	Toteamisraja ja määrittämiss raja	23
5.3	Spesifisyys ja selektiivisyys	23
5.4	Häiriöalttius	25
5.5	Herkkyys	26
5.6	Tarkkuus	27
5.7	Mittausepävarmuus	29
5.8	Näytteiden säilyvyys näytteensyöttäjässä	30
6	Tulosten tarkastelu	31
6.1	Bentsodiatsepiinien, opioidien ja samankaltaisten yhdisteiden seulonta	31
6.2	Antikonvulsanttimenetelmän validointi	34
7	Päätelmät	36
	Lähteet	

## **Liitteet**

Liite 1: Herkkyyden määrittäminen (kalibrointisuorat ilman sisäistä standardia)

Liite 2: Tarkkuuden vertailu Waters Symmetry- ja Kinetex -kolonneilla

Liite 3: Tulokset täsmällisyyden ja tarkkuuden arviointiin

## 1 Johdanto

Tämä opinnäytetyö tehtiin Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n huume-, lääkeaine- ja dopinganalytiikan osastolla. Lääkeaineanalytiikan puolella tehdään paljon erilaisia lääkeaineiden kvantitatiivisia määryksiä seerumista ja kvalitatiivisia virtsasta. Tässä opinnäytetyössä päätavoitteena oli testata kiinteäydinkolonnin soveltuvuutta lääkeainemääryksiin, joissa näytematriisina on seerumi. Analyyseista mukana olivat epilepsialäkkeinä käytettyjen antikonvulsanttien määrytys seerumista sekä bentsodiatsepiinien, opioidien ja niiden kanssa samankaltaisten yhdisteiden seulonta seerumista.

Antikonvulsanttimääryksiä seerumista tehdään pääasiassa siksi, että potilas saisi oikeanlaisen ja oikeansuuruisen lääkityksen. Kun analysoidaan antikonvulsanttien pitoisuutta seerumissa nähdään onko lääkeaine metaboloitunut kokonaan vai eikö lääkettä näy elimistössä enää laisinkaan. Näytteet otetaan aamulla ennen lääkkeen nauttimista. Bentsodiatsepiineja, opioideja ja niiden kanssa samankaltaisia yhdisteitä seulotaan seerumista jotta voidaan todeta minkälaisia lääkkeitä potilas on käyttänyt esimerkiksi myrkytys- tai väärinkäyttötapauksissa. [1.]

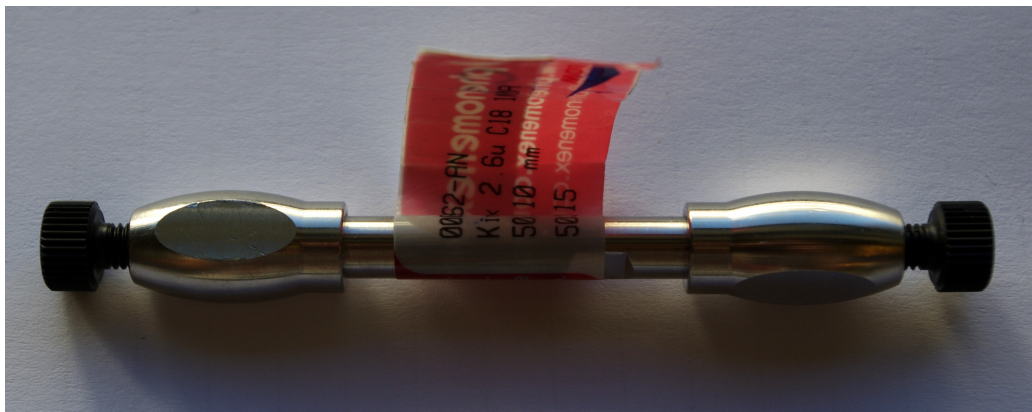
Opinnäytetyössä antikonvulsanttimenetelmän testaus tehtiin näytematriisissa, mutta bentsodiatsepiinien, opioidien ja niiden kaltaisten yhdisteiden osalta käytettiin puhdasaineita. Tämä siksi että antikonvulsanttimenetelmä tulisi rutiinikäyttöön heti, kun taas bentsodiatsepiinien, opioidien ja niiden kaltaisten yhdisteiden osalta kyseessä oli seulonta, ja menetelmän soveltuvuutta LC-MS -laitteelle tulevaisuudessa vasta tutkittiin.

Molemmilla analyyseilla oli muitakin tavoitteita. Bentsodiatsepiinien, opioidien ja niiden kaltaisten yhdisteiden osalta tavoitteena oli saada selville soveltuvatko kyseiset lääkeaineet kolonnin ajo-olosuhteisiin, kuten ajoliuosten happamuuteen ja kolonniin muodostuvaan paineeseen. Antikonvulsanttimenetelmän tavoitteena oli saada ajoaika alle 10 minuuttiin, piikit symmetrisiksi ja yhdisteet erottumaan pohjaviivaan asti.

## 2 Teoria

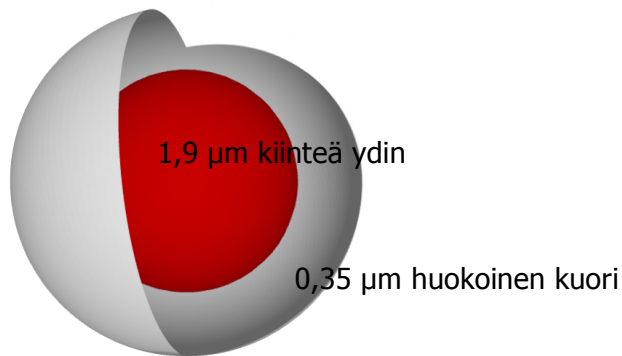
### 2.1 Kiinteäydinkolonne

Kiinteäydinkolonnit ovat HPLC-kolonniin (High Performance Liquid Chromatography) uusien sukupolvi. Useat eri kolonnivalmistajat ovat tuoneet markkinoille omat mallinsa. Tässä opinnäytetyössä käytettiin Phenomenexin Kinetex™ C18 2.6 µm -kolonna (kuva 1). Kiinteäydinkolonnit on kehitetty, koska UHPLC-laitteiden (Ultra High Performance Liquid Chromatography) kolonnit eivät nopeudestaan huolimatta ole aina paras ratkaisu biologisiin analyysiin, sillä usein käytetyn gradientin jyrkkyys on ratkaisevampaa tuloksissa, kuin partikkelinkoko. UHPLC-kolonneissa kokonaan huokoiset partikkelit ovat usein kooltaan  $\leq 2$  µm, mikä mahdollistaa nopean ajon, mutta UHPLC-laitteet ovat kuitenkin kustannuksiltaan kalliita, mutta lääkeaineanalyysissä suosittuja, koska niillä on saavutettu hyviä tuloksia lääkeaineiden metaboliittien analysoinnissa ja kvantitatiivisissa mittauksissa. Tutkimusten mukaan kiinteäydinkolonnit pärjäävät hyvin vertailuissa UHPLC-kolonneille. [2.]



Kuva 1. Phenomenex Kinetex -kolonne.

Perinteisissä HPLC-kolonneissa (partikkelikoko yleensä 3 tai 5 µm) tehokkuuden lisääntyminen ja ajoajan lyhentäminen tehdään usein resoluution ja herkkyuden kustannuksella. Jos taas käytetään pienempiä (<2 µm) partikkeleita, saadaan lyhyemmät ajoajat ja muita etuja mutta paineet nousevat erittäin korkeiksi ja vaatimukset laitteistoa kohtaan kasvavat. Kiinteäydinkolonnit ovat tuoneet ratkaisun näihin pulmiin. Kiinteäydinkolonneissa käytetään partikkeleita, jotka eivät ole kokonaan huokoisia vaan niissä on kiinteä ydin (kuva 2). [3]. Partikkelit koostuvat 0,35 µm paksuisesta huokoisesta kuoresta, joka ympäröi kiinteää ydintä.



Kuva 2. Kiinteäydinkolonnin partikkelit.

Koska partikkeli ei ole kokonaan huokoinen, analytti viettää vähemmän aikaa diffundoimalla sisään ja ulos huokosista kulkiessaan kolonnissa eteenpäin. Lyhyempi diffuusio mahdollistaa nopeamman aineensiirron. Tämän vuoksi kromatogrammeissa saadaan muun muassa kapeampia piikkejä. Partikkelit kiinteäydinkolonnissa ovat myös keskenään hyvin samankokoisia, mikä saa aikaan kapeampia piikkejä ja parempaa toistettavuutta analyysien kesken. [3.]

Kiinteäydinkolonne myös kestää pidempään, ja säilyttää tulosten tason paremmin verrattuna normaaliin kolonniin. Tämä näkyy myös monimutkaisemmissa matriiseissa, kuten seerumissa. Ikää pidentää myös vaihdettava esifilteri eli suodatin, joka poistaa partikkeleita ennen kolonnia vaikuttamatta paineeseen (kuva 3). Ajoliuoksia kuluu kiinteäydinkolonnissa käytettäessä vähemmän kuin tavallisilla kolonneilla. Tämä johtuu pienemmistä virtausnopeuksista. [3.]



Kuva 3. Esifilteri.

Kiinteäydinkolonneissa on erilaisia kiinteitä faaseja, mutta tässä opinnäytetyössä käytettiin C18-faasia. C18-faasissa osa silikan hydroksyyli-ryhmistä on korvattu oktadekyyli-ryhmillä, jolloin faasina toimii oktadekyyli-silaani. Tämä materiaali on pooliton ja ajoliuoksen tulee olla poolinen. Puhutaan usein myös käänteisfaasista (RP). [4.]

Tähän opinnäytetyöhön valittiin kiinteäydinkolonne, jotta lääkeaineiden seulonnassa saataisiin nopeammin tarkempia tuloksia. Antikonvulsanttien määrittämisessä nopeammasta ajoajasta on hyötyä pitkissä rutiinisarjoissa, jolloin saadaan laiteaikaa lyhennettyä.

## 2.2 Tutkitut lääkeaineet

### 2.2.1 Bentsodiatsepiinit, opioidit ja samankaltaiset yhdisteet

Bentsodiatsepiinit, opioidit ja niiden kaltaiset yhdisteet ovat usean lääkeaineen vaikuttavia ainesosia. Bentsodiatsepiineja käytetään erityyppisiin neuroottisiin oireisiin, joiden taustalla on usein jonkinlainen ahdistuneisuus ja tuskaisuus. Eniten bentsodiatsepiineja käytetään erilaisten unihäiriöiden hoitoon, jolloin valitaan pitkä- tai lyhytkestoinen lääke unihäiriön laadun mukaan. Bentsodiatsepiineja käytetään myös epileptisten kohtausten hoitoon, lihasrelaksanteina sekä anestesiassa. Useimmat niistä ovat myös yleisiä lääkkeiden väärinkäyttäjien ja lääkkeiden ja alkoholin sekakäyttäjien keskuudessa. Bentsodiatsepiinit ovat yhdisteitä, jotka sisältävät sekä bentseeni- että diatsepiinirenkaat. Bentsodiatsepiinit tyypillisesti lievittävät ahdistuneisuutta sekä tuskaisuutta ja tätä kutsutaan anksiolyyttiseksi vaikutukseksi. Toinen havaittu vaikutus bentsodiatsepiineilla on väsyttävä ja unta edistävä. Suurilla annoksilla bentsodiatsepiineja voi olla seurauksena amnesiaa tai muistamattomuutta. Bentsodiatsepiineilla on myös samoja rentouttavia vaikutuksia kuin lihasrelaksanteilla. [5.]

Bentsodiatsepiinien vaikutusmekanismi perustuu siihen, että ne sitoutuvat keskushermostossa GABA<sub>A</sub>-reseptoriin. GABA on inhibiittorinen välittäjäaine, jonka vaikutusta bentsodiatsepiinit edistävät. GABA:n vaikutus perustuu kloridi-ionin sisäänvirtaukseen ja hermosolun kalvon aktiopotentialin estoon, eli estetään hermoimpulsseja. [5.]

Bentsodiatsepiinit voidaan jakaa pitkävaikutteisiin, keskipitkävaikutteisiin ja lyhytvaikutteisiin niiden eliminaationopeuksien perusteella. Bentsodiatsepiinit imeytyvät ruuansulatuskanavasta suhteellisen nopeasti, millä on väliä etenkin kun niitä käytetään unilääkkeinä. Bentsodiatsepiinien metaboloitumiselle on tyypillistä se, että ne metaboloituvat täydellisesti maksassa muodostaen aktiivisia metaboliitteja. [5.]

Tavallisesti bentsodiatsepiinit ovat hyvin siedettyjä ja oikein käytettynä turvallisia lääkaineita. Haittavaikutuksina ilmenee kuitenkin esimerkiksi väsymystä ja lihasheikkoutta, jotka voivat haitata autolla ajoa tai hienomotoriikkaa vaativia tehtäviä. Väsyttävä vaikutus voi korostua käytettäessä esimerkiksi alkoholia. Bentsodiatsepiineille ei synny toleranssia samalla tavalla kuin vaikka opioideihin. Kuitenkin niiden käytön äkillinen lopetus voi aiheuttaa unettomuutta ja ahdistusta, jotka saavat helposti aloittamaan käytön uudelleen. Bentsodiatsepiinien pitkäaikaiskäytöstä syntyy riippuvuus ja kun käyttö lopetetaan, syntyy vieroitusoireita. Pitkäaikaiset käyttäjät eivät usein halua lopettaa lääkettä juuri näiden vieroitusoireiden pelossa. [5.]

Tässä opinnäytetyössä kehitettiin seulontamenetelmää taulukossa 1 esitetyille bentsodiatsepiineille ja niiden metaboliiteille.

Taulukko 1. Tutkitut bentsodiatsepiinit ja niiden metaboliitit (kaikki valmisteet eivät ole Suomessa myynnissä) [6, 7].

<b>Bentsodiatsepiini</b>	<b>CAS</b>	<b>Kauppanimet</b>	<b>Minkä hoitoon?</b>
Alpratsolaami	28981-97-7	Xanor, Alprox, Alprazolam	Masennukseen ja paniikkihäiriöiden hoitoon
Diatsepaami	439-14-5	Diapam, Valium, Diazepam, Medipam, Relapamil, Stesolid, Vertipam	Ahdistuneisuuteen, tuska- ja levottomuustiloihin, paniikkihäiriön hoitoon, unettomuuteen, epileptiseen kohtaukseen ja alkoholin vieroitusoireisiin sekä esilääkityksenä ennen kirurgisia ja diagnostisia toimenpiteitä
Nordiatsepaami <sup>a</sup>	1088-11-5	Nordaz	Ahdistuneisuuteen
Oksatsepaami	604-75-1	Opamox, Oxamin	Ahdistuneisuuteen ja unettomuuteen
Klobatsaami	22316-47-8	Frisium	Epilepsiaan
Norklobatsaami <sup>b</sup>	22316-55-8		

Klonatsepaami	1622-61-3	Rivatril	Epilepsiaan
Klooridiatsepoksidi	58-25-3	Risolid, Klotriptyl, Librax, Limbitrol	Ahdistuneisuuteen ja unettomuuteen
Loratsepaami	846-49-1	Temesta, Lorzepam	Jännitykseen, ahdistuneisuuteen ja unettomuuteen
Midatsolaami	59467-70-8	Dormicum, Midazolam	Unettomuuteen
Nitratsepaami	146-22-5	Insomin	Unettomuuteen ja epilepsiaan
Tsopikloni	43200-80-2	Zopinox, Imovane, Zobitabs, Zopiklon, Zopiclone	Unettomuuteen

- a diatsepaamin ja klooridiatsepoksidin metaboliitti, metaboloituu edelleen oksatsepaamiksi
- b klobatsaamin metaboliitti

Opioidi-nimitystä käytetään elimistön tuottamista opioidipeptideistä (mm. endorfiinit), alunperin oopiumunikosta saaduista oopiumalkaloideista (mm. morfiini ja kodeiini), puolisynteettisistä opioideista (mm. heroini, oksikodoni, hydrokodoni) ja synteettisistä opioideista (mm. metadoni, buprenorfiini, tramadoli).

Opioidien vaikutukset ovat seurausta erilaisten opioidireseptorien aktivoitumisesta. Eri-laisia reseptorityyppejä on kolme –  $\mu$ ,  $\delta$  ja  $\kappa$  – ja jokainen niistä on selektiivinen tietyille opioideille, riippuen siitä onko opioidi puhdas agonisti, osittainen agonisti vai antagonistti. Agonisti on kemiallinen yhdiste, joka toimii reseptorinaktivoijana, antagonistti taas on reseptorinsalpaaja. [5.]

Morfiini ja muut opioidit toimivat yleensä kivunlievittäjinä, mutta ne lievittävät myös emotionaalista kipua eli kärsimystä. Opioideja käytetään voimakkaan kivun lievitykseen, muun muassa leikkausten yhteydessä morfiinia. Opioideja annostellaan kivun voimakkuuden mukaan esimerkiksi laskimoon, selkäyttimeen, kielen alle tai peräsuoleen. Opioideista mm. kodeiinia käytetään yskänlääkkeenä. Opioideilla on myös voimakas ummettava vaikutus joten niitä käytetään myös ripulin estoon. Niillä on myös muita keskushermostollisia vaikutuksia. [5.]

Mitä nopeammin opioidin pitoisuus aivoissa kasvaa, sitä nopeampi ja voimakkaampi on hyvänolon tunne aivoissa. Myös henkilön muu elämäntilanne vaikuttaa euforian kehittymiseen; mitä enemmän henkilö on ahdistunut, sitä voimakkaampi on euforian tunne ja näin ollen potilaan olo helpottuu huomattavasti. Jos taas opioideja käytetään kivunlievityksessä euforian tunnetta harvemmin syntyy vaan jotkut henkilöt tulevat päinvas-toin levottomiksi. Euforiaa aiheuttavat ominaisuudet vaihtelevat selvästi eri opioidien välillä. Opioidit aiheuttavat jo ensimmäisestä annoksesta asti fyysistä riippuvuutta. Jos käyttö yhtäkkiä lopetetaan, kehittyy vieroitusoireita. [5.]

Tässä opinnäytetyössä kehitettiin seulontamenetelmää taulukossa 2 esitetyille opioideille ja niiden metaboliiteille.

Taulukko 2. Tutkitut opioidit ja niiden metaboliitit (kaikki valmisteet eivät ole Suomessa myyn-nissä) [6, 7].

<b>Opioidi</b>	<b>CAS</b>	<b>Kauppanimet</b>	<b>Minkä hoitoon?</b>
Buprenorfiini	52485-79-7	Temgesic, Subutex, Norspan, Subuxone	Kipuun ja korvaus- ja vieroitushoi-toon
Norbuprenorfiini <sup>a</sup>	78715-23-8		
Dihydrokodeiini	125-28-0	Paracodin	Voimakkaaseen kipuun ja yskään
Etyylimorfiini	76-58-4	Indalgin, Cocillana	Kuivaan yskään
Fenatsosiini	127-35-5	Prenadol, Narphin	
Fentanyyli	437-38-7	Sublimaze, Durogesic, Fentanyl Instanyl Matri-fen	Voimakkaaseen kipuun mm. syöpä-potilaille
3-metyyli-fentanyyli <sup>b</sup>	42045-86-3		
Norfentanyyli <sup>b</sup>	1609-66-1		
Hydromorfoni	466-99-9	Palladone, Dilaudid	Voimakkaaseen kipuun ja yskään
Kodeiini	76-57-3	Panacod, Resipect, Ge-palod, Codaxol, Codean, Ardinex	Kipuun ja yskään
Hydrokodoni <sup>c</sup>	125-29-1	Vicodin	Voimakkaaseen kipuun ja yskään
Metadoni	76-99-3	Dolmed	Vieroitus-, korvaus- ja ylläpito-hoi-toon

EDDP (2-etyliidiini-1,5-dimetyyli-3,3-difenyylipyrrolidini) <sup>d</sup>	30223-73-5		
Morfiini	57-27-2	Morphin, Depolan, Dolcotin	Lääketieteellisesti voimakkaaseen kipuun
Oksikodoni	76-42-6	Oxanest, Oxycontin, Oxynorm, Oxycodone, Targiniq	Leikkauksen jälkeiseen kipuun ja krooniseen kipuun
Oksimorfon <sup>e</sup>	76-41-5	Opana	Voimakkaaseen kipuun ja levottomuuteen
Petidiini	57-42-1	Dispadol, Dolestine	Kipulääkkeenä, erityisesti synnytyksessä
Tramadoli	27203-92-5	Tramal	Kohtalaiseen kipuun ja hermosärkyyn
O-Desmetyyli-tramadoli <sup>f</sup>	73986-53-5		
6-MAM <sup>g</sup>	2784-73-8		Yksi kolmesta diasetyylimorfiinin (heroiini) aktiivisesta metaboliitista

- a buprenorfiinin metaboliitti  
b fentanyylin metaboliitti  
c kodeiinin metaboliitti  
d metadonin metaboliitti  
e oksikodonin metaboliitti  
f tramadolin metaboliitti  
g heroiinin metaboliitti

Fysikaalis-kemiallisilta ominaisuuksiltaan samankaltaisia yhdisteitä bentsodiatsepiinien ja opioidien kanssa ovat metyyliifenidaatti, meprobamaatti ja dekstrometorfaani. Metyyliifenidaattia käytetään tarkkaavaisuushäiriöiden ja narkolepsian hoitoon. Se vapauttaa elimistöön noradrenaliinia kiihdyttämällä samalla hermosolujen viestintää, jolloin mieli valpastuu ja keskittymiskyky kasvaa [8]. Meprobamaatti on barbituraattien lähisukulainen, joka poistaa tuskaisuutta vaikuttamatta suorituskykyyn. Sen vaikutusmekanismi on samankaltainen kuin bentsodiatsepiineilla. Meprobamaattia ei enää juurikaan käytetä muuten kuin yhdistelmävalmisteiden osana [9]. Dekstrometorfaania (DMX) käytetään yskänlääkkeenä, sillä se sitoutuu aivojen yskäkeskukseen [10]. Yhdisteet on taulukoitu taulukkoon 3.

Taulukko 3. Metyylifenidaatti, meprobamaatti ja dekstrometorfaani [6, 7].

	<b>CAS</b>	<b>Kauppanimet</b>	<b>Minkä hoitoon?</b>
Metyylifenidaatti	113-45-1	Ritalin, Concerta, Medikinet, Equasym	Parantaa vireystilaa ja tarkkaavaisuutta
Ritaliinihappo <sup>a</sup>			
Meprobamaatti	57-53-4	Meprothal, Pentomat, Proponal, Anervan, Crampiton	Hysteriaan, neurooseihin, rauhatomuuteen
Dekstrometorfaani	125-71-3	Resilar, Redol, Rometor, Sir. Ephedrin	Yskään

a metyyllifenidaatin metaboliitti

## 2.2.2 Antikonvulsantit

Epilepsia on aivosolujen epänormaaliin purkaustoimintaan liittyvä oire, joka on aivoperäinen ja esiintyy kohtauksittain. Riippuu purkauksen lähtökohdasta ja leviämisestä aivoissa, miten epilepsia-kohtaus ilmenee. Epilepsiaan johtavan aivotoiminnan häiriön voivat aiheuttaa useat tunnetut tekijät, mutta useimmissa tapauksissa syytä kohtaukseen ei tiedetä. Joidenkin epilepsiatyyppien syyksi on nykyaikana löytynyt geenivirheitä, mutta ne kattavat vain pienen osan epilepsioista. [11]

Epilepsialääke on toimiva jos se on tehokas, pitkässäkin käytössä turvallinen, imeytyy hyvin suun kautta annosteltuna, sopii kerran vuorokaudessa otettavaksi eikä sillä ole yhteisvaikutuksia muiden lääkkeiden kanssa. Mikään nykyisistä epilepsialääkkeistä ei kuitenkaan täytä täysin näitä vaatimuksia. 1800-luvun lopussa todettiin rauhoittavien lääkkeiden vähentävän kohtauksia ja epilepsiapotilaita alettiin hoitaa ensin bromidilla ja 1900-luvun alussa barbituraateilla. Fenytoiini oli ensimmäinen epilepsialääke, jonka ei todettu alentavan potilaan vireyttä. Se tuli markkinoille 1930-luvulla. [5.]

Epilepsialääkkeet vaikuttavat bentsodiatsepiinien tavoin GABA-järjestelmään, mutta niillä on myös muita merkittäviä vaikutuskohteita. Jotkin lääkkeet myös vakauttavat solukalvon jännitettä vakauttamalla hermosolun lepojännitettä. Tällöin ne voivat estää epileptisen toiminnan leviämisen aivoissa. Antikonvulsantit nimitys tulee lääkkeiden ominaisuudesta estää kouristuksia, jotka kuitenkin eivät liity kaikkiin epileptisiin kohtauksiin. [5.]

Tässä opinnäytetyössä keskityttiin antikonvulsanteista karbamatsepiiniin, okskarbatsepiiniin, fenobarbitaaliin, fenytoiiniin, primidoniin, lamotrigiiniin ja niiden aktiivisiin metaboliitteihin.

Karbamatsepiinin vaikutus perustuu siihen, että se salpaa  $\text{Na}^+$ -kanavat ja estää  $\text{Na}^+$ -ionien sisäänvirtauksen.  $\text{Na}^+$ -kanavat ovat jänniteherkkiä ja näin saadaan hermosolun lepojännite vakautettua. Karbamatsepiini metaboloituu kokonaan maksassa, sillä on aktiivinen epoksidimetaboliitti. Sivuvaikutuksina karbamatsepiinilla voi olla esimerkiksi valkosolujen määrän väheneminen ja allergiset ihottumat. [5.]

Okskarbatsepiini on johdos karbamatsepiinista, sillä on aktiivinen 10-OH-metaboliitti, joka vastanee suurelta osin vaikutuksesta. Sen takia myös tässä opinnäytetyössä tutkittiin metaboliittin analysointia okskarbatsepiinin sijaan. Okskarbatsepiinin sivuvaikutukset ovat karbamatsepiinin tapaiset, joskin okskarbatsepiinia voi käyttää usein silloinkin, kun on kehittynyt allergiaa karbamatsepiinille. [5.]

Myös fenytoiiniin vaikutustapa on  $\text{Na}^+$ -ionien sisäänvirtauksen esto, jolloin jänniteherkkä hermosolu vakautuu. Fenytoiinin metaboloituminen tapahtuu maksassa. Fenytoiinista voi sivuvaikutuksena aiheutua muun muassa näköhäiriöitä. Fenytoiinilla on myös todettu yhteisvaikutuksia muiden lääkkeiden kanssa. Se johtuu muun muassa siitä, että fenytoiini vaikuttaa maksan lääkeaineita metaboloiviin entsyymeihin. Karbamatsepiini on syrjäyttänyt fenytoiinin aikuisiän epilepsian ensisijaisena lääkkeenä. [5.]

Fenobarbitaali vaikuttaa  $\text{GABA}_A$ -kloridikanaviin, kuten bentsodiatsepiinitkin. Fenobarbitaalilla on aivojen toimintaa hillitsevä vaikutus. Fenobarbitaalin metabolia tapahtuu myös maksassa, josta metaboliitit erittyvät virtsaan. Fenobarbitaalin käyttö epilepsian hoidossa ihmisillä on uudempien lääkkeiden myötä vähentynyt, sillä fenobarbitaalilla on

sivuvaikutuksia ja se heikentää muiden lääkkeiden tehoa. Eläinten epilepsialääkkeenä fenobarbitaali on yleinen. Fenobarbitaali on myös primidonin aktiivinen metaboliitti. Primidoni vaikuttaa samalla tavalla kuin fenobarbitaali ja sen haitta- ja yhteisvaikutukset ovat myös samanlaiset, sillä primidonin vaikutus perustuu fenobarbitaaliin. [5.]

Lamotrigiini vaikuttaa vähentämällä glutamaatin kiihdyttäviä vaikutuksia, eli se lamauttaa hermosolujen toimintaa aivoissa. Lamotrigiini aiheuttaa joissain tapauksissa vakavia ihoreaktioita. Muita lamotrigiinista aiheutuneita haittoja ovat muun muassa pahoinvointi ja vapina. [5.]

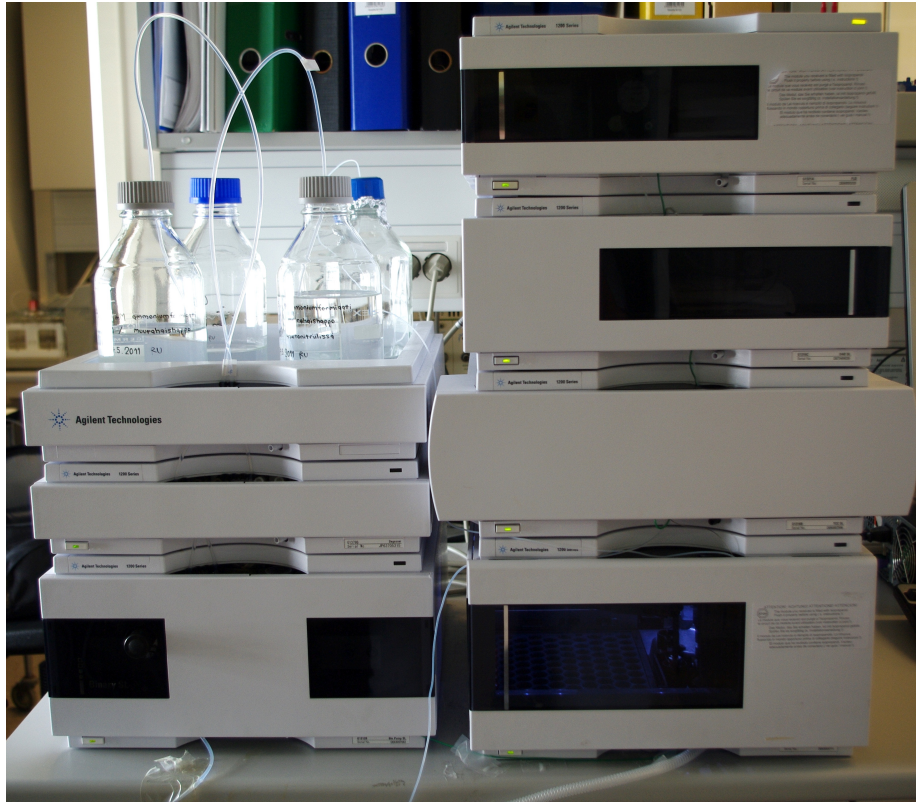
Tässä opinnäytetyössä tutkittujen antikonvulsanttien ominaisuuksia on alla olevassa taulukossa 4.

Taulukko 4. Antikonvulsantit ja niiden ominaisuudet.

<b>Yhdiste</b>	<b>CAS</b>	<b>Molekyylipaino</b>	<b>Kauppanimet</b>
Primidoni	125-33-7	218,3 g/mol	Liskantin, Resimatil
Lamotrigiini	84057-84-1	256,09 g/mol	Lamictal, Lamotrigin
10-OH-karbatsepiini	29331-92-8	254,29 g/mol	Okskarbatsepiinin metaboliitti
Fenobarbitaali	50-06-0	232,2 g/mol	Gardenal, Sedadrops, Solfoton
Karbamatsepiini	298-46-4	236,3 g/mol	Convuline, Tegretol, Timonil
Karbamatsepiiniepoksidi	36507-30-9	252,3 g/mol	Karbamatsepiinin metaboliitti
Fenytoiini	57-41-0	252,3 g/mol	Dantoin, Dilantin, Zentropil

### 2.3 Nestekromatografia

Lääkeaineiden saamiseksi erilleen toisistaan käytettiin nestekromatografiaa. Laitteistona toimi Agilent 1200 -sarjan nestekromatografi (kuva 4), detektorina oli diodirividetektor (DAD). Nestekromatografiin on liitetty tietokone, jossa on ChemStation-ohjelma.

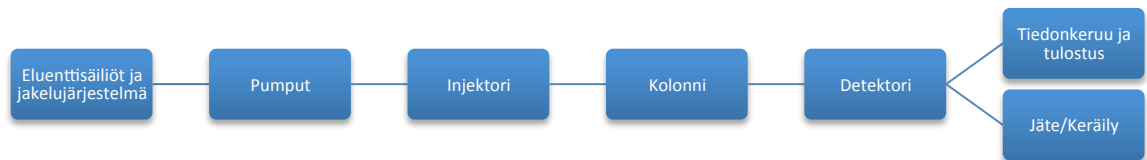


Kuva 4. Agilent 1200 Series HPLC-laitteisto.

Nestekromatografiaa käytetään paljon sekä epäorgaanisten että orgaanisten yhdisteiden analysointiin. Tällä, kuten muillakin kromatografisilla menetelmillä, voidaan määrittää monta analyyttiä samaan aikaan. Ainoa edellytys sille, että voidaan käyttää nestekromatografiaa on, että näyte saadaan liukenemaan johonkin liuottimeen.

Nestekromatografian toimintaperiaate on esitetty kuvassa 5. Näyte syötetään injektorin kautta nestefaasiin, joka liikkuu korkean paineen alaisena olevassa, kapeassa kapillaarissa. Näyte kulkee eluentin mukana kolonniin, joka on täytetty stationäärifaasilla. Mitä pienempiä ovat stationäärifaasin partikkelit, sitä tehokkaampaa on erottuminen. Jotta eluentti pääsee kulkemaan tiiviisti pakatun kolonnin läpi tasaisena virtana, tulee pumpun pumpata eluenttia sykkeettömästi korkeaa painetta vastaan. Näyte jakaantuu

komponenteiksi kulkiessaan kolonnin läpi eluentin mukana. Vuorollaan kukin komponentti tulee detektorille, joka mittaa yhdisteen signaalin ajan funktiona. [4.]



Kuva 5. Nestekromatografian toimintaperiaate.

## 2.4 Validointi

Menetelmän validoinnilla on tarkoitus osoittaa, että menetelmä täyttää sille asetetut vaatimukset. Seuraavaksi esitellään parametrit, joiden avulla menetelmän toimivuus voidaan osoittaa. Validoinnissa käytettiin useita eri ohjeita [12,13.]

### Täsmällisyys

Jos määritystä toistetaan useita kertoja, on tulosten oltava keskenään yhtäpitäviä eli täsmällisiä. Täsmällisyys liittyy tulosten väliseen hajontaan ja sitä arvioidaan keskihajonnan avulla. Täsmällisyys koostuu toistettavuudesta ja uusittavuudesta.

Toistettavuus tarkoittaa tulosten yhtäpitävyyttä lyhyellä aikavälillä samalla menetelmällä, saman tai eri tekijän toimesta, samoilla tai eri mittalaitteilla samassa laboratorioissa. Uusittavuus tarkoittaa tulosten yhtäpitävyyttä pitemmällä aikavälillä kun mittaukset suoritetaan samalla tai eri menetelmällä, eri mittalaitteilla, eri laboratorioissa ja eri tekijöiden toimesta. Uusittavuudessa vaihtelu on yleensä suurempaa kuin toistettavuudessa. Toistettavuutta ja uusittavuutta arvioidaan keskihajonnan (kaava 1) ja suhteellisen keskihajonnan (kaava 2) avulla.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (1)$$

$$CV\% = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (2)$$

missä  $s$  on keskihajonta,  $\bar{x}$  on keskiarvo ja  $n$  on tulosten lukumäärä.

Hajonta tuloksissa voi olla myös määrittäjäsarjan sisällä ja/tai sarjojen välillä. Sarjojen väliseen hajontaan vaikuttavat muun muassa muutokset kalibrointisuorassa, kun taas sarjan sisäiseen hajontaan vaikuttaa muun muassa kontaminaatio.

Toistettavuutta ja uusittavuutta tutkittiin analysoimalla matalan ja korkean tason kontrolleja samassa sarjassa 6 kertaa rinnakkain ja 6 kertaa eri sarjoissa. Sen jälkeen vertailtiin sarjojen sisäisiä ja välisiä keskihajontoja.

#### Toteamis- ja määrittäjäraja

Toteamisraja eli LOD (Limit of Detection), on pienin pitoisuus, jolla voidaan luotettavasti todeta, sisältääkö näyte tutkittavaa yhdistettä vai ei. Tämän takia toteamisrajan määrittäjä perustuu taustan hajonnan tutkimiseen. Kromatografisissa menetelmissä toteamisraja määritellään signaali/kohinasuhteen perusteella.

Määrittäjäraja LOQ (Limit of Quantitation) on pienin pitoisuus, jonka voidaan luotettavasti todeta poikkeavan pitoisuudeltaan merkittävästi nolasta. Määrittäjärajan tulee olla asetettu niin, että se antaa kyseisellä pitoisuudella luotettavia ja toistettavia tuloksia. Tällöin pitää ottaa huomioon erilaiset systemaattiset virheet, esimerkiksi matriisin vaikutus.

## Spesifisyys ja selektiivisyys

Spesifisyyskokeilla pyritään varmistumaan siitä, että mittauslaitteesta saatu vaste muodostuu vain yhdestä analyytistä. Menetelmä on selektiivinen, mikäli se tuottaa vasteen useammallekin yhdisteelle, mutta pystyy erottamaan tutkittavan yhdisteen aiheuttaman vasteen muista vasteista. Tässä opinnäytetyössä spesifisyyttä tutkittiin määrittelemällä muiden käytössä olevien antikonvulsanttien retentioajat, ja katsomalla tulevatko ne jonkun tässä analyysissä tutkitun antikonvulsantin kanssa päällekkäin. Selektiivisyyttä tutkittiin analysoimalla 6 eri henkilön lääkeaineetonta seerumia, ja katsomalla löytyykö sieltä häiritseviä tekijöitä.

## Häiriöalttius

Häiriöalttius kertoo menetelmän herkkyydestä erilaisille häiriöille. Luotettavan menetelmän häiriönsietokyky on hyvä eli pienet muutokset olosuhteissa eivät vaikuta tuloksiin. Menetelmän häiriöalttiutta testataan tekemällä pieniä muutoksia ainakin kolonnin lämpötilaan, virtausnopeuteen sekä ajoliuokseen ja tutkimalla niiden vaikutusta lopputulokseen.

## Herkkyyys

Herkkyyys on sellainen analyytin konsentraatio, joka aiheuttaa pienimmän havaittavan eron vasteessa. Kyseinen menetelmä on herkkä, kun pieni muutos pitoisuudessa aiheuttaa suuren muutoksen vasteessa. Kun käytetään lineaarista kalibrointia, herkkyyys on suoran kulmakerroin ja matemaattisesti määritettynä se on kalibrointikäyrän derivaatta.

## Tarkkuus

Menetelmän tarkkuus riippuu siitä, kuinka lähellä todellista arvoa mittaustulos on. Tarkkuus voidaan rinnastaa myös kokonaisvirheeseen eli systemaattisen virheen ja satunnaisvirheen summaan. Tarkkuutta voidaan arvioida useilla menetelmillä, mm. varmennetuilla vertailumateriaaleilla, takaisinsaantokokeilla, laboratorioden välisellä interkalibroinnilla sekä vertaamalla tuloksia jo validoidulla ja yleisesti hyväksytyllä menetelmällä.

## Mittausepävarmuus

Mittauksissa on aina satunnaisvirhettä, eli mittauksissa esiintyviä virheitä, joita ei voida poistaa toistamalla mittauksia. Systemaattiset virheet puolestaan on mahdollista havaita ja poistaa. Systemaattisen virheen seurauksena saatu analyysitulokset on aina liian suuri tai pieni. Systemaattinen virhe vaikuttaa aina tarkkuuteen. Mittausepävarmuus kertoo analyysin tulosalueen, jonka sisälle oikea arvo tietyllä todennäköisyydellä (yleensä 95 %) sijoittuu.

Mittausepävarmuus määritetään standardiepävarmuutena ja laajennettuna epävarmuutena. Standardiepävarmuudessa määrityksen tuloksen epävarmuus ilmaistaan keskihajontana. Laajennetussa epävarmuudessa pitoisuus ilmoitetaan määrityksen tuloksen luottamusvälinä, jonka voidaan olettaa pitävän sisällään suurimman osan testituloksista. Laajennettu epävarmuus lasketaan kertomalla yhdistetty standardiepävarmuus kattavuuskertoimella  $k$ . Kattavuuskertoimen  $k=2$  vastaa noin 95 % luottamusväliä.

## **3 Bentsodiatsepiinien ja opioidien seulonnan ajo-olosuhteiden testaus**

### 3.1 Ajo-olosuhteet

Tässä opinnäytetyössä ajo-olosuhteet pyrittiin saamaan sellaisiksi, että analyysi olisi tulevaisuudessa mahdollista siirtää LC-MS -laitteelle, jolloin seulontatulosten varmistaminen olisi helpompaa. Ajo-olosuhteita lähdettiin kokeilemaan aiemmin tehdyn julkaisun perusteella [14]. Siinä käytettiin detektoria lukuun ottamatta samanlaista LC-laitteistoa kuin tässä opinnäytetyössä. Gradientti (taulukko 5) valittiin artikkelin perusteella, samoin kuin ajoliuosten koostumukset, virtaus ja ajoaika. Ajoliuokset suodatettiin imusuodatuksella ennen käyttöä.

Taulukko 5. Liuosgradientti.

Aika (min)	A%	B%
0	90	10
1	90	10
3	60	40
4	30	70
6	10	90
6,5	10	90
7,5	90	10

Ajoliuos	A	2,5 mM ammoniumformiaatti/0.1 % muurahaishappo
	B	2,5 mM ammoniumformiaatti/0.1 % muurahaishappo 90 % asetonitriilissä
Virtaus		0,4 ml/min
Ajoaika		8 min
Kolonne		Kinetex 2,6 $\mu$ m, C18, 50*2,10 mm

Sisäiseksi standardiksi valittiin flunitratsepaami, jonka tutkittiin säilyvän ajoliuokseen liuotettuna hyvin. Mittausaallonpituuksina käytettiin 230 nm ja 280 nm.

Tutkittavista yhdisteistä valmistettiin laimennokset lääkeaineen kantaliuoksesta (1 mg/ml MeOH) ajoliuokseen, johon oli liuotettuna myös sisäinen standardi. Laimennokset ajettiin yksitellen HPLC:lla, jotta saatiin selville niiden retentioajat. Gradienttiajosta johtuen, joka sarjassa piti ajaa myös pelkkää ajoliuosta, jotta tausta saatiin vähennettyä kromatogrammeista.

### 3.2 Säilyvyyden testaus

Yhdisteet jaettiin retentioaikojen perusteella kuuteen ryhmään, joista tehtiin yhteiset laimennokset ja testattiin yhdisteiden säilyvyyttä ajoliuoksessa. Folkodiini oli omassa ryhmässään, sillä sen kantaliuos oli yskänlääke, ja sen kromatogrammissa oli häiritseviä piikkejä. Alpratsolaami ajettiin myös yksinään, sillä sen kantaliuos saatiin muita myöhemmin.

Ryhmä 1	morfiini, 6-MAM, tramadoli, dekstrometorfaani, desmetyylitramadoli, klonatsepaami
Ryhmä 2	oksimorfon, hydrokodoni, tsopikloni, fentanyyli, EDDP, metadoni
Ryhmä 3	hydromorfon, etyylimorfiini, metyylifenidaatti, midatsolaami, nitratsepaami, nordiatsepaami
Ryhmä 4	dihydrokodeiini, ritaliinihappo, petidiini, fenatsosiini, oksatsepaami, diatsepaami
Ryhmä 5	kodeiini, norfentanyyli, klooridiatsepoksidi, 3-metyylifentanyyli, norklobatsaami, klobatsaami
Ryhmä 6	oksikodoni, levorfanoli, norbuprenorfiini, buprenorfiini, loratsepaami, meprobamaatti
Ryhmä 7	folkodiini
Ryhmä 8	alpratsolaami

Yhdisteet ajettiin kahtena peräkkäisenä päivänä, ja verrattiin piikkien korkeuksia ja kromatogrammeja yleisesti toisiinsa, jotta nähdään oliko yhdiste alkanut jo hajota.

#### 4 Antikonvulsanttien määrittys seerumista

Antikonvulsanttien määrittys seerumista on rutiinimäärittys, joka tehdään useasti viikossa. Näytteitä on sarjassa tavallisesti 20-50 kappaletta ja niistä tehdään useimmiten 10-OH-karbatsepiini, karbamatsepiini, karbamatsepiiniepoksidi ja lamotrigiini, fenobarbitaali määritetään keskimäärin kolme kertaa viikossa, yleensä eläinperäisestä näytteestä. Muita antikonvulsantteja määritetään harvemmin kuin kerran viikossa.

Näytteen esikäsittely tehtiin käytössä olevan SOP-ohjeen mukaan. Esikäsittelymenetelmänä oli neste-nesteuutto etyyliasetaatilla ja liuotus ajoliuokseen. Kuvassa nähdään näytteen esikäsittely vaihe vaiheelta. Neste-nesteuutossa saadaan antikonvulsantit seerumista etyyliasetaattiin, joka haihdutetaan ilmahaihdutuksessa noin 45°C. Tämän jälkeen liuotetaan haihdutusjäännös 200 µl suodatettua ajoliuosta.



Kuva 6. Näytteen esikäsittely.

Antikonvulsanttimenetelmässä käytetään neljän pisteen kalibrointisuoraa. Standardien pitoisuudet on taulukoitu alla (taulukko 6). Jos näytteen pitoisuus ylittää kalibrointisuoran ylimmän standardin pitoisuuden, laimennetaan se fysiologisella keittoliuoksella (0,9 % NaCl). Jokaisen kalibrointisuoran korrelaatiokertoimen (R) on oltava vähintään 0,998. Muuten uutto tehdään uudestaan, koska tuloksia ei voida pitää luotettavina.

Taulukko 6. Standardien pitoisuudet ( $\mu\text{mol/l}$ ).

	Primidoni	10-OH-karbatsepiini	Fenobarbitaali	Karbamatsepiiniepoksidi	Karbamatsepiini	Fenytoiini	Lamotrigiini
st1	9,2	9,8	10,8	1,98	6,3	9,9	2
st2	22,9	35,4	53,8	3,96	16,9	23,8	11,7
st3	41,2	78,7	107,7	7,93	42,3	79,3	31,3
st4	80,2	133,9	172,2	11,89	63,5	118,9	58,7

Sarjojen yhteydessä tehdään myös matalan ja korkean tason kontrollit kaikille yhdisteille, 10-hydroksikarbatsepiinin ja karbamatsepiiniepoksidin kontrollit valmistetaan itse ja muiden yhdisteiden osalta käytetään kaupallista kontrollia. Kontrollien teoreettiset pitoisuudet ovat taulukossa 7. Kontrollien täytyy sijoittua rajoihin, joiden perusteella katsotaan hyväksytäänkö sarja vai ei. Jos kontrollit ovat liian matalat tai liian korkeat, saatetaan koko sarja tehdä uudelleen. Euroopan lääkeviraston vuonna 2012 voimaan tulevissa ohjeissa kerrotaan, että kontrollien pitoisuudet saavat poiketa valmistajan ilmoittamasta lisäystä pitoisuudesta 15% [15]. Joidenkin yhdisteiden kohdalla rajat on kuitenkin asetettu tiukemmiksi. Rajat ovat taulukossa 7.

Taulukko 7. Kontrollien lisätyt pitoisuudet ( $\mu\text{mol/l}$ ).

Yhdiste	Matalan tason kontrolli		Korkean tason kontrolli	
Lamotrigiini	11,1	(9,6–12,6)	39,6	(33,6–43,6)
Primidoni	19,6	(17,6–21,6)	86,2	(78–94)
10-OH-karbatsepiini	22	(20–24)	118	(104–132)
Fenobarbitaali	41,5	(36–47)	160	(142–178)
Karbamatsepiiniepoksidi	2,0	(1,7–2,3)	5,9	(5,2–6,6)
Karbamatsepiini	19,6	(17–22)	58,8	(53–65)
Fenytoiini	18,9	(16–22)	73,6	(66–82)

Nestekromatografian ajo-olosuhteet on valittu SOP-ohjeen ja Kinetex-kolonnin ohjeiden perusteella. Ennen Kinetex-kolonnin määrityksessä käytettiin Waters Symmetry C18 -kolonnin, jolla saatiin usein hyviä piikkejä, mutta ajoaika oli pitkä. Ajoliuos suodatetaan aina ennen käyttöä imusuodatuksella. Samaa ajoliuosta käytetään kaksi kertaa.

Ajoliuos	405 ml Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -puskuria (pH 4,0) 95 ml asetonitriliä
Virtaus	0,5 ml/min (voidaan muuttaa, riippuen kolonnin paineesta)
Ajoaika	8 min (vaihtelee mm. ajoliuoksen koostumuksen vuoksi)
Kolonne	Kinetex 2,6µm, C18, 50*2,10 mm
Injisointitilavuus	3 µl
Kolonnin lämpötila	15°C (voidaan muuttaa, riippuen yhdisteiden erottumisesta)

Mittausaallonpituuksina toimivat 205 nm, 280 nm, 254 nm ja 230 nm. Muut yhdisteet absorboivat aallonpituudella 205 nm paitsi lamotrigiini. Lamotrigiini mitattiin aallonpituudella 280 nm ettei se absorboi primidonin kanssa päällekkäin. Muut aallonpituudet ovat mukana vain taustan tutkimiseksi.

## 5 Validointitulokset

### 5.1 Täsmällisyys

Toistettavuutta ja uusittavuutta tutkittiin analysoimalla matalan ja korkean tason kontroleja 6 kertaa rinnakkain samassa sarjassa sekä 6 kertaa eri sarjoissa. Tulokset löytyvät liitteestä 3. Laskettiin 6 samassa sarjassa tehdyn näytteen keskihajonta (s) ja suhteellinen keskihajonta (CV%) (taulukko 8). Laskettiin myös 6 eri sarjoissa tehdyn näytteen välinen keskihajonta (s) ja suhteellinen keskihajonta (CV%) (taulukko 9).

Taulukko 8. Toistettavuus.

<b>Matalat kontrollit</b>							
	<b>Primidoni</b>	<b>Lamotri- giini</b>	<b>10-OH- karbatse- piini</b>	<b>Feno- barbitaali</b>	<b>Karbamatse se- piiniepoksi- di</b>	<b>Karba- matsepiini</b>	<b>Fenyto- iini</b>
<b>Keskiarvo (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	18,13	10,13	19,97	35,22	1,68	19,08	16,55
<b>Keskihajonta (s)</b>	0,64	0,68	0,46	1,43	0,04	0,90	0,87
<b>Suhteellinen keskihajonta (CV%)</b>	3,5	6,7	2,3	4,1	2,4	4,7	5,3
<b>Korkeat kontrollit</b>							
	<b>Primidoni</b>	<b>Lamotri- giini</b>	<b>10-OH- karbatse- piini</b>	<b>Feno- barbitaali</b>	<b>Karbamatse se- piiniepoksi- di</b>	<b>Karba- matsepiini</b>	<b>Fenyto- iini</b>
<b>Keskiarvo (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	79,38	35,70	113,0	148,7	1,68	19,08	16,55
<b>Keskihajonta (s)</b>	1,44	2,33	3,12	3,00	0,13	1,85	2,18
<b>Suhteellinen keskihajonta (CV%)</b>	1,8	6,5	2,8	2,0	2,3	3,1	3,2

Taulukko 9. Uusittavuus.

<b>Matalat kontrollit</b>							
	<b>Primidoni</b>	<b>Lamotri- giini</b>	<b>10-OH- karbatse- piini</b>	<b>Fenobar- bitaali</b>	<b>Karbamatse se- piiniepoksi- di</b>	<b>Karba- matsepiini</b>	<b>Fenyto- iini</b>
<b>Keskiarvo (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	18,3	12,0	20,1	39,7	1,8	21,3	19,2
<b>Keskihajonta (s)</b>	0,5	1,3	1,0	2,3	0,1	1,0	0,8
<b>Suhteellinen keskihajonta (CV%)</b>	2,8	11,2	4,9	5,7	5,0	4,8	3,9
<b>Korkeat kontrollit</b>							
	<b>Primidoni</b>	<b>Lamotri- giini</b>	<b>10-OH- karbatse- piini</b>	<b>Fenobar- bitaali</b>	<b>Karbamatse se- piiniepoksi- di</b>	<b>Karba- matsepiini</b>	<b>Fenyto- iini</b>
<b>Keskiarvo (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	78,0	39,9	109,0	156,3	6,1	62,2	73,3
<b>Keskihajonta (s)</b>	2,5	4,0	4,5	11,2	0,2	3,9	5,0
<b>Suhteellinen keskihajonta (CV%)</b>	3,2	10,0	4,1	7,2	3,7	6,2	6,8

## 5.2 Toteamisraja ja määrittäysraja

Toteamisraja saatiin kromatogrammin signaali/kohinasuhteen (S/N) avulla. Määritettiin ensimmäisen standardin piikkien signaali/kohinasuhteet (taulukko 10), joiden perusteella laskettiin kullekin yhdisteelle toteamisraja. Toteamisraja määritettiin laskemalla ensin toteamisrajan piikin korkeus (kaava 3), jonka jälkeen se sijoitettiin yhdisteen kalibrointisuoran yhtälöön (liite 1), josta saatiin toteamisraja.

$$\text{Toteamisrajan piikin korkeus} = \frac{3 \cdot \text{standardin piikin korkeus}}{\text{standardin S/N}} \quad (3)$$

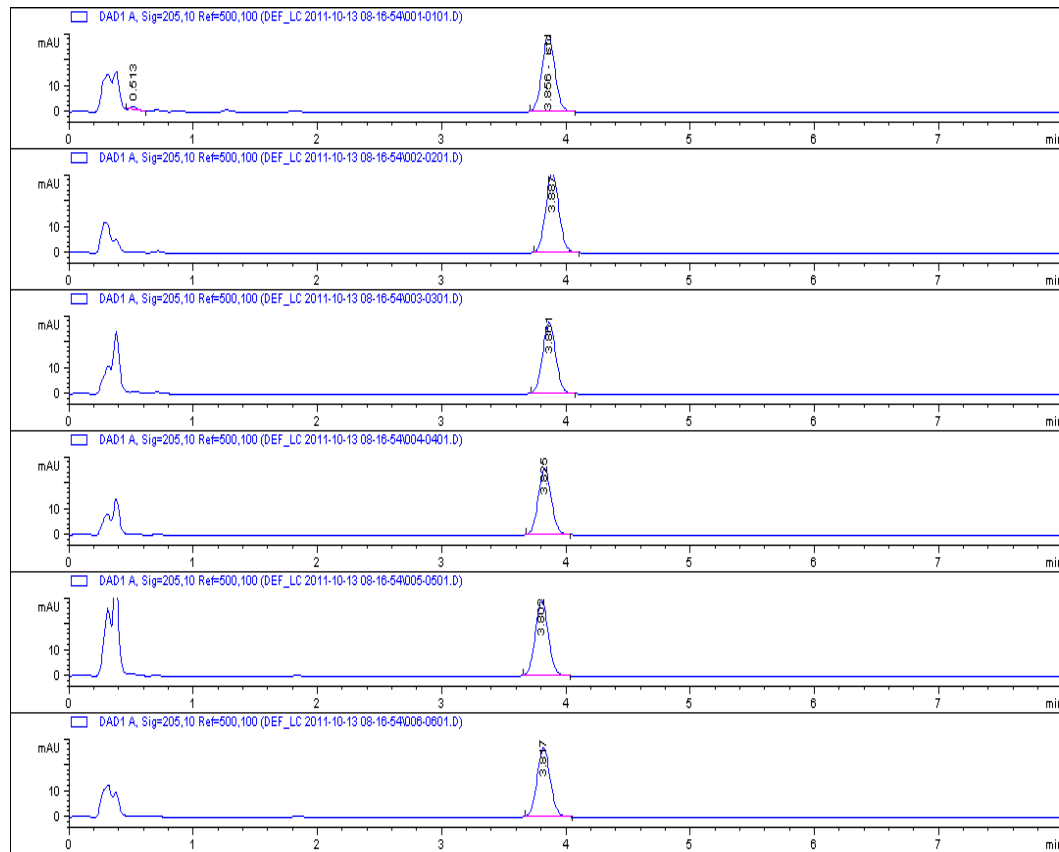
Taulukko 10. Toteamisraja.

Yhdiste	Standardin S/N	Piikin korkeus (mAU)	Toteamisraja (µmol/l)
Primidoni	228,6	7,77	2,04
Lamotrigiini	15,7	0,57	0,14
10-OH-karbatsepiini	337,3	15,87	1,15
Fenobarbitaali	215,2	10,12	0,72
Karbamatsepiiniepoksidi	51,7	2,43	0,22
Karbamatsepiini	64,4	3,03	0,09
Fenytoiini	91,8	4,32	0,58

Määrittäysrajan todettiin olevan yhtä kuin alimman standardin pitoisuus, koska sitä pienemmillä pitoisuuksilla ei potilaan hoidon kannalta ole merkitystä.

## 5.3 Spesifisyys ja selektiivisyys

Spesifisyyttä tutkittiin mittaamalla 6 eri henkilön lääkeaineetonta seerumia ja katsomalla löytyykö kromatogrammeista häiritseviä tekijöitä. Kaikissa mitatuissa seerumeissa näkyi piikkejä, mutta ne olivat liuotimpiikin yhteydessä eivätkä häirinneet analyyttejä (kuva 7).



Kuva 7. Lääkeaineettomat seerumit.

Selektiivisyyttä tutkittiin mittaamalla muita yleisesti epilepsian lääkityksessä käytettyjä antikonvulsantteja ja niiden metaboliitteja. Näitä olivat gabapentiini, levetirasetaami, klonatsepaami, diatsepaami, klobatsaami, nitratsepaami, valproaatti, norklobatsaami, nordiatsepaami ja oksatsepaami.

Ajoaikaa muutettiin hieman, jotta nähtiin etteivät yhdisteet näy seuraavan tai sitä seuraavan näytteen päällä. Ajoajaksi vaihdettiin 30 minuuttia. Taulukossa 11 on nähtävillä yhdisteiden retentioajat ja myöskin se, että jos ne tulisivat vasta seuraavan tai sitä seuraavan näytteen kohdalla niin mikä niiden retentioaika siellä olisi. Ne ovat tietenkin vain arvioita, joissa ei ole otettu huomioon mm. ajon jälkeistä stoptimea. Ajoajaksi on oletettu 10 minuuttia.

Taulukko 11. Mahdollisesti häiritsevät antikonvulsantit.

Yhdiste	Retentioaika (min)	Seuraavan näytteen päällä
Gabapentiini	Ei havaita mittausaallonpituuksilla	
Klonatsepaami	Ei havaita mittausaallonpituuksilla	
Klobatsaami	Ei havaita mittausaallonpituuksilla	
Valproaatti	Ei havaita mittausaallonpituuksilla	
Nordiatsepaami	Ei havaita mittausaallonpituuksilla	
Levetirasetami	0,33	-
Diatsepaami	11,5	1,5 minuutin kohdalla
Nitratsepaami	14,6	4,5 minuutin kohdalla
Norklobatsaami	17,7	7,5 minuutin kohdalla
Oksatsepaami	17,5	7,5 minuutin kohdalla

#### 5.4 Häiriöalttius

Häiriöalttiutta testattiin muuttamalla kolonnin lämpötilaa, virtausnopeutta sekä ajoliuoksen koostumusta. Kolonnin lämpötilaa säädettäessä huomattiin retentioaikojen ja yhdisteiden järjestyksen muuttuvan (Taulukko 12). Koska primidoni mitataan eri menetelmässä, ei sitä ole mukana kolonnin lämpötilan säätöä koskevissa testeissä.

Taulukko 12. Kolonnin lämpötilan muutosten vaikutus retentioaikoihin.

Kolonnin lämpötila	Retentioajat (min)	Huomiot
<b>+15°C</b>	Lamotrigiini 1,1 10-OH-karbatsepiini 1,7 Fenobarbitaali 2,0 Karbam.epoksidi 2,8 Karbamatsepiini 7,7 Fenytoiini 8,6	Yhdisteet erottuvat hyvin toisistaan ja piikit ovat symmetrisiä ja kapeita.
<b>+20°C</b>	Lamotrigiini 0,6 10-OH-karbatsepiini 0,9 Fenobarbitaali 1,2 Karbam.epoksidi 1,5 Karbamatsepiini 3,8 Fenytoiini 3,9	Piikit ovat symmetrisiä, mutta fenytoiinin ja karbamatsepiinin retentioajat ovat lähes päällekkäin ja piikkejä lähes mahdoton erottaa toisistaan.

<b>+40°C</b>	Lamotrigiini 0,5 10-OH-karbatsepiini 0,9 Fenobarbitaali 1,0 Karbam.epoksidi 1,3 Karbamatsepiini 3,0 Fenytoiini 2,9	Retentioajat lyhyempiä, mutta karbamatsepiini ja fenytoiini ovat edelleen päällekkäin ja vaihtaneet paikkoja.
--------------	---	---

Virtausnopeutta muutettaessa huomattiin, että mitä suurempi virtaus on sitä kovemmat paineet kolonniin ja myös laitteeseen muodostui. Piikkien muodossa tai retentioajoissa ei tapahtunut suuria muutoksia, jotka olisivat vaikuttaneet analyysituloksiin. Kun virtausnopeutta taas laskettiin, päästiin pienempiin paineisiin, mutta samalla ajoaika piteni ja piikkien muoto oli leveämpi.

Ajoliuksen koostumusta muutettiin lisäämällä puskuria aiempaa enemmän. Kun ajoliuksen koostumus oli 420 ml puskuria ja 80 ml asetonitriliä, yhdisteet erottuivat paremmin toisistaan, piikit säilyivät symmetrisinä, mutta ajoaika kasvoi huomattavasti. Jos puskurin määrää taas vähennettiin, ajoaika lyheni mutta yhdisteet tulivat päällekkäin, jolloin lyhyestä ajoajasta ei ollut mitään hyötyä.

## 5.5 Herkkyys

Herkkyyttä mitattiin suoran kulmakertoimenä. Jokaisen analyytin osalta herkkyys laskettiin erikseen. Taulukossa 13 on esitetty piikkien korkeudet (mAU) kaikkien analyytien standardeille. Standardien pitoisuudet on kerrottu aiemmin taulukossa 6. Näiden perusteella on piirretty kalibrointisuorat jokaiselle analyytille (liite 1) ja näiden perusteella on laskettu herkkyys.

Taulukko 13. Standardien korkeudet (mAU).

	<b>Primi-doni</b>	<b>10-OH-karbatsepiini</b>	<b>Fenobarbitaali</b>	<b>Karbamatsepiiniepoksidi</b>	<b>Karbamatsepiini</b>	<b>Fenytoiini</b>	<b>Lamotrigiini</b>
<b>st1</b>	7,536	18,411	11,131	3,174	3,789	5,906	0,52
<b>st2</b>	17,761	61,233	51,385	5,514	9,94	13,853	3,437
<b>st3</b>	35,931	144,378	107,044	11,938	24,383	47,643	8,623
<b>st4</b>	71,287	247,839	170,864	18,213	37,056	71,224	16,2

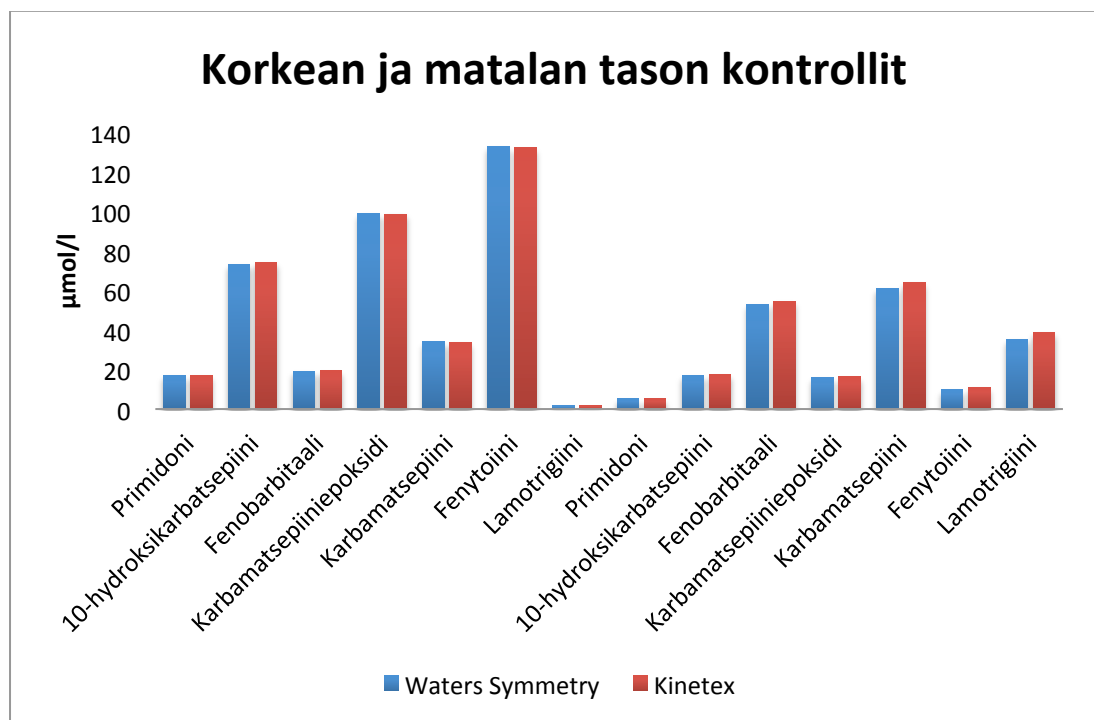
Analyyttien herkkydet on taulukoitu alla (taulukko 14).

Taulukko 14. Herkkydet.

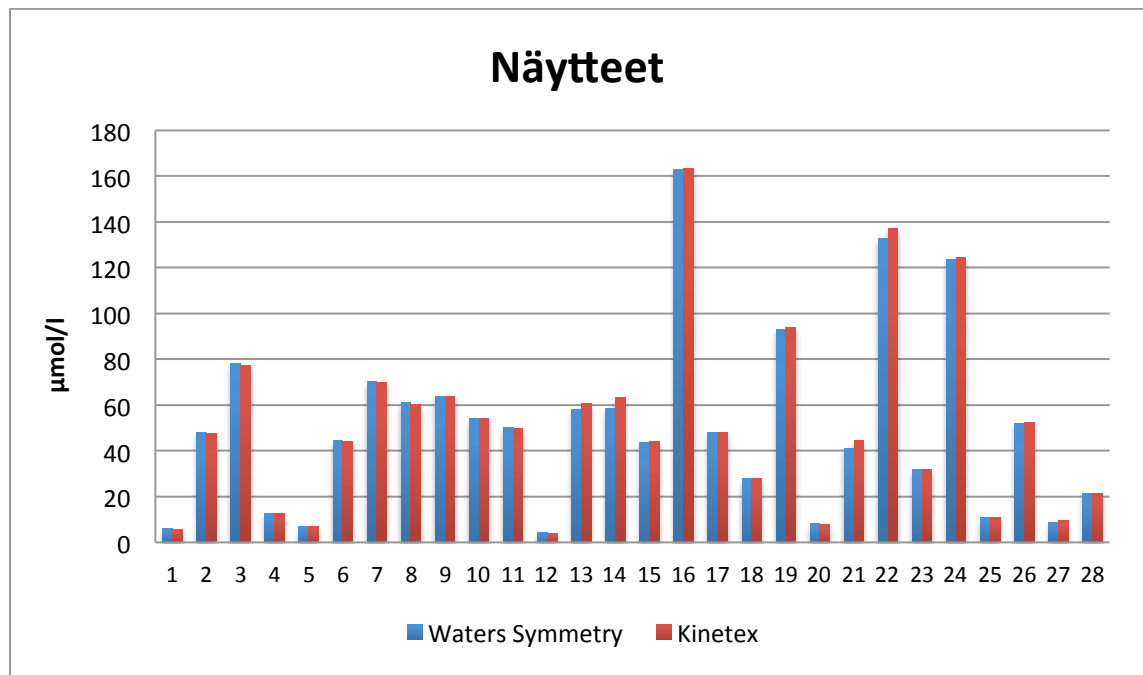
Yhdiste	Herkkyys ((I·mAU)/ $\mu\text{mol}$ )
Lamotrigiini	0,2748 $\approx$ 0,3
Primidoni	0,9088 $\approx$ 0,9
Fenobarbitaali	0,9948 $\approx$ 1,0
10-hydroksikarbatsepiini	1,8612 $\approx$ 1,9
Karbamatsepiiniepoksidi	1,5392 $\approx$ 1,5
Karbamatsepiini	0,58 $\approx$ 0,6
Fenytoiini	0,6014 $\approx$ 0,6

## 5.6 Tarkkuus

Tarkkuutta arvioitiin mittaamalla sama näytesarja sekä käytössä olleella Waters Symmetry -kolonnilla, että Phenomenex Kinetex -kolonnilla. Tulokset löytyvät taulukoituna liitteestä 2. Tulosten perusteella piirrettiin kuvaajat (Kuvat 8 ja 9), jotka helpottavat hahmottamaan menetelmien eroja.



Kuva 8. Kontrollien vertailukuvaaja.



Kuva 9. Näytteiden vertailu.

Tarkkuutta arvioitiin myös laskemalla analysoitujen ulkopuolisten laaduntarkkailunäytteiden (HeathControl) poikkeamat näytteiden lisätyistä pitoisuuksista. Näytteiden (1-4K) tulokset löytyvät liitteestä 3, niistä on laskettu keskiarvot ja niiden poikkeamat lisätyistä pitoisuuksista (taulukko 15). Koska 10-OH-karbatsepiinille ei ollut laaduntarkkailunäytettä, tutkittiin sen tarkkuutta matalan tason kontrollin avulla.

Taulukko 15. Laaduntarkkailunäytteiden poikkeamat, pitoisuuksien yksikkö µmol/l.

	Primidoni	Lisätty pitoisuus	Poikkeama (%)	Lamotrigiini	Lisätty pitoisuus	Poikkeama (%)
<b>1K</b>	32,3	34,7	6,9	10,2	11,0	7,3
<b>2K</b>	66,7	78,2	14,7	15,7	18,6	15,2
<b>3K</b>	45,4	50,6	10,2	Alle määrittäysrajan	-	-
<b>4K</b>	Alle määrittäysrajan	-	-	23,6	62,9	62,5

	Fenobarbitaali	Lisätty pitoisuus	Poikkeama (%)	Karbatsepiiniiepoksidi	Lisätty pitoisuus	Poikkeama (%)
<b>1K</b>	90,0	93,8	4,1	9,6	9,9	3,8
<b>2K</b>	148,2	171,1	13,4	4,9	5,6	12,4
<b>3K</b>	215,9	235,9	8,5	33,9	37,4	9,4
<b>4K</b>	Alle määrittäysrajan	-	-	3,0	3,4	10,7

	Karbamatsepiini	Lisätty pitoisuus	Poikkeama (%)	Fenytoiini	Lisätty pitoisuus	Poikkeama (%)
<b>1K</b>	38,0	38,1	0,3	Alle määritysrajan	-	-
<b>2K</b>	40,5	44,7	9,4	28,6	33,8	15,4
<b>3K</b>	74,3	80,2	7,4	79,3	89,6	11,5
<b>4K</b>	8,8	9,4	6,4	63,7	75,3	15,4

10-OH-karbatsepiinin matalan tason kontrollien keskiarvo oli 19,97 µmol/l. Koska matalan tason kontrollin pitoisuus on 22,0 µmol/l saadaan poikkeamaksi 9,2%.

### 5.7 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus laskettiin Bias-epävarmuutena. Bias, tarkoittaa keskiarvon erotusta suuresta määrästä testituloksia ja hyväksytystä vertailuarvosta. Epävarmuus laskettiin jokaiselle analyylille erikseen laaduntarkkailunäytteen 2K perusteella (kaava 4), tulokset löytyvät liitteestä 3. Käytettiin kohdassa luvussa 5.6 laskettuja poikkeamia (taulukko 15) Koska 10-OH-karbatsepiinille ei ollut laaduntarkkailunäytettä, sen mittausepävarmuutta tutkittiin matalan tason kontrollin avulla.

$$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2} \quad (4)$$

Missä  $u(R_w) = \text{valvontaraja} = 2 \cdot s$  ja  $u(bias) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u(Cref)^2}$ , missä

$$RMS_{bias}^2 = \sqrt{\frac{\sum(bias_i)^2}{n}} \text{ ja } u(Cref) = \frac{s}{\sqrt{n}}.$$

Mittausepävarmuudet on taulukoitu alla (taulukko 16).

Taulukko 16. Mittausepävarmuudet.

<b>Yhdiste</b>	<b>Mittausepävarmuus (%)</b>	<b>Laajennettu mittausepävarmuus (%) k=2</b>
Primidoni	4	8
Lamotrigiini	4	8
10-OH-karbatsepiini	3	6
Fenobarbitaali	4	8
Karbatsepiiniepoksidi	4	8
Karbatsepiini	3	6
Fenytoiini	4	8

### 5.8 Näytteiden säilyvyys näytteensyöttäjässä

Näytteiden säilyvyyttä näytteensyöttäjässä tutkittiin, koska joskus näytteet voivat joutua olemaan näytteensyöttäjässä pitkiäkin aikoja ja on tärkeä tietää ovatko ne edelleen mittauskelpoisia pitkän ajan jälkeen.

Samat näytteet mitattiin 1. päivänä, 2. päivänä ja 4. päivänä, näin saatiin simuloitua aika, jonka näytteet pisimmillään näytteensyöttäjässä joutuvat olemaan. Piikkien korkeuksista nähtiin, etteivät näytteet olleet lainkaan hajonneet ajoliuoksessa, eikä myöskään sisäinen standardi. Retentioajatkin olivat säilyneet samoina. Piikkien korkeudet on taulukoitu alla (taulukko 17).

Taulukko 17. Säilyvyyden testaus.

<b>Yhdiste</b>	<b>1. päivän piikin korkeus (mAU)</b>	<b>2. päivän piikin korkeus (mAU)</b>	<b>4. päivän piikin korkeus (mAU)</b>
Primidoni	17,3	17,1	17,2
Lamotrigiini	2,0	1,9	2,1
10-OH-karbatsepiini	46,3	46,0	45,9
Fenobarbitaali	41,0	41,7	40,8
Karbatsepiiniepoksidi	3,7	3,5	3,3
Karbatsepiini	5,6	5,9	5,5
Fenytoiini	7,6	7,2	7,1
Sisäinen standardi (heksobarbitaali)	24,9	24,7	24,4

## 6 Tulosten tarkastelu

### 6.1 Bentsodiatsepiinien, opioidien ja samankaltaisten yhdisteiden seulonta

Kaikki mitatut yhdisteet absorboivat mitatuilla aallonpituuksilla. Bentsodiatsepiinit absorboivat paremmin 280 nm ja muut yhdisteet 230 nm. Yhdisteiden retentioajat löytyvät taulukosta 18. Retentioajoista nähdään, että osalla yhdisteistä on samat retentioajat. Sisäisen standardin retentioaika oli 4,8 minuuttia. Folkodiinin, joka ajettiin yksinään, retentioaika saatiin selville mittaamalla piikin spektri ja vertaamalla sitä kirjallisuudesta löytyvään folkodiinin spektriin. Suhteellinen retentioaika laskettiin jakamalla analyytin retentioaika sisäisen standardin retentioajalla.

Taulukko 18. Retentioajat.

<b>Yhdiste</b>	<b>Retentioaika t<sub>r</sub> (min)</b>	<b>Suhteellinen retentioaika</b>
Oksimorfoni	0,5	0,10
Morfiini	0,5	0,10
Hydromorfoni	0,6	0,12
Dihydrokodeiini	0,8	0,17
Kodeiini	0,9	0,19
Oksikodoni	1,2	0,25
6-MAM	1,3	0,27
Hydrokodoni	1,4	0,29
Etyylimorfiini	1,8	0,38
Ritaliinihappo	1,9	0,40
Norfentanyyli	2,5	0,52
Levorfanoli	3,0	0,63
Tsopikloni	3,1	0,65
Tramadoli	3,1	0,65
Metyylifenidaatti	3,1	0,65
Petidiini	3,4	0,71
Folkodiini	3,5	0,73
Klooridiatsepoksidi	3,6	0,75
Norbuprenorfiini	3,7	0,77
Dekstrometorfaani	4,0	0,83
Midatsolaami	4,1	0,85
Fentanyyli	4,1	0,85
Fenatsosiini	4,2	0,88
Buprenorfiini	4,3	0,90
3-metyylifentanyyli	4,3	0,90
Desmetyylitramadoli	4,4	0,92
EDDP	4,4	0,92
Oksatsepaami	4,5	0,94
Nitratsepaami	4,5	0,94
Loratsepaami	4,6	0,96
Norklobatsaami	4,6	0,96
Nordiatsepaami	4,7	0,98
Klonatsepaami	4,7	0,98
Metadoni	4,7	0,98

Diatsepaami	4,8	1,00
Klobatsaami	4,9	1,02
Alpratsolaami	5,3	1,10
Meprobamaatti	6,2	1,29

Näytteiden säilyvyyden testauksessa saatiin selville, että erityisesti ajoliuos A hajottaa happamuudellaan (pH 2,8) tiettyjä yhdisteitä, esimerkiksi nitratsepaami ja nordiatsepaami. Jotkut yhdisteet antoivat joissain ajoissa useamman kuin yhden piikin, mutta tällöin kyseessä oli kontaminaatio tai kantaliuoksen vanheneminen. Piikkien korkeudet 1. ja 2. päivänä on taulukoitu alla (Taulukko 19).

Taulukko 19. Säilyvyyden testaus, punaisella merkittyjen yhdisteiden piikin korkeus laski vähintään 15%.

<b>Yhdiste</b>	<b>1. päivän piikin korkeus (mAU)</b>	<b>2. päivän piikin korkeus (mAU)</b>
Ritaliinihappo	0,7	0,7
3-metyylifentanyyli	0,8	0,8
Metyylifenidaatti	0,9	1,0
Petidiini	0,9	1,0
Fenatsosiini	1,1	1,0
Norfentanyyli	1,3	1,3
Fentanyyli	1,5	1,5
Tramadoli	1,6	1,9
EDDP	2,0	2,2
Hydrokodoni	2,2	2,3
Metadoni	2,4	2,5
Kodeiini	2,6	2,1
Norbuprenorfiini	2,7	2,8
6-MAM	3,1	3,6
Oksikodoni	3,3	3,3
Dekstrometorfaani	3,4	3,9
Hydromorfon	3,4	3,5
Norklobatsaami	3,4	3,7
Dihydrokodeiini	3,8	3,5

Tsopikloni	4,3	4,5
Levorfanoli	4,9	4,9
Buprenorfiini	5,7	5,8
Folkodiini	6,1	6,4
Klooridiatsepoksidi	9,6	9,5
Alpratsolaami	9,6	9,7
Nitratsepaami	9,8	7,2
Klonatsepaami	10,6	11,9
Nordiatsepaami	12,1	10,2
Diatsepaami	15,3	14,9
Midatsolaami	15,7	15,9
Loratsepaami	17,3	17,0
Etyylimorfiini	19,8	20,6
Oksatsepaami	20,1	18,5
Klobatsaami	22,6	25,5
Morfiini	37,2	35,0
Oksimorfoni	39,2	41,3
Sisäinen standardi (flunitratsepaami)	4,4	5,1

## 6.2 Antikonvulsanttimenetelmän validointi

Antikonvulsanttimenetelmän validointi sujui hyvin. Seuraavaksi on arvioitu validointiparametrien antamia tuloksia.

Täsmällisyyden arviointiin lasketut keskihajonnat ovat melko pieniä, mikä osoittaa tulosten olevan toistettavia sekä uusittavia. Lamotrigiinin kohdalla vaihtelut olivat suurimpia.

Toteamisrajoiksi saatiin melko pienet pitoisuudet yhdisteitä. Sekä toteamis- että määritysrajan kohdalla oli kuitenkin siten, että niillä pitoisuuksilla, jotka olivat pienempiä kuin alimpien standardien pitoisuudet ei ole merkitystä. Lääkeaineiden määrityksessä on aina viitearvoalueet, joilla lääkeaineiden pitoisuudet ovat niin sanotusti terapeutisia ja

alimmat standarditkin ovat yleensä huomattavasti terapeuttisen alarajaa pienempiä, jolloin pienemmillä pitoisuuksilla ei ole merkitystä hoidon kannalta.

Lääkeainevapaita seerumeita tutkittaessa spesifisyyttä varten nähtiin, ettei niissä missään ollut häiritseviä tekijöitä tai niin suurta taustaa että se vaikuttaisi analyysituloksiin. Selektiivisyyttä tutkittaessa huomattiin, että jos potilaalla on diatsepaami-, nitratsepaami- tai oksatsepaamilääkitys näkyy se seuraavassa kromatogrammissa häiritsevänä piikkinä. Piikit olivat kuitenkin niin leveitä, että ne tunnistaa, jos potilaalla on jokin näistä lääkityksistä. Myös klobatsaamin metaboliitti norklobatsaami näkyy häiritsevästi seuraavassa kromatogrammissa.

Menetelmän todettiin olevan melko toimiva kaikenlaisissa olosuhteissa. Nestekromatografissa on kolonnitermostaatti, jolla saadaan säädettyä lämpötilaksi aina sama, jolloin ei tarvitse huolehtia lämpötilavaihteluiden tuomista vaikutuksista yhdisteiden analysoimiseen. Muut testatut häiriöalttiuden osa-alueet osoittivat, että niistä johtuvat muutokset lähinnä pidentävät ajoaikaa mutta eivät estä analyyssejä.

Yhdisteiden herkkyudet osoittavat että jo pienet muutokset analyyttien pitoisuuksissa saavat aikaan vasteen. Menetelmää voidaan siis pitää herkkänä.

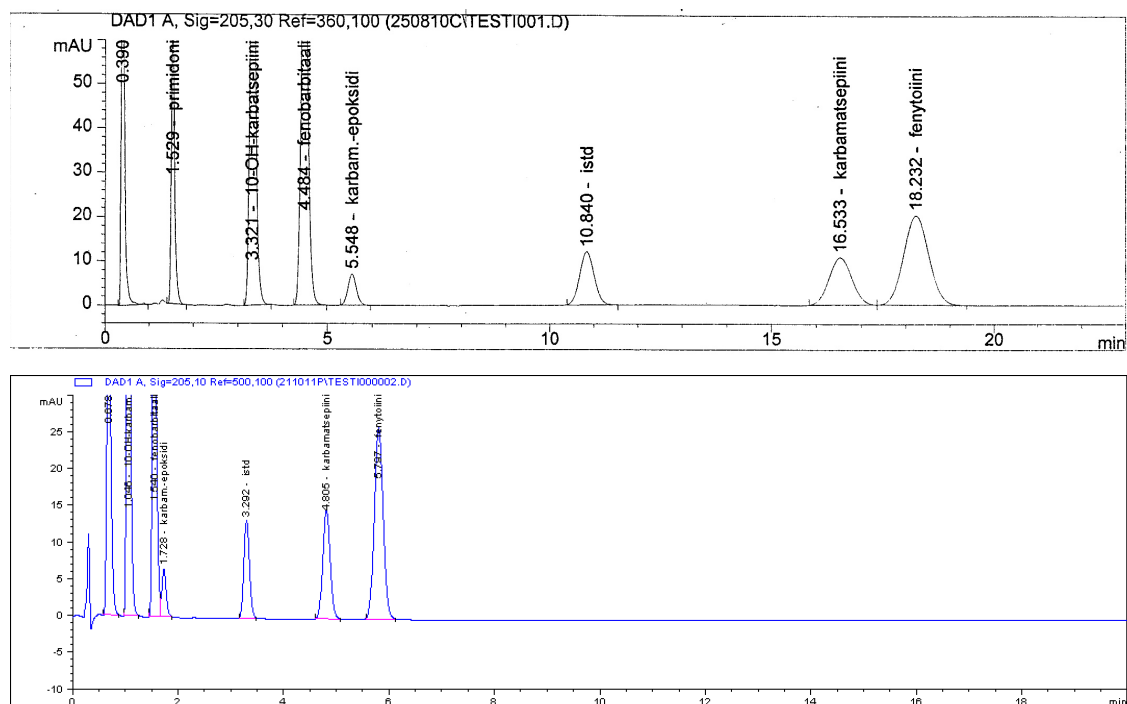
Tarkkuuden arvioinnissa verrattiin Phenomenex Kinetex -kolonnilla tehtyjä tuloksia aiemmin käytössä olleen Waters Symmetry -kolonnin tuloksiin, eikä niissä ole juurikaan eroa ja pienet erot saattoivat johtua erilaisista integroinneista. Laaduntarkkailunäytteiden pitoisuuksien poikkeamissa ei myöskään havaittu suuria poikkeamia. Lamotrigiinin 4K-näytteen suuri poikkeama johtui todennäköisesti laaduntarkkailunäytteestä, jossa on ollut jotain vikaa. Laboratorioiden välisessä vertailussa pitoisuudet vaihtelivat välillä 22-62  $\mu\text{mol/l}$ .

Mittausepävarmuudet ovat suhteellisen pieniä ja ne osoittavat menetelmän toimivaksi ja tulokset luotettaviksi mittausalueella.

## 7 Päätelmät

Bentsodiatsepiinien, opioidien ja samankaltaisten yhdisteiden seulontamenetelmä osoit-  
tautui toimivaksi suurimmalle osalle tutkittuja yhdistettä. Joidenkin yhdisteiden kohdalla  
säilyvyytestaus osoitti että ne eivät säily ajoliuokseen liuotettuna kovin kauaa. Mene-  
telmä on siis toimiva ainakin suurimmalle osalle yhdisteitä, jos yhdisteet saadaan ana-  
lysoitua saman päivän aikana, kun ne on uutettu. Menetelmän kehitystä voisi jatkaa  
seuraavaksi ajoliuosten koostumusten osalta, jos niistä saisi vähemmän happamia,  
jolloin yhdisteet eivät niin helposti hajoaisi.

Antikonvulsanttimenetelmä osoittautui toimivaksi, ja se otettiin heti rutiinikäyttöön. On  
hyvä että ajoaika on puolet lyhyempi (kuva 10), jolloin pitkätkään sarjat eivät vie laite-  
aikaa yhtä paljon kuin ennen. Ongelmaksi kolonnin suhteen muodostui kuitenkin välillä  
korkeaksi nousseet paineet, jotka rasittavat sekä kolonnia että laitetta. Paine saatiin  
kuitenkin laskemaan vaihtamalla virtausnopeutta, ajoliuoksen koostumusta, kolonnin  
lämpötilaa tai itse kolonnia. Menetelmää voisi jatkossa lähteä kehittämään ajoliuoksen  
osalta, saisiko siitä muuttamalla puskuria muuttamalla entistä nopeampaa. Myös mui-  
den kolonnivalmistajien kiinteäydinkolonneja voisi kokeilla, partikkelikoko hieman vaih-  
telee ja sillä voisi olla merkitystä analyysin kannalta.



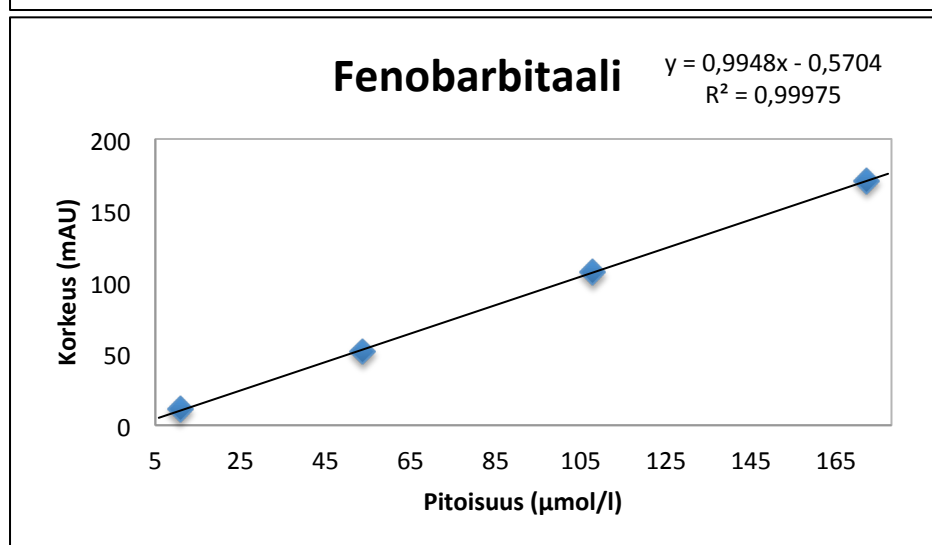
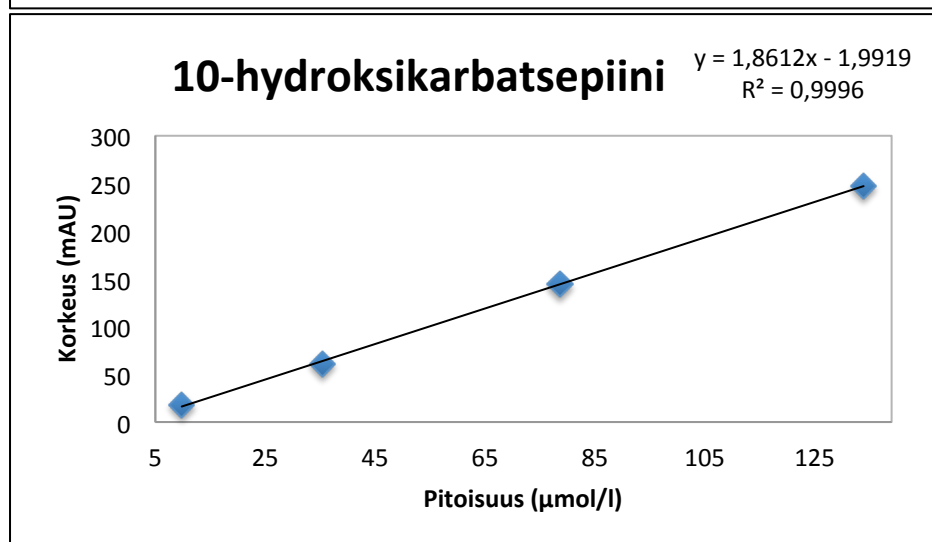
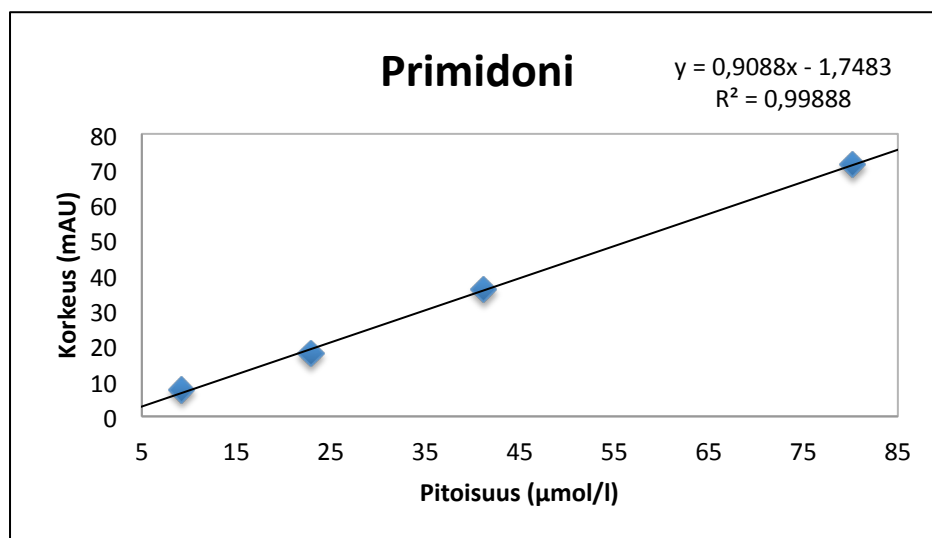
Kuva 10. Ylemmässä kuvassa analyysi tehty perinteisellä HPLC-kolonnilla ja alla kiinteäydinkolonnilla.

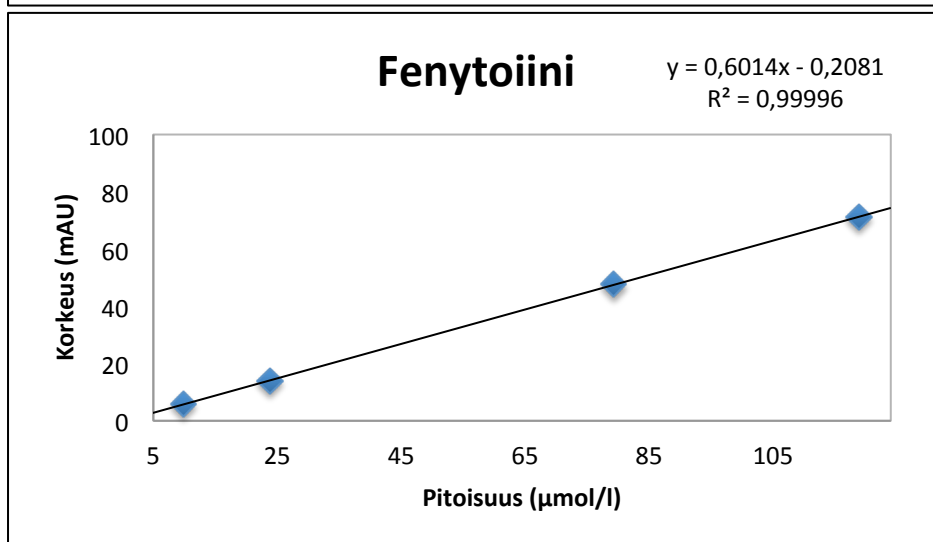
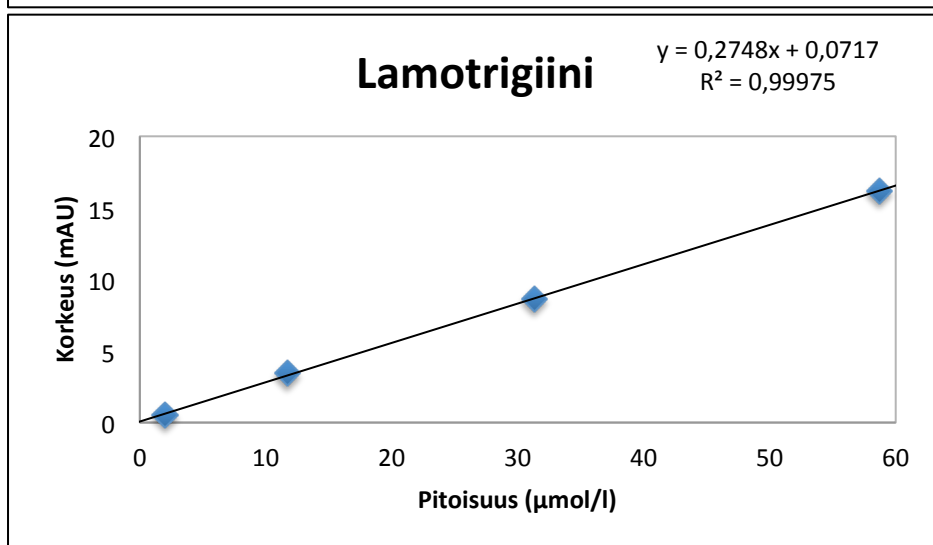
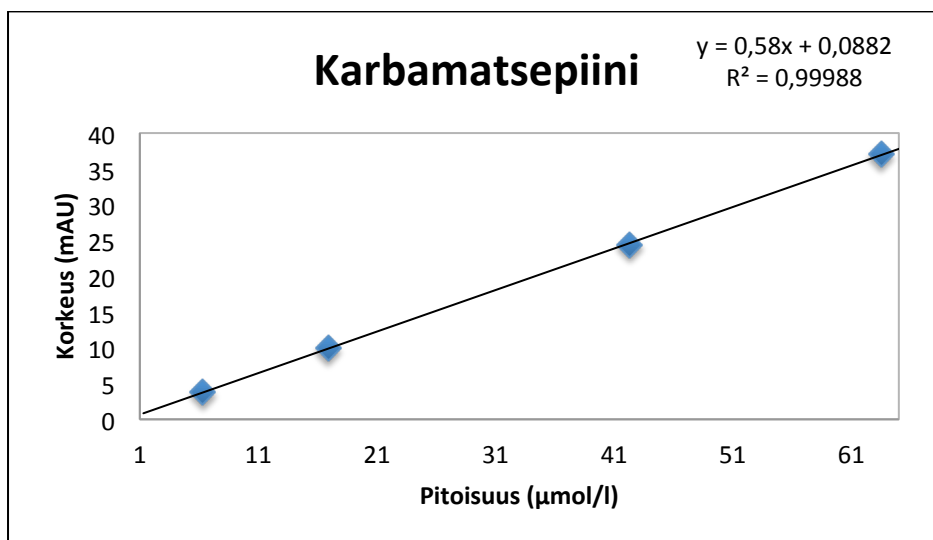
Kiinteäydinkolonnin todettiin täyttävän hyvin valmistajan antamat lupaukset. Ajoajat olivat lyhyitä ja kromatogrammit hyviä. Kiinteäydinkolonnin käyttöä muissakin lääkeainemäärityksissä varmasti harkitaan ja osan kanssa testaus on jo alkanut.

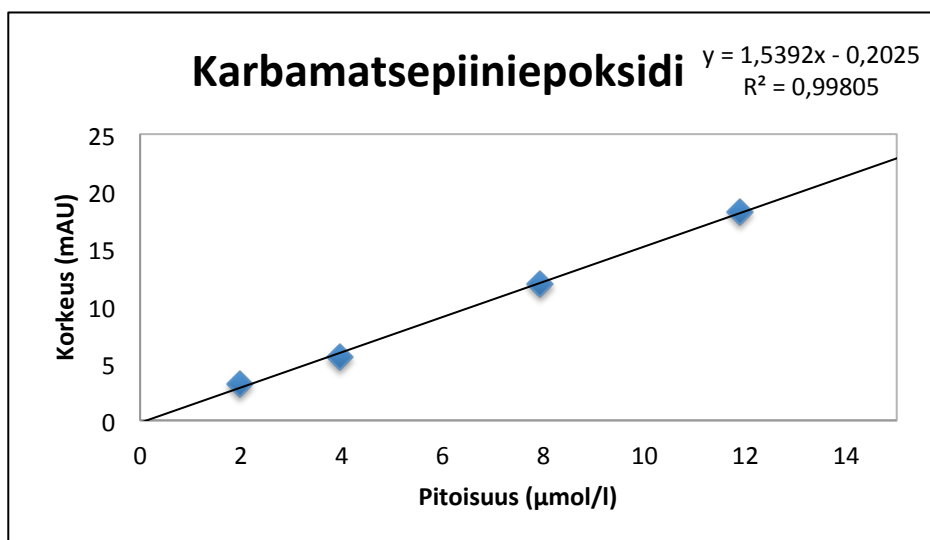
## Lähteet

- [1] Yhtyneet Laboratoriot Oy. 2005. Laboratoriokäsikirja 2006-2007. Keuruu: Otava.
  
- [2] Mallett & Molina. 2009. The use of partially porous particle columns for the routine, generic analysis of biological samples for pharmacokinetics studies in drug discovery by reversed-phase ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. s. 100-107.
  
- [3] Phenomenex HPLC-brand: Kinetex with phase: C18. Verkkodokumentti. <http://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Kinetex/C18?returnURL=/Search>. Luettu 7.9.2011
  
- [4] Jaarinen & Niiranen. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita.
  
- [5] Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia.1998. Toim. Pelkonen & Ruskoaho. Vammala: Duodecim.
  
- [6] Mofft, Jackson, Moss & Widdop. 1986. Clarke's Isolation and Identification of Drugs. London: The Pharmaceutical Press.
  
- [7] Wikipedia. Verkkosivu. <http://en.wikipedia.org>.
  
- [8] DrugBank: Methylphenidate. Verkkodokumentti. <http://www.drugbank.ca/drugs/APRD00657>. Luettu 16.10.2011.
  
- [9] Koulu & Tuomisto. 2007. Farmakologia ja toksikologia. Kuopio: Medicina.

- [10] Dextrometorfan – PubChem. Verkkodokumentti.  
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3008>. Luettu 16.10.2011.
- [11] Atula, Sari. 2010. Tietoa potilaalle: Epilepsia aikuisella. Lääkärikirja Duodecim. Verkkodokumentti.  
[http://www.terveysportti.fi/dtk/ltk/koti?p\\_artikkeli=ykt00897&p\\_haku=Sari%20Atula](http://www.terveysportti.fi/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt00897&p_haku=Sari%20Atula). Luettu 8.10.2011
- [12] Ohjeita ympäristönäytteiden kemiallisten analyysimenetelmien validointiin. 1996. Toim. Mäkinen, Suortti, Saares, Niemi & Marjanen. Suomen Ympäristökeskus. Helsinki.
- [13] Elintarvikevirasto. 1997. Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje. Helsinki.
- [14] Kolmonen, Leinonen, Kuuranne, Pelander & Ojanperä. 2009. Generic sample preparation and dual polarity liquid chromatography – time-of-flight mass spectrometry for high-throughout screening in doping analysis. Artikkel. Drug Testing and Analysis.
- [15] Guideline on bioanalytical method validation. European Medicine Agency. Verkkodokumentti.  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf). Luettu 3.11.2011.

**Herkkyden määrittäminen (kalibrointisuorat ilman sisäistä standardia)**





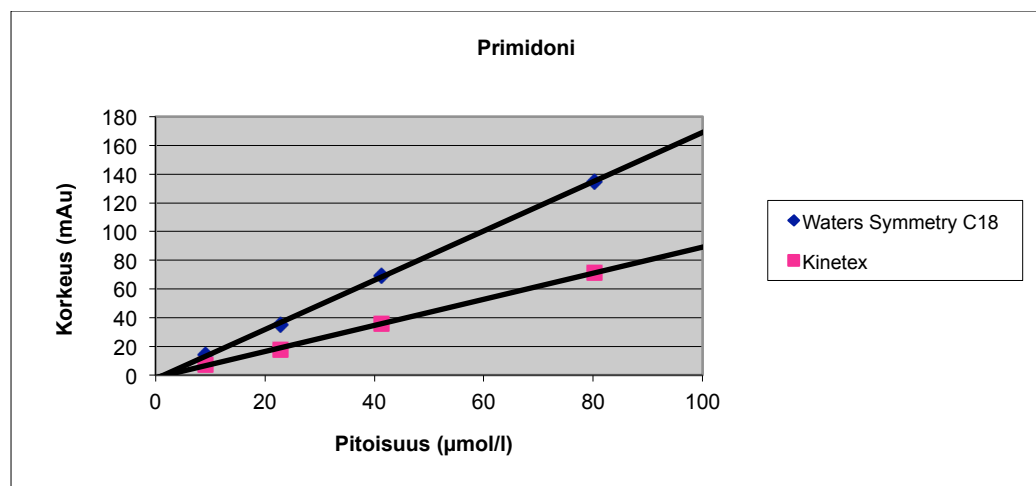
## Tarkkuuden vertailu Waters Symmetry- ja Kinetex –kolonneilla

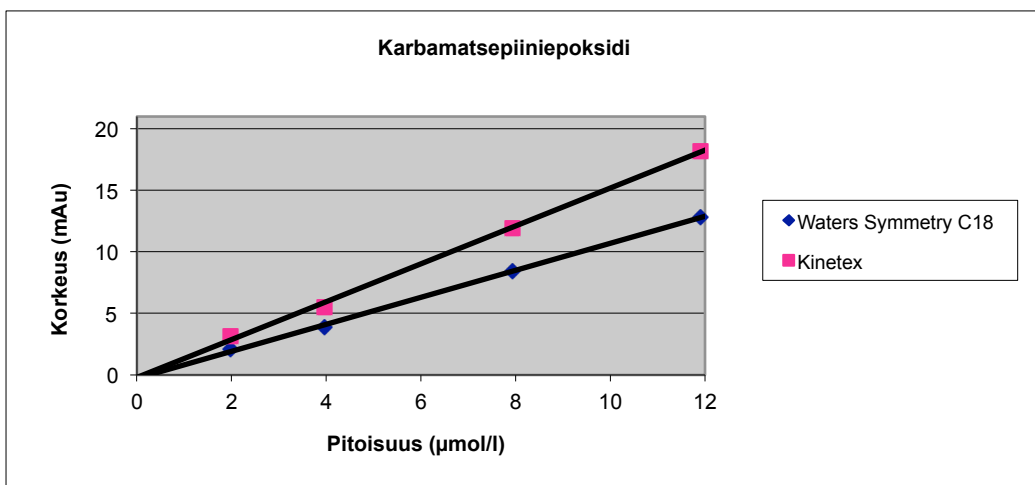
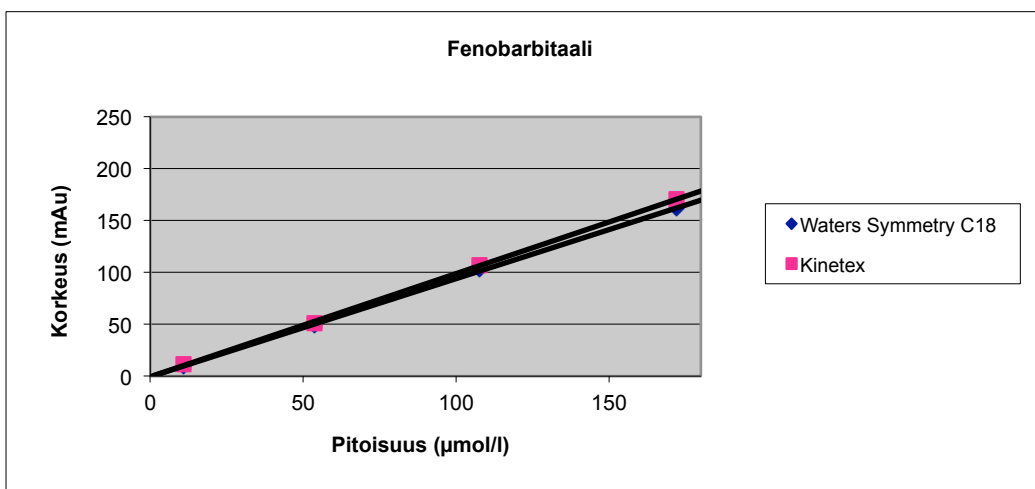
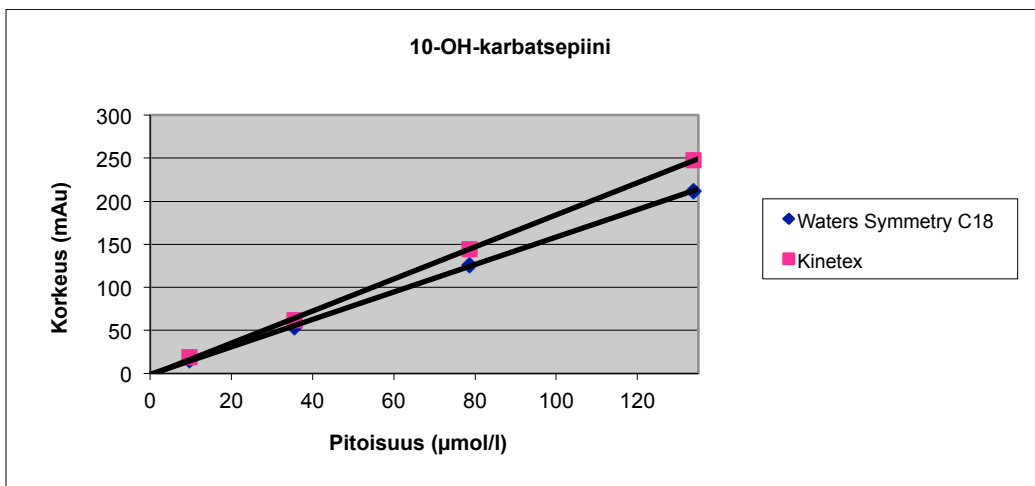
Standardien korkeudet (mAU)

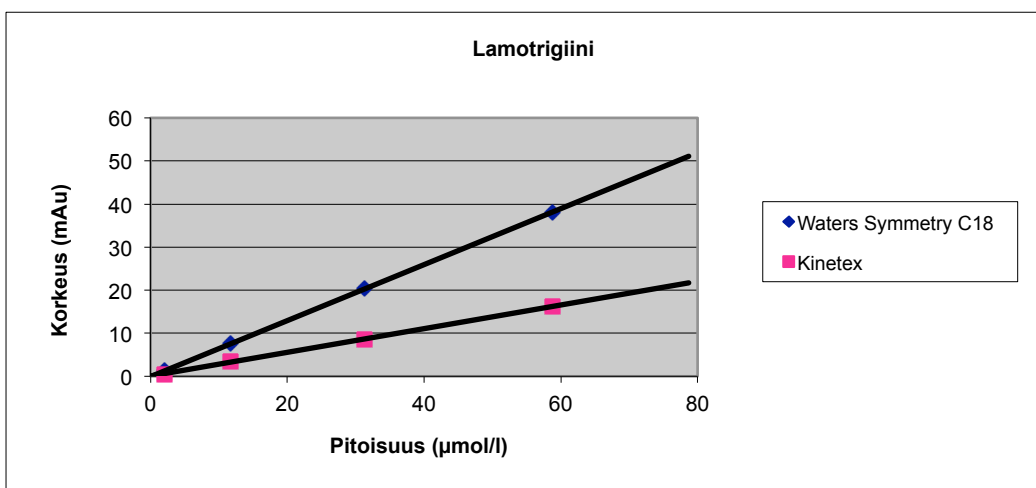
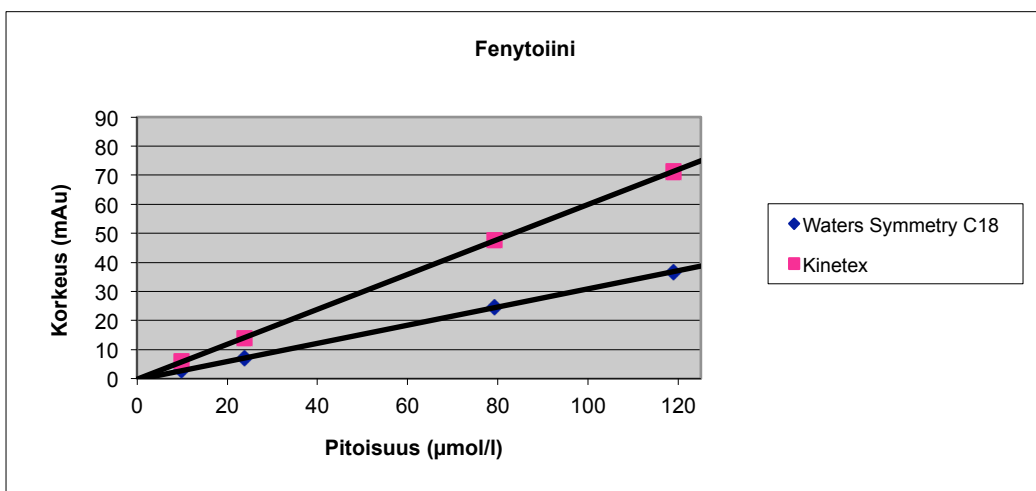
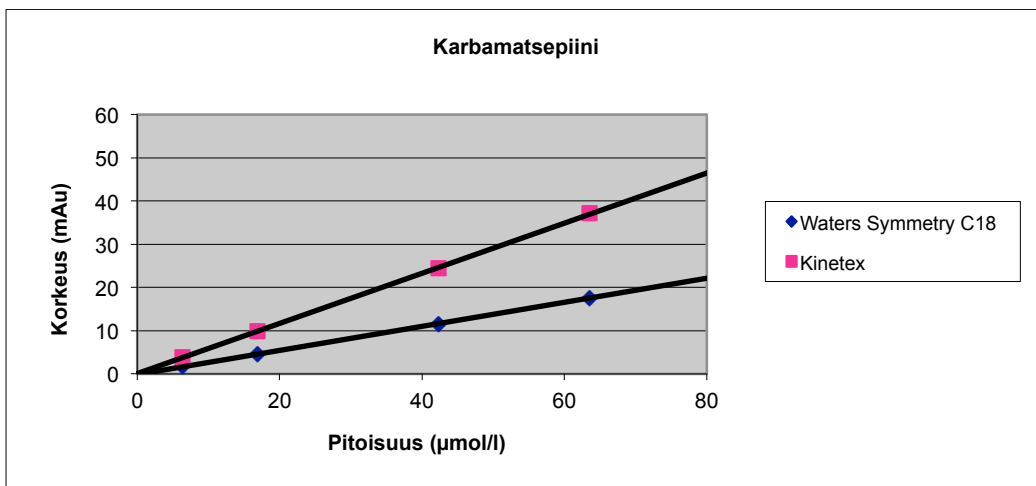
Standardit	Primidoni		10-hydroksi-karbatsepiini		Fenobarbitaali	
	<i>Waters Symmetry</i>	<i>Kinetex</i>	<i>Waters Symmetry</i>	<i>Kinetex</i>	<i>Waters Symmetry</i>	<i>Kinetex</i>
<b>st1</b>	14,054	7,536	15,146	18,411	10,14	11,131
<b>st2</b>	35,136	17,761	53,563	61,233	48,761	51,385
<b>st3</b>	68,901	35,931	126,383	144,378	103,152	107,044
<b>st4</b>	135,022	71,287	211,685	247,839	161,635	170,864

Karbamatsepiini-epoksidi		Karbamatsepiini		Fenytoiini		Lamotrigiini	
<i>Waters Symmetry</i>	<i>Kinetex</i>	<i>Waters Symmetry</i>	<i>Kinetex</i>	<i>Waters Symmetry</i>	<i>Kinetex</i>	<i>Waters Symmetry</i>	<i>Kinetex</i>
2,046	3,174	1,678	3,789	2,815	5,906	1,203	0,52
3,889	5,514	4,52	9,94	6,871	13,853	7,568	3,437
8,43	11,938	11,631	24,383	24,672	47,643	20,271	8,623
12,809	18,213	17,571	37,056	36,691	71,224	38,083	16,2

Kalibrointikuvaajat







Kontrollien ja näytteiden pitoisuudet ( $\mu\text{mol/l}$ )

Kontrollit	Primidoni		10-hydroksi-karbatsepiini		Fenobarbitaali	
	<i>Waters Symmetry</i>	<i>Kinetex</i>	<i>Waters Symmetry</i>	<i>Kinetex</i>	<i>Waters Symmetry</i>	<i>Kinetex</i>
<b>Matala taso</b>	17,171	17,223	19,202	19,263	34,193	33,885
<b>Korkea taso</b>	73,302	74,218	99,103	98,717	133,116	132,415

Karbamatsepiini-epoksidi		Karbamatsepiini		Fenytoiini		Lamotrigiini	
<i>Waters Symmetry</i>	<i>Kinetex</i>	<i>Waters Symmetry</i>	<i>Kinetex</i>	<i>Waters Symmetry</i>	<i>Kinetex</i>	<i>Waters Symmetry</i>	<i>Kinetex</i>
1,730	1,657	17,228	17,699	15,814	16,278	9,750	10,890
5,232	5,163	52,903	54,460	61,120	64,068	35,240	38,750

Näyte		Waters Symmetry		Kinetex	
		$\mu\text{mol/l}$	Korkeus	$\mu\text{mol/l}$	Korkeus
1	Karbamatsepiini-epoksidi	5,856	4,374	5,780	6,203
2	Karbamatsepiini	48,038	9,319	47,387	19,537
3	10-OH-karbatsepiini	78,256	119,428	77,250	135,037
4	10-OH-karbatsepiini	12,784	19,341	12,780	21,994
5	10-OH-karbatsepiini	6,748	10,156	6,792	11,638
6	Fenytoiini	44,389	12,802	43,871	24,524
7	10-OH-karbatsepiini	70,465	111,799	69,953	128,646
8	10-OH-karbatsepiini	61,171	82,040	60,131	92,981
9	10-OH-karbatsepiini	63,936	87,431	63,953	104,515
10	Primidoni	54,303	79,473	54,207	43,958
11	Fenobarbitaali	50,246	41,690	49,759	44,820

12	Karbamatsepiini-epoksidi	4,188	3,880	4,081	5,576
13	Karbamatsepiini	58,185	14,082	60,783	31,900
14	Fenytoiini	58,610	15,837	63,194	34,222
15	Primidoni	43,798	64,498	43,917	35,710
16	Fenobarbitaali	162,930	135,756	163,502	146,784
17	Fenytoiini	47,965	13,055	47,971	26,118
18	Primidoni	27,843	39,970	27,818	22,695
19	Fenobarbitaali	93,118	76,307	93,752	84,677
20	Karbamatsepiini-epoksidi	8,082	7,489	7,978	11,013
21	Karbamatsepiini	41,192	9,872	44,536	23,607
22	Fenytoiini	132,607	35,617	137,280	74,772
23	Primidoni	31,990	46,265	31,970	25,705
24	Fenobarbitaali	123,408	101,527	124,309	110,442
25	Karbamatsepiini-epoksidi	10,814	10,094	10,713	14,578
26	Karbamatsepiini	51,823	12,483	52,587	27,269
27	Fenytoiini	8,747	2,269	9,653	5,297
28	Fenobarbitaali	21,374	78,013	21,462	84,415

**Tulokset täsmällisyyden ja tarkkuuden arviointiin**

Toistettavuus ja tarkkuus (µmol/l)							
	Primidoni	Lamotrigiini	10-OH-karbatsepiini	Feno-barbitaali	Karbatsepiiniepoksidi	Karbatsepiini	Fenytioini
Matalat kontrollit	18,8	11,3	20,4	36,9	1,7	20,4	17,9
	17,2	9,6	20,4	33,6	1,7	18,2	15,9
	18,3	10,4	19,2	36,2	1,6	19,6	17,0
	18,6	10,2	19,8	36,2	1,7	19,3	16,7
	18,4	9,9	19,8	35,5	1,7	19,0	16,4
	17,5	9,4	20,2	33,9	1,7	18,0	15,4
Korkeat kontrollit	80,5	39,4	108,2	151,9	5,6	61,8	71,7
	80,7	37,5	113,9	152,2	5,9	61,0	70,6
	77,8	35,3	111,9	145,8	5,7	58,4	67,9
	78,6	34,7	111,5	147,6	5,7	58,5	67,7
	80,8	34,2	116,5	149,5	5,9	58,7	68,0
	77,9	33,1	116	145,2	5,9	56,8	65,7
1K	32,3	10,5	-	90,1	9,7	38,4	-
	32,1	10,3	-	90,1	9,5	38,0	-
	32,5	9,9	-	89,7	9,5	37,6	-
2K	66,8	16,2	-	147,2	4,9	40,9	29,0
	66,3	15,8	-	148,5	4,9	40,5	28,6
	66,9	15,2	-	149,0	5,0	40,1	28,2
3K	45,5	-	-	215,2	34,0	75,3	80,7
	45,6	-	-	216,1	33,9	73,7	78,5
	45,2	-	-	216,3	33,9	73,8	78,7
4K	-	23,5	-	-	3,0	8,9	64,5
	-	24,0	-	-	3,0	8,8	63,8
	-	23,2	-	-	3,0	8,7	62,9

Uusittavuus (µmol/l)							
Kontrollit	Primidoni	10-OH-karbatsepiini	Fenobarbitaali	Karbatsepiiniepoksidi	Karbatsepiini	Fenytioini	Lamotrigiini
Matala taso	18,0	20,0	42,0	1,9	22,0	20,0	13,4
	19,0	19,0	38,0	1,9	20,0	18,0	11,1
	19,0	20,0	43,0	1,8	23,0	20,0	13,8
	18,0	22,0	38,0	1,8	21,0	19,0	10,8
	18,0	20,0	38,0	1,7	21,0	19,0	10,8
	18,0	20,0	39,0	1,7	21,0	19,0	11,8
Korkea taso	79,0	110,0	169,0	6,2	67,0	79,0	44,4
	81,0	113,0	149,0	6,2	59,0	68,0	35,0
	80,0	102,0	171,0	6,2	66,0	78,0	45,0
	77,0	105,0	153,0	6,3	62,0	74,0	38,7
	77,0	112,0	153,0	5,8	62,0	74,0	38,7
	74,0	112,0	143,0	5,8	57,0	67,0	37,4